

00559



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**FARMACOCINETICA DE CASIOPEINA III-I.
ESTUDIO PRECLINICO EN CONEJOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(B I O F A R M A C I A)
P R E S E N T A
Q.F.B. JULIA ANTONIO JARQUIN

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. INES FUENTES NORIEGA



CIUDAD UNIVERSITARIA

SEPTIEMBRE 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

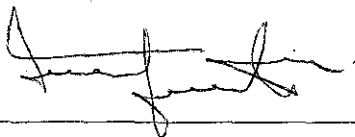
JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

PRESIDENTE	Dr. Gilberto Castañeda Hernández
VOCAL	Dr. Mario González de la Parra
SECRETARIO	Dr. Andrés Navarrete Castro
PRIMER SUPLENTE	Dra. Helgi Jung Cook
SEGUNDO SUPLENTE	M en C. Juan Manuel Rodríguez

Sitio donde se desarrolló el tema:

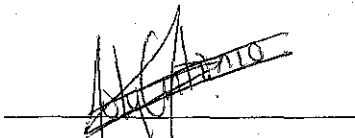
**Laboratorio de Biofarmacia, Departamento de Bioquímica y Farmacia
División de Estudios de Posgrado UNAM.
Unidad de experimentación animal, UNAM.**

ASESOR



M en C. Inés Fuentes Noriega.

SUSTENTANTE



Q.F.B. Julia Antonio Jarquín.

DIGNA LIBERTAD

No escogí ser una mujer común.

Tengo derecho a sobresalir.

Busco la oportunidad de desarrollar todas las facultades que Dios me dio.

Quiero correr los riesgos necesarios.

Prefiero los desafíos de la Vida a una existencia tranquila; la satisfacción de quien cumple con su deber a la calma inalterable de una utopía.

No cambiaré la libertad por la caridad ni la dignidad por la ayuda.

Tengo por herencia pararme erguida, orgullosa y sin miedo, pensar y actuar por mí misma, disfrutar los beneficios de mis actos y dar la cara al mundo

audazmente diciendo:

¡Esto, con la ayuda de Dios, lo he hecho yo!

AGRADECIMIENTOS.

A la UNAM y a la Facultad de Química por la oportunidad de superarme profesionalmente.

A los profesores integrantes de H. Jurado, por sus acertadas aportaciones y comentarios.

A los profesores de Biofarmacia por su enseñanza, amistad y consejos.

A CAFET, por la donación de los conejos empleados en el estudio.

A la Unidad de Experimentación Animal, por todo el apoyo brindado para la realización de este estudio.

A Isabel Gracia, Lucia, Anabel y Héctor, por su ayuda y consejos.

A la Dra. Lena Ruiz, por su apoyo.

A la mtra. Inés, por todo su conocimiento, apoyo, consejos y amistad que me brindo. Realmente la aprecio muchísimo. Gracias, mil.

DEDICATORIAS.

A Dios

Por ser la vela de la que nace la
luz que brilla en toda oscuridad.

A mis Padres

Tino y Fany, Gracias....

Porque me amaron antes de
nacer,
Y, a través de sus ojos,
Me anticiparon al mundo,
Haciéndome sentir la vida
Con todo su dolor
Con toda su alegría
Con todo su amor.

Ahora que la atravieso sola
Les doy las gracias cuando
sufro,
Cuando río o cuando amo,
Porque detrás de cada lagrима,
De cada sonrisa o de cada reto,
Los encuentro....

A mis Hermanos

Domi, José Luis y Mary, por
todos los momentos lindos y no
tanto que hemos pasado, por su
cariño, consejos y comprensión.

A mi Sobrinito

Luis Manuel, porque con tus
inquietudes me haces buscar
respuestas a tus dudas; y
sorprenderme de lo importante
que es conservar a niño que
llevamos dentro.

A mi abuelito Chofito y a mi tía
Tomasita.

A mis mejores amigos, Kenny,
Alma, Enrique, Isabel, J. Luis,
Ernesto, Ibeth, Claudia, Carlos.
Y todos aquellos que no necesito
mencionar por que saben que
tienen un lugar especial en mi
corazón.

Héctor, no se como agradecerte
todo el apoyo, cariño y amistad
que me brindas.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
INTRODUCCION	ii
OBJETIVOS	iii
I GENERALIDADES	
1.1 Muerte celular.	1
1.2 El cáncer.	4
1.2.1 Agentes químicos, físicos y biológicos que causan cáncer.	5
1.2.2 Oncogenes y genes supresores.	7
1.3 Fármacos anticancerígenos.	11
1.3.1 Resistencia a la quimioterapia del cáncer.	15
1.4 Casiopeína.	18
1.5 Pruebas no clínicas de fármacos.	22
1.5.1 Guía FDA de los requerimientos para pruebas no clínicas.	23
1.5.2 Tipos de estudios <i>no clínicos</i> .	25
1.6 Validación de métodos analíticos.	28
II PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 Reactivos.	30
2.2 Material biológico.	30
2.3 Equipo.	30
2.4 Preparación de soluciones.	31
2.5 Métodos.	32
2.5.1 Método de analítico para la cuantificación de Casiopeína III-I en sangre.	32
2.5.1.1 Preparación de la curva patrón en sangre de conejo.	33



2.5.1.2 Procedimiento par la cuantificación de Casiopeína III-i en sangre de conejo.	33
2.5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de Casiopeína sangre.	35
2.5.2.1 Especificidad.	35
2.5.2.2 Linealidad del sistema.	35
2.5.2.3 Linealidad del método.	38
2.5.2.4 Precisión del método (Repetibilidad y reproducibilidad).	40
2.5.2.5 Exactitud.	42
2.5.2.6 Límite de detección y cuantificación.	43
2.5.2.7 Estabilidad.	43
2.5.3 Estudio preliminar de la Farmacocinética de Casiopeína III-i.	43
2.5.4 Estudio preclínico para determinar los parámetros farmacocinéticos de Casiopeína III-i.	44
2.5.5 Determinación de parámetros farmacocinéticos.	45

III RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

3.1 Validación del método analítico para la cuantificación de Casiopeína III-i en sangre por.	47
3.1.1 Especificidad.	47
3.1.2 Linealidad del sistema.	50
3.1.3 Linealidad del método.	52
3.1.4 Precisión del método (Repetibilidad y reproducibilidad).	55
3.1.5 Exactitud del método.	57
3.1.6 Límite de detección y límite de cuantificación.	59
3.1.7 Estabilidad.	60



3.2	Estudio preliminar de Farmacocinética de Casiopeína III-i.	62
3.3	Farmacocinética de Casiopeína III-i.	66
IV	CONCLUSIONES	77
V	APÉNDICE I	79
VI	APÉNDICE II	84
VII	BIBLIOGRAFIA	89



INDICE DE TABLAS

Tabla I.	Algunos carcinógenos químicos.	6
Tabla II.	Algunos oncogenes de los retrovirus.	8
Tabla III.	Agentes quimioterápicos útiles en las Enfermedades neoplásicas.	13
Tabla IV.	Algunas propiedades de la Glucoproteína P.	16
Tabla V.	Algunos mecanismos bioquímicos de resistencia Farmacológica encontrados en células cancerosas.	17
Tabla VI.	Condiciones cromatográficas para la cuantificación De Casiopeína III-i en sangre de conejo.	32
Tabla VII.	Preparación de la curva patrón.	33
Tabla VIII.	Análisis de varianza del modelo $y = mx + b$	37
Tabla IX.	Análisis de varianza del modelo $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$	41
Tabla X.	Linealidad del sistema para cuantificar Casiopeína III-i.	50
Tabla XI.	Análisis de varianza del modelo $y = 0.0885x + 0.2856$	51
Tabla XII.	Linealidad del método de cuantificación de Casiopeína III-i en sangre de conejo.	52
Tabla XIII.	Análisis de varianza del modelo $y = 0.0785x + 0.4680$	53
Tabla XIV.	Repetibilidad de Casiopeína III-i (conc. 60 µg/mL).	55
Tabla XV.	Reproducibilidad de Casiopeína III-i. Analista 1.	56
Tabla XVI.	Reproducibilidad de Casiopeína III-i. Analista 2.	56
Tabla XVII.	Análisis de varianza del modelo $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$	57
Tabla XVIII.	Cantidades recuperadas de tres curvas adicionadas con Casiopeína III-i	58
Tabla XIX.	Porcentaje recuperado promedio, desviación estándar y Coeficiente de variación de 3 curvas adicionadas con Casiopeína III-i	58



Tabla XX.	Factores de respuesta de 3 curvas adicionadas con Casiopeína III-i para determinar LDD y LDC	59
Tabla XXI.	Estabilidad de Casiopeína III-i. (Concentración 80 µg/mL)	61
Tabla XXII.	Concentraciones sanguíneas de Casiopeína III-i Estudio preliminar.	63
Tabla XXIII.	Parámetros Farmacocinéticos de Casiopeína III-i. Estudio preliminar.	65
Tabla XXIV.	Datos de concentración sanguínea del conejo 1 al 5.	66
Tabla XXV.	Datos de concentración sanguínea del conejo 6 al 10.	67
Tabla XXVI.	Datos de concentración sanguínea promedio +/- Desviación estándar y coeficiente de variación.	69
Tabla XXVII.	Datos de los parámetros farmacocinéticos para Casiopeína III-i de cada uno de los conejos.	71
Tabla XXVIII.	Parámetros farmacocinéticos promedio +/- Desviación estándar y coeficiente de variación.	72
Tabla XXIX.	Modelo animal para el estudio de algunas enfermedades En donde se emplean conejos.	82
Tabla XXX.	Valores sanguíneos normales para conejos.	82



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos y sitios de acción de agentes quimioterapéuticos útiles en neoplasias.	3
Figura 2.	Estructura química de la Casiopeína III-i.	20
Figura 3.	Diagrama de extracción de Casiopeína III-i en sangre de conejo.	34
Figura 4.	Muestra de sangre en el proceso de extracción (blanco).	48
Figura 5.	Muestra adicionada con Casiopeína III-i.	49
Figura 6.	Linealidad del sistema analítico por CLAR para cuantificar Casiopeína III-i.	50
Figura 7.	Linealidad del método analítico por CLAR para cuantificar Casiopeína III-i en sangre de conejo.	52
Figura 8.	Estabilidad de Casiopeína III-i en condiciones de congelación temperatura ambiente en oscuridad y temperatura ambiente con luz. (Concentración 80 µg/mL)	61
Figura 9.	Perfil farmacocinético de Casiopeína III-i, para una administración por infusión intravenosa ($K_0 = 416.67 \mu\text{g}/\text{min.}$).	63
Figura 10.	Esquema que describe el modelo farmacocinético de una Administración por infusión intravenosa.	64
Figura 11.	Perfil farmacocinético de Casiopeína III-i, para una administración por infusión intravenosa. Fase terminal conejos 1 a 5.	68
Figura 12.	Perfil farmacocinético de Casiopeína III-i, para una administración por infusión intravenosa. Fase terminal conejos 6 a 10.	68
Figura 13.	Perfil farmacocinético de Casiopeína III-i, promedio. Datos de la fase terminal de una administración por infusión intravenosa.	70



RESUMEN

Este trabajo describe la Farmacocinética de la Casiopeína III-i en su fase preclínica, en 10 conejos machos Nueva Zelanda con un peso promedio de 2.93 kg. Se les administro una dosis de 10 mg/kg de peso por infusión intravenosa a una velocidad de infusión (K_0) de 490.33 $\mu\text{g}/\text{min}$. Se encontró que la constante de eliminación (K_{el}) fue de 0.0150 min^{-1} . Su tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue 53.92 min., y su tiempo medio de residencia (TMR) fue 90.86 min. Presenta un volumen de distribución aparente (V_d) de 202.81 mL y una depuración (Cl) de 2.08 mL/min. El área bajo la curva (ABC) fue 23163.85 $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{min}$. Estos resultados representan los primeros datos farmacocinéticos de la Casiopeína III-i.



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades que ocupa uno de los primeros lugares de causa de mortalidad en nuestro país. Las células cancerosas se caracterizan por pérdida del control de la proliferación, invasividad y metastasis. Las células tumorales benignas han perdido el control de la proliferación pero no forman metastasis. En los últimos años se ha logrado un aumento en el conocimiento básico de este padecimiento, mejorando técnicas de investigación; así como la síntesis de un número importante de nuevos agentes antineoplásicos.^{1,2}

A pesar de los avances y del número de fármacos existentes, se hace necesaria la innovación de quimioterapia experimental ya que muchos de los fármacos citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y por ello sólo son activos contra las células que se encuentran en proceso de división, por lo tanto, afectan el desarrollo tanto de células normales como neoplásicas, sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las normales, son más susceptibles al efecto de los fármacos.^{2,5}

Un problema mayor en la quimioterapia del cáncer, es el desarrollo de resistencia a los fármacos usados. Aunque en un principio los fármacos son eficaces, a menudo después de un tiempo las células tumorales desarrollan mecanismos que los vuelven ineficaces. De ahí, que sea necesario el desarrollo y síntesis de nuevos compuestos con posible actividad antineoplásica.¹

Dentro de las nuevas moléculas con actividad citostática y antineoplásica se encuentra la familia de las Casiopeínas, que son compuestos de coordinación con un centro metálico de cobre^{6,17}. Estos son compuestos de coordinación análogos al Cisplatino, que se diseñaron considerando diferentes parámetros y propiedades químicas, como son el metal y su estado de oxidación, número de coordinación del metal, propiedades de



solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad.^{8,9}

Debido a que se trata de fármacos nuevos es de suma importancia realizar estudios "*in vitro*" e "*in vivo*" para determinar los efectos de estos fármacos.^{9,10,11,12,13,14} Dentro de los estudios que establece la FDA (Food and Drug Administration) para fármacos nuevos se encuentran los estudios preclínicos, que comprenden una serie de pruebas toxicológicas y farmacológicas (farmacocinética y farmacodinamia) las cuales se llevan a cabo en animales de laboratorio.^{20,21,22}

OBJETIVOS

1. Desarrollar y validar un método analítico para determinar y cuantificar Casiopeína III-i en sangre de conejo.
2. Determinar los parámetros farmacocinéticos de la Casiopeína III-i en conejos, después de una administración por infusión intravenosa.



solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad.^{8,9}

Debido a que se trata de fármacos nuevos es de suma importancia realizar estudios "*in vitro*" e "*in vivo*" para determinar los efectos de estos fármacos.^{9,10,11,12,13,14} Dentro de los estudios que establece la FDA (Food and Drug Administration) para fármacos nuevos se encuentran los estudios preclínicos, que comprenden una serie de pruebas toxicológicas y farmacológicas (farmacocinética y farmacodinamia) las cuales se llevan a cabo en animales de laboratorio.^{20,21,22}

OBJETIVOS

1. Desarrollar y validar un método analítico para determinar y cuantificar Casiopeína III-i en sangre de conejo.
2. Determinar los parámetros farmacocinéticos de la Casiopeína III-i en conejos, después de una administración por infusión intravenosa.



GENERALIDADES



I GENERALIDADES

1.1 MUERTE CELULAR

El concepto de muerte celular total se aplica a la terapéutica, ya que es necesaria la extirpación total del tumor para una curación quirúrgica, y se requiere de la destrucción completa de todas las células cancerosas para lograr la curación con radioterapia. Considerando un sistema tumoral modelo, por ejemplo la leucemia L1210 del ratón, se han establecido ciertos principios importantes que han guiado y dirigido la quimioterapia moderna del cáncer. Estos pueden resumirse de la siguiente forma:¹

- (1) Una sola célula maligna clonógena puede dar origen a una descendencia suficiente para matar al huésped, por lo tanto para lograr la curación es necesario destruir cada una de estas células. Como el tiempo de duplicación de los tumores es constante durante la etapa de crecimiento logarítmico, la supervivencia del huésped es inversamente proporcional al número de células malignas que han sido inoculadas o que sobreviven a las medidas terapéuticas.
- (2) La muerte celular causada por agentes antineoplásicos tiene lugar según una cinética de primer orden, es decir con una maniobra terapéutica determinada muere un porcentaje constante, más que un número constante de células.

Este hecho tiene un gran impacto sobre la quimioterapia clínica del cáncer. Por ejemplo, un paciente con leucemia linfocítica aguda avanzada pudiera albergar 10^{12} células (aprox. 1 Kg de células malignas). Un fármaco capaz de matar 99.99 % de estas células reduciría la masa tumoral hasta aproximadamente 100 mg, y esto podría manifestarse como una remisión clínica completa, sin embargo, persistirían 10^8 células malignas, cada una de las cuales pudiera causar recaída de la enfermedad. La deducción



lógica de estos conceptos ha sido el intento de lograr muerte total empleando varios fármacos, en combinación o en un orden racional. La supervivencia prolongada de los pacientes con leucemia linfocítica aguda mediante el empleo de tales regímenes de dosificación ha alentado la aplicación de estos principios al tratamiento de otras neoplasias. Por lo tanto, un buen conocimiento de la cinética del ciclo celular es esencial para utilizar los fármacos antineoplásicos de manera adecuada.^{1,2}

A pesar de los avances y del número de fármacos existentes, se hace necesaria la innovación de la quimioterapia experimental ya que gran parte de los fármacos citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y por ello sólo son activos contra las células que se encuentran en proceso de división. En la Figura 1 se muestra el mecanismo de acción de algunos fármacos empleados en neoplasias. Del mismo modo, los tejidos normales que proliferan rápidamente (médula ósea, folículo piloso y epitelio intestinal) están sujetos a menudo a daños por alguno de estos potentes fármacos antineoplásicos y esta toxicidad suele limitar la utilidad de los mismos. Por otra parte los tumores de crecimiento lento, por ejemplo los carcinomas de colon o de pulmón, a menudo no responden a la quimioterapia administrada.^{1,2,3}

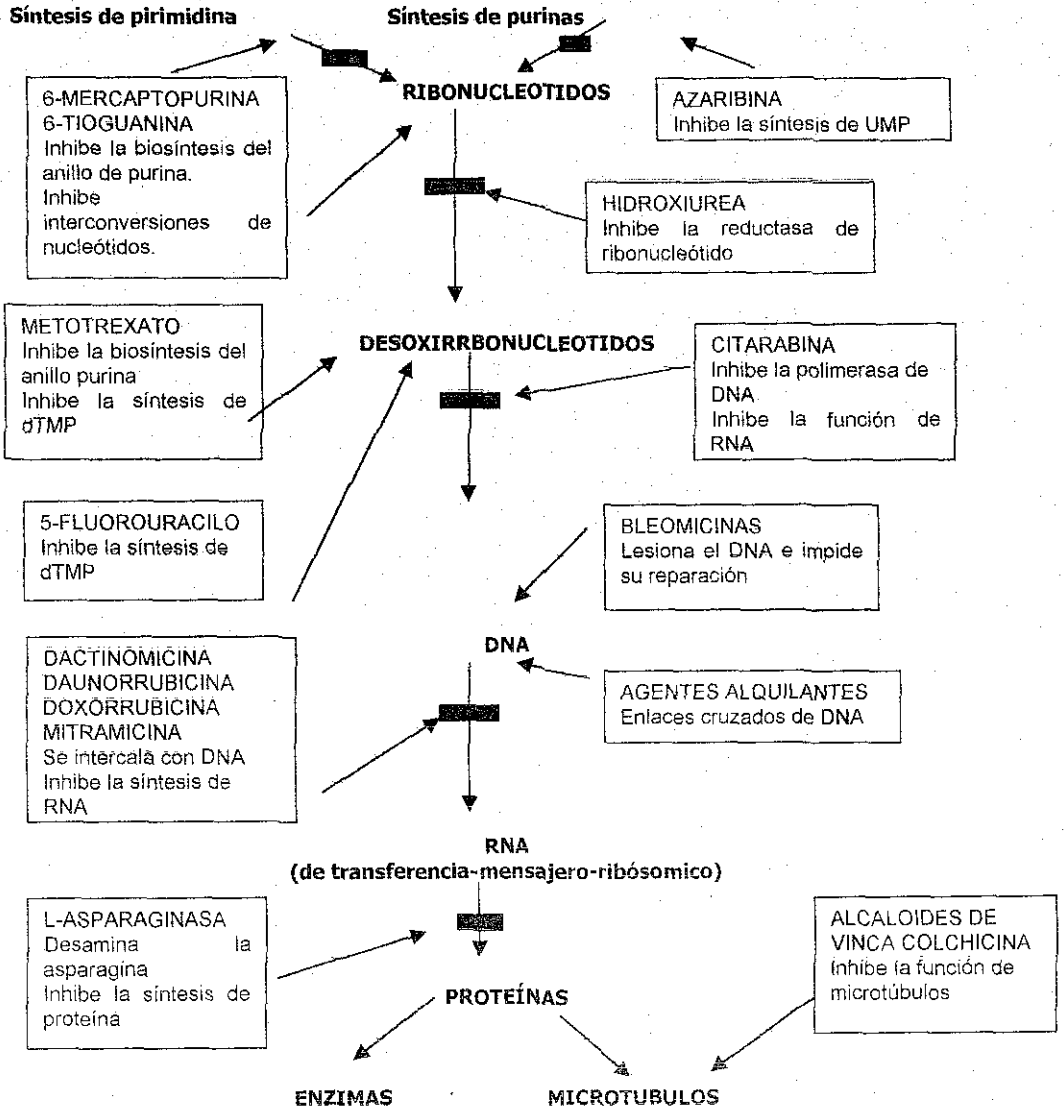


Figura 1. Mecanismos y sitios de acción de agentes quimioterapéuticos útiles en neoplasias.³

Así el conocimiento de la cinética del ciclo celular es esencial para la generación de agentes antineoplásicos y aunque hay diferencias de duración del ciclo celular, todas las células presentan un cuadro similar durante el proceso de división celular que se caracteriza de la siguiente manera:^{4,5}

- 1) Fase presintética G1
- 2) Síntesis de DNA (S)
- 3) Intervalo después de completar la síntesis de DNA. Fase postsintética G2
- 4) Mitosis M. La célula G2 que contiene una cantidad de DNA se divide en dos células hijas G1.

Cada una de las células hijas pueden reingresar al ciclo celular o pasar a una etapa no proliferativa denominada G0.^{4,5}

1.2 EL CÁNCER.

Las células cancerosas se caracterizan por pérdida del control de proliferación, invasividad y metástasis. Las células tumorales benignas han perdido el control de proliferación pero no forman metástasis. El cáncer puede ser causado por agentes físicos, químicos y biológicos; estos agentes lesionan o alteran el DNA, de modo que el cáncer es una enfermedad del genoma.^{1,2,3} El inicio y promoción son fenómenos establecidos en forma rotunda en carcinogénesis química. Es probable que el inicio sea el daño en el DNA, pero los mecanismos requeridos para la promoción no se han esclarecido. Los ésteres de forbol son los agentes promotores más estudiados; activan a

la proteína cinasa C, que ejerce diversos efectos.^{2,3}

1.2.1 AGENTES QUÍMICOS, FÍSICOS Y BIOLÓGICOS QUE CAUSAN CÁNCER.

Los agentes que causan cáncer se clasifican en tres amplios grupos:

- † **Energía radiante:** Los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma son mutágenos y carcinógenos. Estas radiaciones lesionan al DNA de varias maneras. La radiación ultravioleta puede causar la formación de dímeros de pirimidina; pueden crearse sitios apurínicos o apirimidínicos por eliminación de las bases correspondientes; pueden producirse roturas en las tiras sencillas o dobles, o entrecruzamiento de ellas. Se supone que la lesión del DNA es el mecanismo básico de carcinógenesis de la energía radiante. Aparte de los efectos directos sobre el DNA, los rayos X y gamma provocan la formación de radicales libres en los tejidos. Los radicales hidroxilos resultantes, su peróxido y otros, pueden interactuar con el DNA y algunas macromoléculas y conducir a alteraciones moleculares, por lo tanto, es probable que contribuyan a los efectos carcinógenos de la energía radiante.^{1,2}

- † **Compuestos químicos:** Un extenso número de compuestos químicos son carcinógenos (Tabla I). Muchas de estas sustancias se relacionan con el desarrollo de cáncer en el ser humano. Se calcula que hasta 80% de los cánceres humanos se producen por factores ambientales, principalmente por compuestos químicos. La exposición a esas sustancias puede deberse a la ocupación de la persona (por ejemplo, benceno y asbesto); la alimentación (Por ejemplo, aflatoxina B₁, producida por el moho *Aspergillus flavus* y en ocasiones se encuentra como contaminante de los cacahuates y otros alimentos); el estilo de vida (consumo de cigarrillos) o a otros



factores (por ejemplo, ciertos agentes farmacológicos pueden ser carcinógenos).^{1,2,3}

Tabla I. Algunos Carcinógenos químicos.⁴

CLASE	COMPUESTO
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Benzo[α]pireno, dimetilbenzantraceno
Aminas aromáticas	2-Acetilaminofluoreno, N-metil-4-aminoazobenceno (MAB)
Nitrosaminas	Dimetilnitrosamina, Dietilnitrosamina
Medicamentos diversos	Alquilantes, dietilestilbestrol
Compuestos naturales	Dactinomicina, aflatoxina B ₁
Compuestos inorgánicos	Arsénico, asbesto, berilio, cadmio, cromo.

⊕ **Virus:** Los poliomavirus y los virus SV40 desempeñan un papel importante en el desarrollo de las ideas actuales sobre la oncogénesis viral. Los dos son pequeños y sus genomas circulares codifican sólo 5 ó 6 proteínas; bajo ciertas circunstancias, la infección con estos virus en células apropiadas pueden causar transformación maligna. En el caso del SV40 estas proteínas se conocen como **T** y **t** y en el caso del poliomavirus, se designan, **T**, **Tmedia** y **t**. Se sabe que los antígenos **T** se unen fuertemente al DNA y alteran la expresión genética. Estas proteínas muestran efectos cooperativos los cuales sugieren, que es necesario modificar más de una reacción o un proceso para la transformación.^{1,2} Hay interés considerable en el virus de Epstein-

Barr, dado que en el ser humano se relaciona con el linfoma de Burkitt y con el carcinoma nasofaríngeo.¹ El virus de la hepatitis B puede estar relacionado con algunos casos de cáncer hepático en el hombre.

1.2.2 ONCOGENES Y GENES SUPRESORES.

Gran parte del interés actual en el cáncer se enfoca al estudio de oncogenes y de genes supresores de tumor. Los oncogenes son genes capaces de causar cáncer. Su descubrimiento ha tenido gran impacto en la investigación de los mecanismos fundamentales de carcinogénesis.⁵ En la Tabla II se enlistan algunos oncogenes virales conocidos, junto con sus productos. Las células normales contienen precursores potenciales de oncogenes, designados protooncogenes. La activación de protooncogenes a oncógenes se logra por cinco mecanismos:²

Tabla II. Algunos oncogenes de los retrovirus.²

ONCOGEN	RETROVIRUS	ORIGEN	PRODUCTO DEL ONCOGEN	UBICACIÓN SUBCELULAR
Abl	Virus Abelson de la leucemia murina	Ratón	Proteína tirosina cinasa	Membrana plasmática
erb-B	Virus de la eritroblastosis aviar	Pollo	Receptor trunco para el EGF	Membrana plasmática
fes	Virus del sarcoma felino	Gato	Proteína tirosina cinasa	Membrana plasmática
fos	Virus del sarcoma murino	Ratón	Factor de transcripción (AP1); complejos con jun.	Núcleo
Jun	Virus del sarcoma aviar	Pollo	Factor de transcripción (AP1); complejos con fos.	Núcleo
myc	Virus 29 del mielocitoma	Pollo	Proteína fijadora del DNA	Núcleo
Sis	Virus del sarcoma del simio	Mono	PDGF trunco (cadena B)	Membranas; secretado
Src	Virus del sarcoma de Rous	Pollo	Proteína tirosina cinasa	Membrana plasmática

EGF, factor de crecimiento epidérmico; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas.

- ❖ **Inserción del promotor:** Ciertos retrovirus carecen de oncogenes (por ejemplo, el virus de la leucemia aviar) pero pueden causar cáncer después de un periodo más largo. Al igual que los demás retrovirus, cuando estos virus particulares infectan a las células, su transcriptasa inversa dirige la síntesis de una copia de DNA (cDNA) a partir de su genoma de RNA y el cDNA y el genoma se integra en el genoma del hospedero. EL cDNA de doble tira integrado se designa como un provirus. Las copias de cDNA están flanqueadas en ambos extremos por secuencias llamadas repeticiones terminales largas, semejantes a ciertos transposones ("genes saltadores").²

- ❖ **Inserción de un amplificador:** En algunos casos el provirus se inserta corriente abajo del gen *myc* o arriba de él pero orientado en dirección contraria; de una u otra manera, el gen *myc* se hace activo. La activación no puede deberse a la inserción de un promotor, dado que la secuencia de éste debe quedar corriente arriba del gen cuya transcripción va a incrementar y además, la secuencia necesita estar en dirección correcta 5' a 3'. Por consiguiente, se infiere que las secuencias repetidas terminales largas de los retrovirus implicados están actuando como secuencias amplificadoras. Los dos mecanismos anteriores, inserción del promotor y de un amplificador, operan comúnmente en la carcinogénesis viral. Ellos pueden clasificarse como ejemplos de mutagénesis de inserción.^{1,2}

- ❖ **Translocación cromosómica:** Un tipo de cambio cromosómico observado en las células cancerosas es la translocación. La base de una translocación es que una fracción del cromosoma se desprende y a continuación se une a otro cromosoma. Si a la vez el segundo cromosoma cede material al primero se dice que la translocación es "recíproca".^{1,2}



❖ **Amplificación génica:** En cierto número de tumores se observa un efecto de amplificación de ciertos genes. Un método para conseguir esto en los tumores, es por la administración del medicamento anticanceroso metotrexato, inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa. Las células tumorales pueden volverse resistentes a este fármaco. La base del fenómeno es que el gen para la dihidrofolato reductasa experimenta una amplificación que conduce a un incremento de la actividad de la enzima (hasta 400 veces). Los genes amplificados, que miden hasta 1000 KDa de longitud o más, pueden detectarse como regiones teñidas homogéneamente en un cromosoma específico. De la misma manera pueden detectarse cromosomas diminutos dobles, que son minicromosomas que carecen de centrómeros. Ciertos oncogenes celulares pueden amplificarse también de la misma forma y por lo tanto quedan activados. Existen datos que sugieren que el incremento en cantidad de los productos de ciertos oncogenes (como c-ras) causado por la amplificación de genes pueden tomar parte en el avance de las células tumorales a un estado de mayor malignidad.^{1,2}

❖ **Mutación en un punto:** El oncogen v-ras se identificó originalmente en ciertos retrovirus murinos. Su producto, una proteína (p21) con masa molecular de 21KDa, parece relacionarse con las proteínas G que modulan la actividad de la adenilil ciclase y por lo tanto, actúa de manera clave en las respuestas celulares a numerosas hormonas y medicamentos. Los análisis mediante secuenciación de protooncogen c-ras de células normales humanas y del oncogen c-ras de un cáncer humano de vejiga, muestran que difieren únicamente en una base, lo cual conduce a la sustitución de un aminoácido en la duodécima posición del p21. Este resultado se confirma por análisis de genes c-ras de otros tumores humanos. En cada caso los resultados fueron consistentes; el gen aislado del tumor mostró mutación solo en un punto, comparado



con el protooncogen c-ras de las células normales. La posición de la mutación varía algo, de modo que se observaron sustituciones de otros aminoácidos. Al parecer estas mutaciones en p21 afectan su conformación y disminuyen su actividad como GTPasa.^{1,2}

Los oncogenes activados influyen en la multiplicación celular por perturbación de sus mecanismos normales de control de proliferación. En la actualidad se reconoce a los genes supresores de tumor como piezas claves en la génesis del cáncer. Los genes supresores de tumor importantes son RB1 y p53, ambos codifican a fosfoproteínas nucleares y es probable que estos productos génicos afecten la transcripción de genes que intervienen en eventos reguladores del ciclo celular.^{3,4}

1.3 FÁRMACOS ANTICANCERÍGENOS

Todos los fármacos neoplásicos son citotóxicos, y por lo tanto afectan el desarrollo tanto de células normales como neoplásicas.³ Sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las normales, son más susceptibles al efecto de los fármacos. Estos se clasifican en seis grupos de acuerdo con su mecanismo de acción en: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, alcaloides, hormonas y fármacos misceláneas. Algunos de los fármacos empleados en neoplasias son enlistados en la Tabla III. Es importante clasificar a los fármacos anticancerígenos como específicos del ciclo celular (CCS) o no específicos del ciclo celular (CCNS). Los primeros que incluyen metotrexato, fluorouracilo y citarabina actúan sobre células en multiplicación, en tanto que los últimos (por ejemplo, agentes alquilantes y cisplatino) actúan sin relación con el estado de proliferación. Los fármacos

CCS pueden subdividirse en específicos de fase por ejemplo, medicamentos que actúan en la fase S del ciclo (citarabina) o en la fase G₂ o M (bleomicina). En general, la terapéutica de dosis altas intermitentes tiene más probabilidad de lograr esto que un tratamiento continuo con dosis bajas, debido a que expone el tumor a concentraciones más altas del fármaco usando la quimioterapia combinada (combinación de 3 o 4 medicamentos) ha probado su éxito en varios cánceres, ya que los compuestos actúan en forma sinérgica, el comienzo de la resistencia puede retardarse y con frecuencia su toxicidad es menor.^{3,4}

Tabla III. Agentes quimioteráuticos útiles en las enfermedades neoplásicas³

CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRE COMÚN	ENFERMEDAD
Agentes de alquilación	Mostazas nitrogenadas	Mecloretamina (Mustargen)	Enfermedad de Hodgkin, linfosarcoma, mama, ovario.
		Ciclofosfamida (Citoxan, Endoxan)	Leucemia linfocítica aguda y crónica, enf. de Hodgkin, linfosarcoma, mieloma múltiple, neuroblastoma, mama, ovario, pulmón, tumor de Wilms, rhabdomyosarcoma.
		Melfalán (Alkeran)	Mieloma de célula plasmática, mama, ovario.
		Uracil- mostaza	Leucemia linfocítica crónica, linfosarcoma, enf. de Hodgkin, ovario, trombocitosis primaria.
		Clorambucil (Leukeran)	Leucemia linfocítica crónica, enf. de Hodgkin, linfosarcoma, mama, ovario, testículo.
	Derivados etilenimínicos	Trietileno melamina (TEM)	Enf. de Hodgkin, linfomas de otro tipo, retinoblastoma, mama, ovario, leucemias crónicas.
		Trietileno-tiofosforamida (tio-TEPA)	Enf. de Hodgkin, linfomas de otro tipo, retinoblastoma, mama, ovario, linfosarcoma.
	Alquilsulfonatos	Busulfán (Mileran)	Leucemia granulocítica crónica, policitemia vera, trombocitosis primaria.
	Nitrosoureas	Carmustina (BCNU)	Enf. de Hodgkin, linfomas de otros tipos, tumores cerebrales primarios y metastáticos, melanoma, célula renal.
		Lomustina (CCNU)	Enf. de Hodgkin, linfomas de otros tipos, tumores cerebrales primarios y metastáticos, célula renal.
		Estreptoizotocina	Insulinoma pancreático maligno, carcinoma maligno.
	Triacenos	Dacarbacina (DTIC)	Melanoma maligno, enf. de Hodgkin, sarcoma de tejidos blandos.
Antimetabolito	Análogos de la purina	6- Tioguanina (TG)	Leucemias linfocítica aguda, granulocítica aguda y granulocítica crónica.
	Análogos del ácido fólico	Metotrexato (Ametopterina)	Leucemia linfocítica aguda, coriocarcinoma, micosis fungoide, mama, testículo, orofaringe.
	Análogos de la pirimidina	5- Fluorouracil (5-FU)	Mama, colon, estómago, páncreas, ovario, orofaringe, vejiga urinaria, lesiones cutáneas.
		Citarabina (Citosar)	Leucemia linfocítica aguda y leucemia granulocítica aguda



CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRE COMÚN	ENFERMEDAD
Antimetabolito	Análogos de la pirimidina	Azauridina (Triazur)	Micosis fungoide, policitemia vera
		6- Mercaptopurina	Leucemia linfocítica aguda, granulocítica aguda y granulocítica crónica, coriocarcinoma.
Productos naturales	Alcaloides de Vinca	Vinblastina (VLB; Velban)	Enfermedad de Hodgkin, linfosarcoma, coriocarcinoma, mama.
		Vincristina (VCR; Oncovin)	Leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, rabdomyosarcoma, enf. Hodgkin.
	Antibióticos	Dactinomicina (Cosmegen)	Coriocarcinoma, tumor de Wilms, rabdomyosarcoma, testículo.
		Daunorrubicina (Daunoblastina)	Leucemias agudas granulocíticas y linfocíticas
		Doxorrubicina (Adriamicina)	Sarcoma de tejidos blandos, osteógenos y otros; enf. de Hodgkin, leucemias agudas, mama, genitourinarias, tiroides, pulmón, neuroblastoma.
		Bleomicina (Blenoxane)	Carcinomas de células planas de cabeza, cuello, piel, esófago y vías genitourinarias, enf. de Hodgkin.
		Mitramicina (Mithracin)	Tumores testiculares, hipercalcemia maligna.
Fármacos varios	Enzimas	L-Asparaginasa	Leucemia linfocítica aguda
	Urea substituida	Hidroxiurea (Hidrea)	Leucemia granulocítica crónica, melanoma maligno.
	Derivados de metilhidracina	Procarbina (Matulana)	Enfermedad de Hodgkin
Hormonas	Supresores cortico-suprarrenales	Mitotán (Lisodren)	Corteza suprarrenal
	Adrenocortico-steroides	Prednisona (Meticorten)	Leucemia linfocítica aguda y leucemia linfocítica crónica, linfosarcoma, enfermedad de Hodgkin, mama.
	Progestinas	Acetato de medroprogesterona (Provera)	Endometrio, célula renal, mama, próstata.
		Estrógenos	Diétilstilbestrol Etinilestradiol (Estinilo)
	Andrógenos	Propionato de testosterona (Halotestin)	Mama
Isótopos radiactivos	Fósforo	Fosfato sódico con ³² P	Policitemia vera, leucemias linfocítica y granulocíticas crónicas.
	Yodo	Yoduro sódico con ¹³¹ I	Tiroides



1.3.1 RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

Un problema mayor en la quimioterapia del cáncer es el desarrollo de resistencia a los fármacos usados. Aunque en un principio los fármacos son eficaces, a menudo después de un tiempo las células tumorales desarrollan mecanismos que los vuelven ineficaces.^{3,5}

Se considera que la resistencia adquirida de las células cancerosas a los quimioterapéuticos refleja una velocidad alta de mutación espontánea de estas células. Es probable que sean resistentes no sólo al fármaco sino también a otros compuestos anticancerosos cuya estructura no se relaciona. Por ejemplo, si las células tumorales desarrollan resistencia a metotrexato, se encuentra que también lo son a antibióticos antitumorales como doxorubicina y a compuestos vegetales como vincristina. Esto se conoce como resistencia multifarmacológica y tiene importancia extrema debido a que su desarrollo es causa frecuente del fracaso de la quimioterapia.^{3,4}

La base molecular de la resistencia multifarmacológica ha sido esclarecida por el descubrimiento de que las células cancerosas que muestran esta resistencia tienen a menudo concentraciones elevadas de una proteína llamada P glicoproteína en sus membranas plasmáticas. Esta proteína actúa como una bomba dependiente de energía, que expulsa a una extensa variedad de anticancerígenos y disminuye así su eficacia. En la Tabla IV se muestran algunas propiedades de la P glicoproteína.

Tabla IV. Algunas propiedades de la P Glicoproteína.⁴

- ❖ Glicoproteína fosforilada de 170 Kda presente en la membrana plasmática, 1280 aminoácidos, 12 regiones transmembrana, fijación de 2 ATP plegados, presenta homología con la hemolisina B bacteriana.
- ❖ Actúa como una bomba de flujo dependiente de energía, expulsando una variedad de fármacos, y así mediando la RFM.
- ❖ Miembro de un multigen familiar (incluyen mdr1 y mdr2).
- ❖ Ampliamente distribuido y altamente conservado a través de especies.
- ❖ Presente en algunas células normales del riñón, intestino, etc.
- ❖ Una cantidad incrementada en las células cultivadas resistentes, y en las células tumorales resistentes in vivo; aumento in vivo correlacionado con un pobre pronóstico
- ❖ También puede ser inducido por otros estímulos por ejemplo choque térmico.
- ❖ La amplificación del gen, o ambos, puntos de mutaciones involucradas con RFM en cultivo celular.
- ❖ Cuando se transfiere a las células produce RFM.
- ❖ Puede ser inhibida por quimiosensibilizadores como verapamil (un bloqueador del calcio) o ciclosporina.

RFM, resistencia multifarmacológica.

En cultivos celulares se ha encontrado amplificación génica y mutaciones en un punto en células cancerosas resistentes que muestran concentraciones altas de P glicoproteína; aún no se ha establecido los mecanismos que regulan este incremento de P glicoproteína in vivo. Esta glicoproteína debe tener funciones fisiológicas, dado que existe en órganos normales como riñón e intestino; es posible que intervenga en la



excreción de compuestos con potencial tóxico de las células de estos órganos. Se ha demostrado que otros mecanismos intervienen en la resistencia de células cancerosas a ciertas clases de fármacos (Tabla V).^{3,5}

Tabla V. Algunos mecanismos bioquímicos de resistencia farmacológica encontrados en células cancerosas.⁵

MECANISMO GENERAL	FARMACO	EJEMPLO ESPECÍFICO
Captación disminuida	Metotrexato	Sistema de transporte mutante
Excreción aumentada	Ciertos fármacos	Mediada por P glicoproteína.
Activación insuficiente	Ciclofosfamida	Disminución de especies citocromo p450 activantes
Aumento de inactivación del fármaco	Citarabina	Aumento de actividad de desaminasas que actúan sobre citisina
Secuestro de fármaco	Cisplatino	Aumento de un tipo de metalotioneína*
Mutación en enzima blanco	Metotrexato	Mutante DHFR**
Aumento de enzima blanco	Metotrexato	Amplificación del gen para DHFR**
Mecanismo de reparación rápida	Fármacos metilantes	Aumento de la enzima reparadora específica (O ⁶ -alquilguanina-DNA-alkiltransferasa)

* Las metalotioneínas son metaloproteínas citosólicas de peso molecular bajo, ricas en cisteína, presentes en concentración elevada en hígado y riñón y que se unen a varios metales y por lo tanto, los eliminan (por ejemplo, Zn, Cu, Hg y Cd). Son inducibles en la exposición a esos metales.

**DHFR, dehidrofolato reductasa

1.4 CASIOPEÍNAS

En los últimos años se ha logrado un aumento en conocimiento básico, mejorando técnicas de investigación se ha obtenido un número importante de nuevos agentes antineoplásicos. El desarrollo principal se ha producido en áreas como la biología molecular y celular, que han brindado una mejor comprensión de los mecanismos de división celular, inmunología tumoral y factores fundamentales que intervienen en la carcinogénesis química y viral.¹

Para la obtención de compuestos con posible actividad antineoplásica, se han considerado complejos que tengan metales con toxicidad relativamente baja, y que su estado de oxidación sea similar al de los metales que se encuentran en los fluidos biológicos y que posea un número de coordinación alto.⁶ Por otro lado los ligantes deben tener la capacidad de formar quelatos y cierto grado de hidrofiliidad e hidrofobicidad. Según las características mencionadas serán las propiedades de los compuestos en términos de: solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad, ya que se pretende entre otras posibilidades, que el mecanismo de actividad sea por interacción con el ADN.^{7,8,9}

La mayor parte de los agentes antineoplásicos actúan específicamente sobre procesos como la síntesis de DNA, la transcripción o la función del huso mitótico y por ende se les considera específicos del ciclo celular.²

La razón para la búsqueda de nuevos compuestos está basada en el deseo de encontrar compuestos con:

- a) Ausencia de resistencia cruzada al cisplatino.
- b) Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
- c) Mayor efectividad clínica antitumoral.

- d)** Disminución de efectos eméticos y renales.
- e)** Sinergismo en terapias combinadas.

Aún cuando los ensayos *in vitro* poseen la gran ventaja de ser rápidos y permiten el proceso simultáneo de un gran número de muestras, constituyen solo una faceta de la compleja interacción entre huésped - tumor, en cambio los ensayos *in vivo* aunque requieren de mayor tiempo permiten no sólo detectar la actividad del fármaco mediada por el huésped y los efectos debidos a la molécula en la respuesta inmune, sino además ayuda a la obtención de índices terapéuticos.^{9,10,11,12}

Dentro de las nuevas moléculas con actividad citostática y antineoplásica tenemos a las Casiopeínas que son compuestos de coordinación con un centro metálico de cobre. La familia de las Casiopeínas contienen Cu(II) como metal y quelatos diiminas (NN) con quelatos aminoácidos o donadores (OO). Son compuestos de coordinación análogos al cisplatino, que se diseñaron considerando diferentes parámetros y propiedades químicas como son: el metal y su estado de oxidación, número de coordinación del metal, propiedades de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de las membranas y estabilidad del mismo.

De acuerdo a estudios realizados con Cisplatino se ha encontrado que los compuestos de coordinación que cumplan con los siguientes postulados tienen potencial antineoplásico:^{6,7,8}

- a)** Deben intercambiar rápidamente sólo algunos de sus ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- b)** Los complejos deben ser eléctricamente neutros.
- c)** Son necesarios dos ligantes cis monodentados (o uno bidentado) como grupo saliente. Los isómeros trans son inactivos.
- d)** Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo



específico de labilidad.

e) Los ligantes no intercambiables en las moléculas deben estar fuertemente enlazados.

Las Casiopeínas han demostrado cumplir con estos postulados además de tener un buen efecto antineoplásico en las pruebas *in vivo* que exige el panel de cernimiento sugerido por el National Cancer Institute (NCI). Dentro de las cuales se tiene: El uso de líneas tumorales murinas transplantables en cepas singénicas, determinación de dosis letal 50 (DL₅₀) y toxicidad.^{10,11,12,13,14,15,16}

Actualmente se han sintetizado 90 compuestos los cuales se han agrupado en subfamilias: Casiopeína I, Casiopeína II y Casiopeína III. Estas tres subfamilias son las que han presentado resultados favorables en estudios realizados *in vivo e in vitro*.

Para la realización del presente trabajo se seleccionó a la Casiopeína III-i, que es [Cu⁺ (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetionato)]NO₃⁻ (Figura 2). Patentado por la Dra. Lena Ruíz A.¹⁷

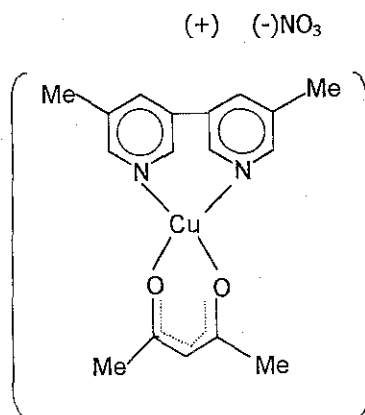


Figura 2. Estructura Química de la Casiopeína III-i

Esta molécula presenta las siguientes características:

- Su toxicidad es debida al parecer por el donador N-N y los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante, presentan las mejores sobrevividas al ser evaluada la actividad antineoplásica en la línea tumoral Leucemia L1210 y Melanoma B16 en ratones.¹¹
- Induce un efecto recombinogénico débil en *Drosophila*.¹²
- En la línea celular SPD8 (V79 mutante) demostró ser un agente altamente recombinogénico, por lo que su mecanismo de acción podría ser el de inhibición de las topoisomerasas I y II.¹²
- Su DL₅₀ aguda en ratones es de 14.6 mg/kg. por vía intraperitoneal.¹⁰
- Interacciona con el ADN lineal.¹⁸
- Tiene un pKa de 8.25 y un coeficiente de reparto de 0.01364.¹⁹

Sin embargo, es necesario llevar acabo otro tipo de estudios como: Farmacocinética y Farmacodinámia, con el fin de determinar el régimen de dosificación y margen terapéutico.

Una de las fases importantes son los estudios preclínicos en modelos animales. Para este tipo de estudios preclínicos es necesario considerar algunos factores importantes que pueden interferir en el estudio como:

- a) El tipo de animal
- b) Su edad, sexo, raza
- c) Estado de salud, enfermedades congénitas, características fisiológicas, estado nutricional, etc

Por lo tanto, es necesario conocer las características generales para seleccionar el mejor modelo animal, de esta manera se puede controlar un mayor número de variables así como hacer reproducible dicho trabajo de investigación. En este caso el animal seleccionado para el estudio fue el conejo. Algunas de las características de este animal



se describen en el Apéndice I.

1.5 PRUEBAS NO CLÍNICAS DE FÁRMACOS

Antes de que un fármaco pueda ser probado en humanos, debe pasar por una serie de pruebas de seguridad en animales de laboratorio para reducir el riesgo de toxicidad. Los estudios cortos en animales preceden siempre el inicio de estudios en humanos.²⁰

La designación, conducción, análisis e interpretación convenientes de los estudios de seguridad en animales son indispensables para lograr la introducción de una nueva entidad farmacéutica. Primero y antes que nada es determinar el poder de predicción de la prueba en animales con relación a la toxicidad en humanos, cuando el resultado en estos estudios indica serios efectos colaterales del fármaco el estudio se da por terminado o se suspende.²⁰

La Food Drug Administration (FDA) usa los datos de estos estudios para decidir si el fármaco es lo suficientemente seguro para iniciar la administración en humanos. Inicialmente alrededor de 11 estudios preclínicos, además de estudios *in vitro* e *in vivo* en animales provee información esencial para continuar los estudios clínicos y finalmente la aprobación del fármaco.

Aunque los estudios no clínicos resultan ser malos predictores de la respuesta clínica, siguen siendo los mejores modelos experimentales para medir e identificar la actividad biológica y predicción de efectos farmacológicos de fármacos.^{20,21}

Los estudios en animales se desarrollan antes y durante los estudios clínicos, el termino "no clínico" es preferible a preclínico cuando se discute el total de estudios *in vitro* y no humanos *in vivo* asociados al desarrollo de nuevos fármacos. Al estudiar las



características dosis-respuesta, efectos adversos, mecanismos de acción, sitio de acción, degradación y duración del efecto farmacológico, la FDA y el patrocinador del fármaco evalúan la probable acción y efectos del fármaco en humanos.^{20,21,22}

La FDA maneja 3 líneas principales de pruebas en estudios no clínicos para fármacos nuevos:

1. La agencia determina en cada caso que los datos de las pruebas no clínicas muestren que el fármaco es suficientemente seguro para iniciar y continuar pruebas en humanos.
2. La agencia recomienda al patrocinador del fármaco la adecuación y desarrollo de programas de pruebas antes de iniciar los estudios en animales.
3. La agencia fija los estándares mínimos para conducir las pruebas de toxicidad en el laboratorio además de la regulación de las buenas prácticas de laboratorio.^{20,21,22}

1.5.1 GUÍA FDA DE LOS REQUERIMIENTOS PARA PRUEBAS NO CLÍNICAS.

Existen dos guías donde se describen en forma muy general los requerimientos para estudios no clínicos. Una publicada en 1968 por la FDA y la otra en 1977 por la U.S Pharmaceutical Manufacturers Association (PMA).^{20,21}

A finales de los 80's y principios de los 90's, la FDA ha desarrollado guías de toxicidad y farmacológicas para estandarizar los requerimientos de las pruebas en animales para cada clase de fármacos específicos, así como, el uso de tecnologías computarizadas para el análisis de los datos no clínicos.^{20,21}

Paralelamente con la FDA la Comunidad Europea y el Japón han desarrollado también guías en esta área, las cuales son similares en principios pero

diferentes en detalles. En un esfuerzo para armonizar estas y otras pruebas las autoridades de regulación y de la Industria Farmacéutica de estas tres regiones organizaron la Confederación Internacional de Armonización (ICH).

A inicios de 1994 la FDA aceptó las recomendaciones de ICH sobre pruebas de toxicidad aguda y la duración de pruebas de toxicidad crónica en roedores. Sin embargo, las guías ICH no consideran los estudios toxicocinéticos, genotóxicos y la selección de dosis para estudios carcinogénicos.^{20,21}

Por lo que la FDA recomienda a los patrocinadores cuando se trata de casos inusuales, en los que se consideran las recomendaciones provenientes tanto de guías de FDA e ICH. Cuando el patrocinador inicia el dialogo con FDA para revisar el tipo y número de pruebas no clínicas requeridas, estas se consideran de acuerdo a factores importantes como son:^{20,21,22}

- ❖ Estructura química del fármaco y la similaridad de estructura con compuestos conocidos por la FDA de los cuales se conoce su perfil de seguridad.
- ❖ El uso propuesto del fármaco en humanos.
- ❖ Grupo de la población al que es dirigido (ancianos, infantes, mujeres, etc.).
- ❖ Características especiales del patrón de uso del fármaco (Por ejemplo el fármaco puede ser prescrito con medicación concomitante).
- ❖ La vía de administración propuesta para el fármaco.
- ❖ La propuesta de duración de la administración (usado por periodos cortos o crónicos).

1.5.2 TIPOS DE ESTUDIOS NO CLÍNICOS.

Cuando se inicia un programa de pruebas no clínicas, estas se dividen en dos tipos de estudios, los farmacológicos y toxicológicos. Estos estudios al integrarlos proveen información sobre los efectos del fármaco en varias especies animales.^{20,21,22}

A. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.

En estos se pueden observar efectos adversos, por lo que es posible influir en la dirección de los estudios de toxicidad. Los estudios farmacológicos de un nuevo fármaco se hacen en diferentes fases:^{20,21}

Cernimiento Farmacológico: Este involucra estudios *in vivo* e *in vitro* para determinar y caracterizar el compuesto con actividad farmacológica.

- ♦ **Farmacodinamia:** Una vez conocida la estructura química se inicia un complicado y completo estudio cualitativo y cuantitativo del perfil farmacológico del fármaco. Estos perfiles consisten primeramente en estudios farmacodinámicos. Estos estudios proveen información sobre la acción del fármaco sobre varios receptores o sistemas fisiológicos en animales. Los estudios farmacodinámicos deben ser tan extensos para determinar la relación dosis-respuesta, la duración y mecanismo de acción del fármaco sobre diferentes sistemas fisiológicos; por ejemplo, neurológico, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, genitourinario, endocrino, antiinflamatorio, inmunoreactivo, quimioterapéutico y enzimático.^{20,21} Es función de la farmacodinamia investigar todos los efectos primarios y secundarios relacionados y no relacionados con el efecto terapéutico, duración del efecto, toxicidad con dosis altas y efectos relacionados con otros fármacos.

- ♦ **Farmacocinética:** Generalmente estos estudios son realizados en múltiples especies. Los resultados se comparan para determinar la diferencia de la respuesta farmacológica entre especies y observar como afecta la especie para interpretar los estudios clínicos. Actualmente estos datos se consideran mucho más importantes en el aspecto preclínico del desarrollo de fármacos y son básicos para estudios posteriores de toxicocinética. Los estudios farmacocinéticos se designan de acuerdo al tipo de información que proporcionen acerca del fármaco, como absorción, distribución, metabolismo y excreción.

La metodología analítica empleada, generalmente para obtener estos datos incluye: Absorción U.V., fluorescencia, cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de gases, radioinmunoanálisis y análisis de espectroscopia de masa del fármaco inalterado y/o metabolitos en tejidos o fluidos.^{20,21}

- (a) **Estudios de absorción:** Generalmente involucra la determinación de la concentración del fármaco en sangre u orina después de una administración oral, esto indica la cantidad y velocidad de absorción del fármaco. Los parámetros que se determinan incluyen: área bajo la curva (ABC), concentración máxima (Cmax) y tiempo para alcanzar la concentración máxima (tmax). La **biodisponibilidad** (fracción del fármaco que llega a circulación sistémica) es dependiente de la cantidad absorbida, pero también es influenciada por otros factores como la cantidad de fármaco metabolizado por el hígado antes de llegar a la circulación general.

- (b) **Estudios de distribución:** Provee información sobre la extensión y tiempo de permanencia o acumulación en tejido y la eliminación del fármaco y/o sus metabolitos. Para determinar la distribución se sacrifican animales en intervalos de tiempo posteriores a la administración y se mide la concentración del fármaco y/o sus metabolitos en los tejidos seleccionados. El **volumen de distribución** representa otro parámetro que se determina en la distribución del fármaco.



(c) **Estudios de metabolismo:** La estimación y cuantificación del patrón metabólico del fármaco son esenciales para un completo conocimiento de la eficacia y toxicidad, puesto que diferentes especies pueden presentar mayor o menor toxicidad debido al metabolismo. El **aclaramiento** representa la habilidad del organismo para eliminar el fármaco. El concepto **clearance** representa la velocidad de eliminación del fármaco con relación a la concentración. El parámetro de eliminación puede determinarse para órganos individuales y la suma de todos llega a un aclaramiento total del sistema. En general una intoxicación potencial disminuye cuando se relaciona con una excreción rápida y completa.^{20,21}

B. ESTUDIOS DE TOXICIDAD.

Dependiendo de la naturaleza del fármaco, usos y los datos de estudios anteriores se determina el programa de estudios toxicológicos que pueden incluir todos o algunos de los estudios siguientes:^{20,21,22}

- ◆ Estudios de toxicidad aguda
- ◆ Estudios de toxicidad subaguda o subcrónica
- ◆ Estudios de toxicidad crónica
- ◆ Estudios de carcinogénica
- ◆ Estudios de toxicidad especial
- ◆ Estudios de toxicidad reproductiva
- ◆ Estudios de genotoxicidad
- ◆ Estudios de toxicocinética



1.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de capacidad del método cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Los métodos analíticos que presentan más dificultad para validarse son los que van a ser aplicados en fluidos biológicos debido principalmente a que las variables son más difíciles de controlar. Los parámetros a determinar para la validación son: linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, especificidad, concentración mínima cuantificable, concentración mínima detectable y estabilidad. ^{23,24,25}

PARTE EXPERIMENTAL



II PARTE EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS

La Casiopeína III-i fue sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.¹⁷

Acetaminofen

Metanol grado cromatográfico.

Heparina.

El resto de las sustancias empleadas fueron grado reactivo.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Conejos machos Nueva Zelanda con peso promedio entre 2.0 y 3.0 Kg. Sin restricción alimenticia.

2.3 EQUIPO

Cromatógrafo de Líquidos Shimadzu, con bomba isocrática (Modelo LC10AS), un detector U.V. de longitud de onda variable (Modelo SPD10AV), inyector con Loop de 50 μ L (Cotat, CA, USA) y un integrador Shimadzu (Modelo C-R501).

Columna Symetry® C₁₈, 5 μ , 4.6 x 250mm.

Precolumna security Guard Phenomenex C₁₈.

Congelador Lab-Line, (Lab-Line Instruments, INC.) Temperatura de -20 °C



2.4 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Fase móvil:

Solución A (Buffer de fosfato de sodio): Pesar 0.2177 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Lot. 3822 01, J.T Baker®) más 4.9032g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lot. 3818 01, J.T Baker®). Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y aforar con agua desionizada, ajustar el pH a 6.1 ± 0.5 con ácido fosfórico.

Solución B: Metanol grado CLAR.

Mezclar 600 mL de solución A más 400 mL de solución B. Se filtra por membrana de 0.45μ y sé desgasifica por ultrasonido.

Solución stock de estándar interno: Pesar 2.5 mg de Acetaminofen y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar al volumen con fase móvil ($25 \mu\text{g/mL}$).

Solución de trabajo del estándar interno: Tomar 1 mL de la solución stock del estándar interno y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL llevar al volumen con fase móvil ($2.5 \mu\text{g/mL}$).

Solución de Casiopeína III-i (10 mg/mL): Pesar 100 mg de Casiopeína III-i y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL adicionar 1 mL de Metanol y llevar al volumen con solución salina fisiológica.



2.5 MÉTODOS

2.5.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CASIOPEÍNA III-I EN SANGRE.

Las condiciones cromatográficas se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Casiopeína III-i en sangre de conejo.

PARAMETRO	CONDICION OPTIMA
columna	Symetry® C ₁₈ , 5μ, 4.6 x 250mm
Precolumna	Security Guard Phenomenex C ₁₈ .
Fase móvil	Metanol / PO ₄ ⁻³ pH 6.1, 0.01 M (40:60)
Flujo	0.8 mL/ min.
Longitud de onda	262nm
Volumen de inyección	100 μL, Loop de 50μL
Estándar interno	Acetaminófen (2.5μg/mL)



2.5.1.1 PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN EN SANGRE DE CONEJO.

Solución stock: Pesar 4mg de Casiopeína III-i y transferir a un matraz volumétrico de 10mL llevar al volumen de aforo con sangre de conejo (400µg/mL). En la Tabla VII se presentan las concentraciones empleadas en la curva patrón.

Tabla VII. Preparación de la curva patrón.

Volumen solución stock (mL)	Aforar con sangre (mL)	Concentración (±g/mL)
0.5	10.0	20.0
1.0	10.0	40.0
1.5	10.0	60.0
2.0	10.0	80.0
3.0	10.0	120.0

2.5.1.2 PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR CASIOPEÍNA III-i EN SANGRE DE CONEJO.

En un tubo de centrifuga heparinizado adicionar 600µL de Metanol más 200µL de sangre adicionada con Casiopeína III-i. Agitar 30 seg. en vortex.

Adicionar 50µL de ZnSO₄ al 10% más 150µL de estándar interno (Acetaminofen, concentración 2.5µg/mL en fase móvil). Agitar 30seg. en vortex.

Centrifugar a 5000rpm durante 5min. Separar el sobrenadante e inyectar 100 µL al cromatógrafo. En la Figura 3 se muestra el diagrama de extracción de la Casiopeína III-i.



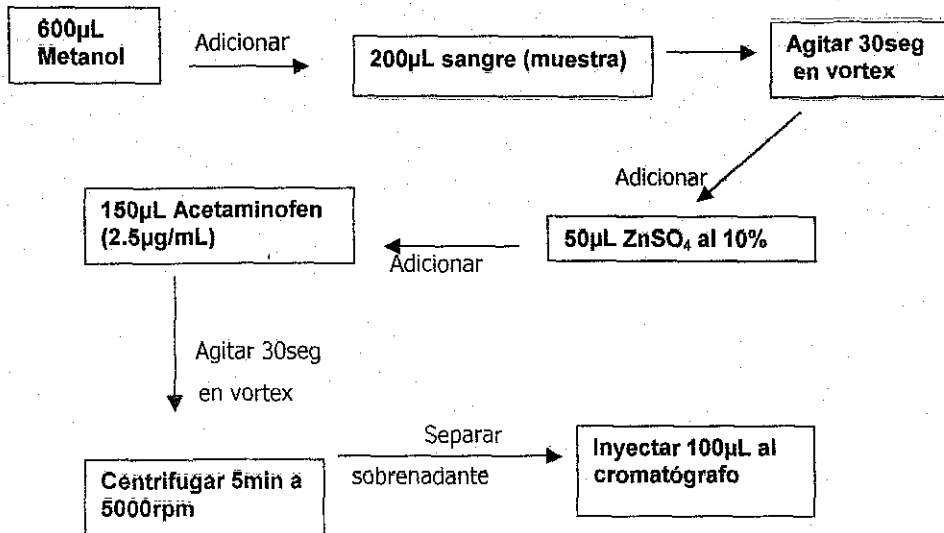


Figura 3. Diagrama de extracción de Casiopeína III-i en sangre de conejo.



2.5.2 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CASIOPEÍNA III-i EN SANGRE.

2.5.2.1 Especificidad. ^{23,24,25}

La especificidad del método se determinó evaluando que ninguno de los componentes endógenos de la sangre interfirieran con el tiempo de retención de la Casiopeína III-i.

2.5.2.2 Linealidad del Sistema. ^{23,24,25}

Para determinar la linealidad del sistema se prepararon 3 curvas patrón de Casiopeína III-i en Metanol en el intervalo de concentración de 20 a 120 $\mu\text{g/mL}$. Se graficó la relación de áreas de la Casiopeína III-i entre el estándar interno contra la concentración, a fin de determinar si los datos se ajustan a un modelo de regresión lineal simple descrito por la ecuación (1).

$$y = mx + b \dots\dots(1)$$

Donde:

y = Relación de áreas de la Casiopeína III-i entre el estándar interno. (RA)

x = Concentración de Casiopeína III-i

m = Pendiente

b = Ordenada al origen



Los estimados de m y b se calcularon utilizando el método de mínimos cuadrados con las ecuaciones (2) y (3).

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \dots (2)$$

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n} \dots (3)$$

Se determinó la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$), coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de determinación (r^2) con las ecuaciones (4), (5) y (6) respectivamente.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n-2}} \dots (4)$$

$$CV = \frac{S_{y/x}}{\sum y} \times 100 \dots (5)$$

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)} \dots (6)$$



Para demostrar estadísticamente que la respuesta es lineal se realizó un análisis de varianza, este se describe en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Análisis de Varianza del modelo $y = mx + b$

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{CAL}
Regresión	$gl_R = 1$	$SC_R = m \sum xy + b \sum y - \frac{(\sum y)^2}{n}$	$MC_R = SC_R$	$\frac{MC_R}{MC_{ER}}$
Error de Regresión	$gl_{ER} = n - 2$	$SC_{ER} = \sum y^2 - m \sum xy - b \sum y$	$MC_{ER} = \frac{SC_{ER}}{gl_{ER}}$	
Falta de ajuste	$gl_{FA} = gl_{ER} - gl_{EP}$	$SC_{FA} = SC_{ER} - SC_{EP}$	$MC_{FA} = \frac{SC_{FA}}{gl_{FA}}$	$\frac{MC_{FA}}{MC_{EP}}$
Error puro	$gl_{EP} = c(r - 1)$	$SC_{EP} = \sum y^2 - \frac{\sum y_i^2}{r}$	$MC_{EP} = \frac{SC_{EP}}{gl_{EP}}$	

Donde:

c = número de niveles de concentración de la Casiopeína III-i.

r = número de inyecciones de cada concentración.

y_i = total del RA a cada nivel de concentración.



2.5.2.3 Linealidad del Método^{23,24,25}

La linealidad del método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Para su determinación se prepararon 3 curvas de Casiopeína III-i en sangre de conejo, de acuerdo con el método descrito en la sección 2.5.1.2, en el intervalo de concentración de 20 a 120 µg/mL. Se graficó la relación de áreas de la Casiopeína III-i entre el estándar interno contra la concentración, a fin de determinar si los datos se ajustan a un modelo de regresión lineal simple.

Se determinó la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$), coeficiente de variación (CV) y el coeficiente de determinación (r^2).

Para demostrar estadísticamente que la respuesta es lineal se realizó un análisis de varianza.

La prueba de hipótesis para la ordenada al origen se calculó con la ecuación (7)

Ho: $b = \beta$

Hi: $b \neq \beta$

Donde: $\beta = 0$

$\alpha = 0.05$

$$t_{cal} = \frac{(b - \beta)}{S_{y-x} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (\sum x - \bar{x})^2}}} \dots\dots(7)$$



La estimación del intervalo de confianza para la ordenada al origen (b) al 95 % se calculó con la ecuación (8).

$$b - t_{0.975, n-2} S_b \leq \beta \leq b + t_{0.975, n-2} S_b \quad \dots(8)$$

Donde:

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\sum x/n)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

La prueba de hipótesis para la pendiente se calculó con la ecuación (9)

Ho: $m = \delta$

Hi: $m \neq \delta$

Donde: $\delta = 1$

$\alpha = 0.05$

$$t_{cal} = \frac{(m - \delta)(S_m)\sqrt{n-1}}{S_{y/x}} \quad \dots\dots(9)$$



La estimación del intervalo de confianza para la pendiente (m) al 95 % se calculó con la ecuación (10).

$$m - t_{0.975, r-2} S_m \leq \delta \leq m + t_{0.975, r-2} S_m \dots (10)$$

Donde:

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

2.5.2.4 Precisión del Método (Repetibilidad y Reproducibilidad).^{23,24,25}

La repetibilidad se evaluó en un solo día bajo condiciones idénticas de analista y equipo. Una concentración conocida de 60 µg/mL se inyectó por sextuplicado. Se determinó la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

La reproducibilidad se evaluó en dos días de trabajo, variando solo el analista y conservando las condiciones de equipo y laboratorio. Se prepararon 3 curvas patrón de Casiopeína III-i en sangre por cada analista.

El modelo que representa la relación entre la variable de respuesta y factores bajo estudio (analista / día) se presenta en la ecuación (11)



$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)} \quad \dots(11)$$

Donde:

y_{ijk} = RA de la Casiopeína de la k-ésima muestra, del j-ésimo día por el i-ésimo analista.

μ = media general

α_i = efecto del analista (reproducibilidad interanalista).

$i = 1, \dots, a$ (en este caso $a = 2$)

$\delta_{j(i)}$ = efecto del día anidado en el analista (reproducibilidad intra-analista o interdía o interanálisis).

$j = 1, \dots, d$ (en este caso $d = 2$)

$\varepsilon_{k(ij)}$ = error experimental o error asignable al método (repetibilidad).

$k = 1, \dots, r$ (en este caso $r = 3$).

Para determinar si los factores de variación afectan a la variable de respuesta se realizó un análisis de la varianza, este se describe en la Tabla IX.

Tabla IX. Análisis de Varianza del modelo $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{CAL}
α_i	$gl_\alpha = a - 1$	$SC_\alpha = \frac{\sum y_{i..}^2}{dr} - \frac{y_{...}^2}{adr}$	$MC_\alpha = \frac{SC_\alpha}{gl_\alpha}$	$\frac{MC_\alpha}{MC_\varepsilon}$
$\delta_{j(i)}$	$gl_\delta = a(d - 1)$	$SC_\delta = \frac{\sum \sum_i y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{dr}$	$MC_\delta = \frac{SC_\delta}{gl_\delta}$	$\frac{MC_\delta}{MC_\varepsilon}$
$\varepsilon_{k(ij)}$	$gl_\varepsilon = ad(r - 1)$	$SC_\varepsilon = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r}$	$MC_\varepsilon = \frac{SC_\varepsilon}{gl_\varepsilon}$	

Donde:

$y_{...}$ = suma total de RA.

$y_{i..}$ = suma de RA del i-ésimo analista.

$y_{ij.}$ = suma de RA de la combinación del i-ésimo analista y j-ésimo día.

a = Analista.

d = Día.

r = Repetición.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El coeficiente de variación total se calculó con la ecuación (12).

$$CV_T = \frac{\sqrt{\frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{y_{...}^2}{adr}}{adr-1}}}{\frac{y_{...}}{adr}} \times 100 \quad \dots(12)$$

2.5.2.5 Exactitud. ^{23,24,25}

La exactitud del método también conocida como error sistemático se determinó preparando 3 curvas de Casiopeína III-i en sangre en el intervalo de concentración de 20 a 120 µg/mL. Al mismo tiempo se prepararon 3 curvas estándar en metanol a las mismas concentraciones y se determinó el rendimiento en la extracción a cada concentración. Se calculó la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.2.6 Límite de detección y cuantificación. ^{23,24,25}

Los valores de límite de detección y de cuantificación se determinaron por curva de regresión.

Se prepararon 3 curvas de Casiopeína III-i en sangre en el intervalo de concentración de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$.

2.5.2.7 Estabilidad. ^{23,24,25}

Una muestra de sangre de conejo adicionada con Casiopeína III-i a una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$, se mantuvo en condiciones de congelación (-20°C) y temperatura ambiente con luz y sin luz. Se analizó la muestra a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después de la preparación.

2.5.3 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FARMACOCINÉTICA DE CASIOPEÍNA III-i.

Se empleó 1 conejo macho Nueva Zelanda con peso de 2.5 kg.

- a) Se rasuró la zona de la oreja, para localizar la vena marginal. Una vez localizada la vena se le colocó el catéter del equipo de venoclisis.
- b) Se administró solución salina fisiológica para verificar que no exista filtración.
- c) La dosis administrada fue de 10mg/kg. Se pesó 25 mg de Casiopeína III-i y se disolvió en 30 mL de una mezcla de solución salina fisiológica-Metanol (10:1).
- d) La administración se realizó por infusión lenta (0.5 mL/min.). El tiempo de administración fue de 60 min.



- e) Se tomaron muestras antes durante y después de la administración: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 140, 160, 180, 210, 240, 270 y 300 min.
- f) El volumen de muestra tomado fue de 0.5 ml de sangre.
- g) Las muestras se trataron según el procedimiento descrito en la Figura 3.

2.5.4 ESTUDIO PRECLINICO PARA DETERMINAR LOS PARAMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LA CASIOPEÍNA III-i.

Se emplearon diez conejos machos Nueva Zelanda con peso promedio entre 2.0 y 3.0 kg.

- a) A cada uno de ellos se les rasuro la zona de la oreja, para localizar la vena marginal. Una vez localizada la vena se le colocó el catéter del equipo de venoclisis.
- b) Se administró solución salina fisiológica para verificar que no exista filtración.
- c) La dosis administrada fue de 10mg/kg, preparada en 30 mL de solución salina fisiológica - Metanol (10:1).
- d) La administración se realizo por infusión lenta (0.5mL/min.). El tiempo de administración fue de 60 min.
- e) Se tomaron muestras en los siguientes tiempos: 80, 90, 100, 110, 120, 140, 160, 180, 210, 240, 270 y 300 min.
- f) El volumen de muestra tomado fue de 0.5ml de sangre.
- g) Las muestras se trataron según el procedimiento descrito en la Figura 3.



2.5.5 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: Concentración sanguínea en el estado estacionario (C_{see}), área bajo la curva de 80 a 300m min (ABC_{0-t}), área bajo la curva de cero al infinito ($ABC_{0-\infty}$), constante de eliminación (K_{el}), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), tiempo medio de residencia (TMR), volumen de distribución aparente (V_d) y depuración (Cl). Estos se determinaron empleando el paquete estadístico Winnonlin Professional versión 1.5, Scientific Consulting INC.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



III RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

3.1 VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CASIOPEÍNA III-i EN SANGRE.

La validación del método analítico es fundamental para el desarrollo de cualquier estudio preclínico, ya que durante esta secuencia de pruebas y análisis es donde se evalúa si el método cumple con los propósitos para cuales fue diseñado además de ser confiable. Los criterios para la validación del método analítico, se basaron en los lineamientos y recomendaciones de diferentes organismos internacionales.^{23,24,25} Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

3.1.1 Especificidad.

Antes que nada, se debe demostrar la especificidad del método, con el fin de establecer si existen interferencias debidas a sustancias endógenas en la muestra biológica. En las Figuras 4 y 5 se presentan los cromatogramas correspondientes al blanco de sangre y una muestra adicionada con Casiopeína III-i respectivamente, en las cuales se observa que no existe interferencia en las respuestas cromatográficas de la Casiopeína III-i y el estándar interno con las sustancias endógenas de la sangre. El tiempo de retención para la Casiopeína III-i fue 10.1 min y del Acetaminofen fue 3.9 min., de aquí, que se consideró que el método es específico.



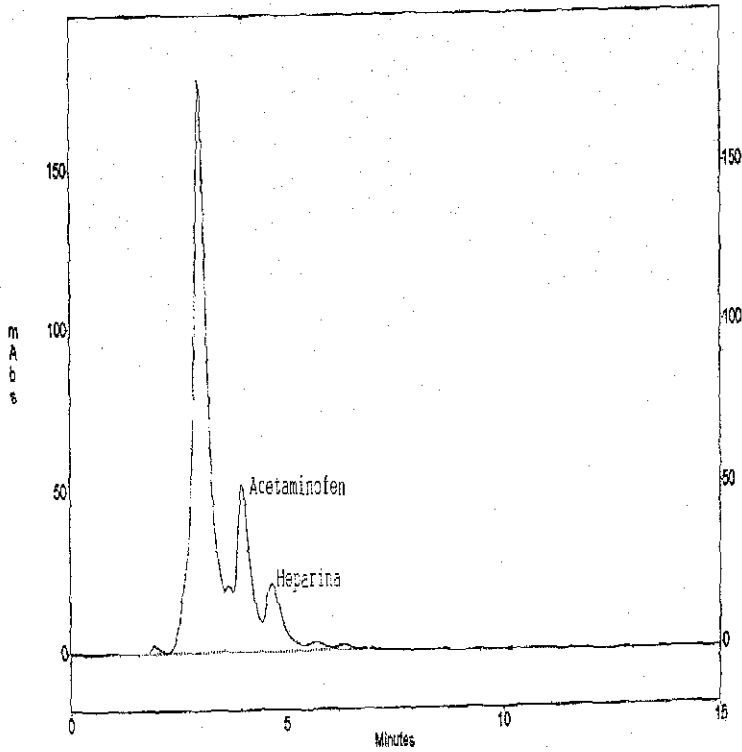


Figura 4. Muestra de sangre con el proceso de extracción (Blanco).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

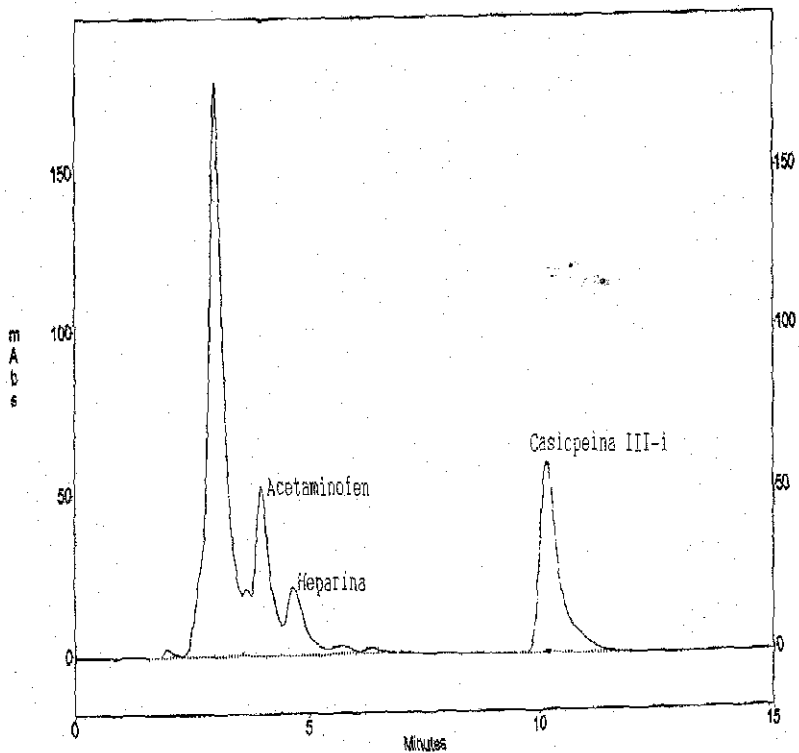


Figura 5. Muestra adicionada con Casiopeina III-i.



3.1.2 Linealidad del sistema.

En la Tabla X se muestran los resultados obtenidos a partir de tres curvas de calibración en Metanol. Y en la Figura 6 la gráfica correspondiente.

Tabla X. Linealidad del sistema para cuantificar Casiopeína III-i.

Concentración (µg/mL)	Relación de áreas del analito entre Estándar interno			Promedio	Parámetro
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
20	2.0665	2.0678	2.0726	2.0690	m = 0.0885
40	3.7401	3.7270	3.7412	3.7361	b = 0.2856
60	5.6132	5.6195	5.5729	5.6019	S _{xy} = 0.1356
80	7.3688	7.3391	7.3552	7.3544	r ² = 0.9982
120	10.8092	10.8736	10.8349	10.8392	C.V. = 2.2791

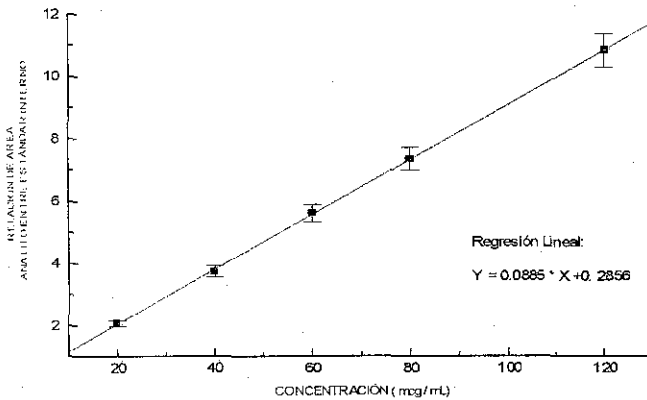


Figura 6. Linealidad del sistema analítico por CLAR para cuantificar Casiopeína III-i.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La curva promedio obtenida para la cuantificación de Casiopeína III-i presentó una linealidad satisfactoria en el rango de concentración de 20 a 120 µg/ mL con una pendiente de 0.0885, intercepto de 0.2856 y coeficiente de determinación de 0.9982.

El análisis de varianza del modelo de regresión lineal simple para la linealidad del sistema de Casiopeína III-i se presenta en la Tabla XI. Donde se observo que la relación de áreas del analito entre el estándar interno y la concentración tienen una relación lineal, ya que $P(F_{cal}) > 0.01$.

Tabla XI. Análisis de Varianza del modelo $y = 0.0885x + 0.2856$

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F_{cal}	$P(F_{cal})$
Regresión	1	139.0940	139.094	7565.31	3.0343E-7
Error de regresión	13	0.239015	0.0184	2.1243	0.1604
Falta de ajuste	3	0.0930	0.0310		
Error puro	10	0.1460	0.0146		

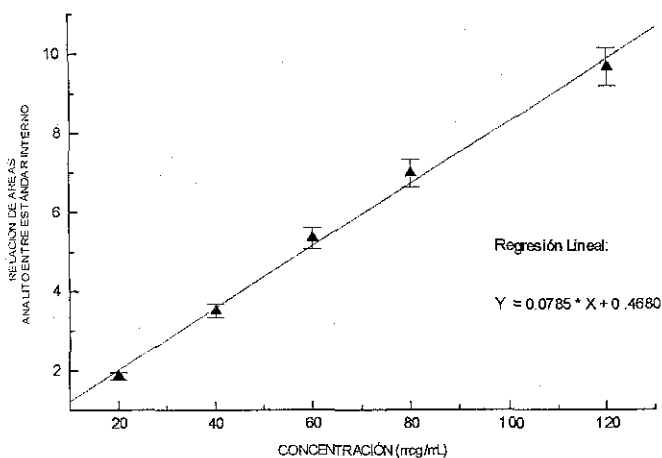


3.1.3 Linealidad del método

Los resultados obtenidos de las tres curvas en sangre de conejo se presentan en la Tabla XII y la grafica correspondiente en la Figura 7.

Tabla XII. Linealidad del método para cuantificación de Casiopeína III-i en sangre.

Concentración (µg/mL)	Relación de áreas del analito entre Estándar interno			Promedio	Parámetro
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
20	1.8242	1.8753	1.8654	1.8550	m = 0.0785
40	3.6015	3.5770	3.5902	3.5896	b = 0.4680
60	5.2748	5.3440	5.4094	5.3427	$S_{xy} = 0.1994$
80	6.9966	6.9043	7.0628	6.9879	$r^2 = 0.9952$
120	9.6987	9.7083	9.6236	9.6769	C.V = 3.6325



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Linealidad del método analítico por CLAR para cuantificar Casiopeína III-I en sangre de conejo.



El análisis de varianza del modelo de regresión lineal simple para la linealidad del método de Casiopeína III-i en sangre se presenta en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Análisis de Varianza del modelo $y = 0.0785x + 0.4680$

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F_{cal}	$P(F_{cal})$
Regresión	1	109.3720	109.3720	2749.73	7.2085E-8
Error de regresión	13	0.5171	0.0398		
Falta de ajuste	3	0.4893	0.1631	58.6503	2.2990E-5
Error puro	10	0.02781	0.0029		

La curva promedio obtenida para la cuantificación de Casiopeína III-i en sangre presentó una linealidad satisfactoria en el rango de concentración de 20 a 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una pendiente de 0.0785, intercepto de 0.4680 y coeficiente de determinación de 0.9952. Presento un coeficiente de variación de 3.6325 % el cual es aceptable, para métodos analíticos en fluidos biológicos.

Del análisis de varianza se observó que la relación de áreas del analito entre el estándar interno y la concentración tienen una relación lineal, ya que $P(F_{cal}) > 0.01$.

Los resultados obtenidos en la prueba de hipótesis para la ordenada al origen fueron los siguientes:

$$t_{calculada} = 4.3038$$

$$t_{tablas} = 1.7709$$



Por lo que se puede decir que existe evidencia estadísticamente significativa para aceptar la hipótesis nula ($H_0: b = 0$).

El intervalo de confianza al 95 % para la ordenada al origen fue:

$$0.2331 \text{ FR} < \beta < 0.7030 \text{ FR}$$

Los resultados obtenidos en la prueba de hipótesis para la pendiente fueron los siguientes:

$$t_{\text{calculada}} = 615.7740$$

$$t_{\text{tablas}} = 1.7709$$

Por lo que se puede decir que existe evidencia estadísticamente significativa para aceptar la hipótesis nula ($H_0: m = 1$).

El intervalo de confianza al 95 % para la pendiente fue:

$$0.0752 \mu\text{g/mL/FR} < \delta < 0.0817 \mu\text{g/mL/FR}$$



3.1.4 Precisión del método (Repetibilidad y Reproducibilidad).

REPETIBILIDAD:

En la Tabla XIV se muestran los resultados de repetibilidad para la concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla XIV. Repetibilidad de Casiopeína III-I . (concentración 60 $\mu\text{g/mL}$)

Inyección	Relación de áreas del analito entre estándar interno
1	4.9609
2	5.1084
3	5.1918
4	5.0845
5	4.9180
6	5.1084
Promedio	5.0527
Desv. Estándar	0.1003
C.V	1.9798

El método analítico fue repetible, Dado que el coeficiente de variación para las seis inyecciones es menor al 2 %.

REPRODUCIBILIDAD:

En la Tabla XV y XVI se resumen los resultados de analizar 3 curvas de calibración en dos días diferentes y dos analistas diferentes.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Tabla XV. Reproducibilidad de Casiopeína III-i Analista 1.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Primer Día			Segundo Día			Promedio	Desv. Estd.	C.V
	FR 1	FR 2	FR 3	FR 1	FR 2	FR 3			
20	1.8242	1.8753	1.8654	1.8535	1.8824	1.8985	1.8666	0.0257	1.3792
40	3.6015	3.5770	3.5902	3.5833	3.6500	3.6035	3.6009	0.0261	0.7256
60	4.2748	5.3440	5.4094	5.2912	5.5522	5.4132	5.3808	0.1018	1.8928
80	6.9966	6.9643	7.0628	6.8532	6.5532	7.0927	6.9205	0.1985	2.8686
120	9.6887	9.9083	9.8623	9.9938	9.7503	9.9582	9.8603	0.1194	1.2107

FR= Factor de respuesta área estándar/ estándar interno.

Tabla XVI. Reproducibilidad de Casiopeína III-i Analista 2.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Primer Día			Segundo Día			Promedio	Desv. Estd.	C.V
	FR 1	FR 2	FR 3	FR 1	FR 2	FR 3			
20	1.8899	1.8269	1.8122	1.8027	1.8430	1.8550	1.8383	0.0318	1.7275
40	3.6407	3.6434	3.6987	3.9567	3.6679	3.5896	3.6995	0.1310	3.5416
60	5.2122	5.3986	5.3873	5.7233	5.3327	5.3427	5.3995	0.1719	3.1838
80	7.0756	7.0853	7.1750	7.0987	7.1119	6.9879	7.0891	0.0607	0.8564
120	10.0564	10.0523	10.0565	10.0676	1.0551	9.9979	10.0476	0.0249	0.2480

FR= Factor de respuesta área estándar/ estándar interno.

En la Tabla XVII se muestra el análisis de varianza para la reproducibilidad del método analítico.



Tabla XVII. Análisis de Varianza del modelo $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{cal}	P(F _{cal})
Analista	1	0.0010	0.0010	0.0589	0.8224
Día	2	0.0354	0.0177	0.8634	0.5396
Error del Método	8	0.1642	0.0205		

Al comparar los resultados (relación de áreas) entre dos analistas dos días diferentes, ninguno de los coeficientes de variación fue mayor a 10 % y el coeficiente global fue de 2.5058 % por lo que el método es reproducible. De igual forma, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre analistas y entre días al aplicar el análisis de varianza de dos vías.

3.1.5 Exactitud del método.

En la Tabla XVIII se muestran los valores de la cantidad recuperada de tres curvas adicionadas con Casiopeína III-i. Y en la Tabla XIX se presenta el porcentaje recuperado promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.



Tabla XVIII. Cantidades Recuperadas de tres curvas adicionadas con Casiopeína III-i.

CA ($\mu\text{g/mL}$)	CR 1 ($\mu\text{g/mL}$)	CR 2 ($\mu\text{g/mL}$)	CR 3 ($\mu\text{g/mL}$)
20	17.8487	18.1767	18.3594
40	37.4799	38.2368	37.7091
60	56.8625	59.8245	58.2471
80	74.5894	71.1847	77.3074
120	110.2314	107.4680	109.8274

CA = Concentración adicionada.

CR = Concentración Recuperada.

Tabla XIX. Porciento Recuperado promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de tres curvas adicionadas con Casiopeína III-i.

% Recuperado promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación
90.6412	1.2938	1.4274
94.5215	0.9704	1.0267
97.1856	2.4701	2.5416
92.9506	3.8347	4.1255
90.9797	1.2438	1.3671

De acuerdo con la Tabla XIX se observa que el porciento de recobro promedio esta entre 90.6412 y 97.1856 % con un coeficiente de variación entre 1.0267 y 4.1255 %, por lo que se puede considerar adecuado para la determinación de Casiopeína III-i en sangre para el estudio preclínico.



3.1.6 Limite de detección y Limite de cuantificación.

Los limites de detección y cuantificación se determinaron por curva de regresión, en la Tabla XX se muestran la relación de áreas del analito entre el estándar interno de tres curvas adicionadas con Casiopeína III-i, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla XX. Relación de áreas de tres curvas adicionadas con Casiopeína III-i para determinar LDD y LDC.

Concentración. ($\mu\text{g/mL}$)	RA 1	RA 2	RA 3	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
5	0.5025	0.4937	0.5102	0.5021	0.0083	1.6442
10	0.8582	0.8605	0.8597	0.8595	0.0012	0.1359
15	1.3227	1.3585	1.3820	1.3544	0.0299	2.2048
20	1.8242	1.8753	1.8654	1.8550	0.0271	1.4610

RA = Relación de áreas del analito entre el estándar interno.

Se considero la curva de calibración de la linealidad del método representada por la ecuación $y = 0.0785x + 0.4680$, y se calculo la respuesta a concentración cero, esta fue $Y_{bl} = 0.4680$.

Se determino la desviación estándar de la respuesta a concentración cero, efectuando el análisis de regresión tomando la concentración como x y la desviación estándar como y, la recta calculada fue: $y = 0.0063x + 0.0357$.

La desviación estándar a concentración cero fue $S_{bl} = 0.0357$.



Los límites de detección y cuantificación se calcularon con las ecuaciones (13) y (14) respectivamente:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{m} \dots\dots(13)$$

$$LDC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{m} \dots\dots(14)$$

Al sustituir y calcular se obtuvo:

$$LDD = 1.6776 \mu\text{g/mL}$$

$$LDC = 5.0836 \mu\text{g/mL}$$

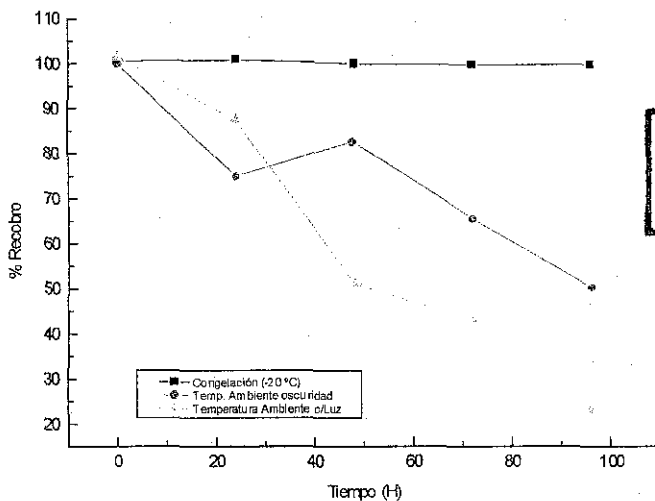
3.1.7 Estabilidad.

En la Tabla XXI se muestran los datos de estabilidad de la muestra sanguínea mantenida en condiciones de congelación (-20°C), temperatura ambiente con luz y en oscuridad . Y en la Figura 8 la gráfica de la estabilidad de Casiopeína III-i (concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$)



Tabla XXI. Estabilidad de Casiopeína III-i. (concentración 80 µg/mL)

Tiempo (h)	% de Recobro		
	Refrigeración (4°C)	Temperatura ambiente (oscuridad)	Temperatura ambiente (con luz)
0	100.52	99.87	101.52
24	100.89	75.05	87.60
48	99.97	82.72	51.12
72	99.77	65.57	42.89
96	99.85	50.24	23.13
Promedio	100.20	74.69	61.25
Desv. Estd	0.4845	18.5716	32.4378
C.V.	0.4835	24.8649	52.9579



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 8. Estabilidad de Casiopeína III-i en condiciones de Congelación, Temperatura ambiente en oscuridad y Temperatura ambiente con luz (concentración 80 µg/mL).



De los resultados obtenidos se puede observar que la muestra extraída y mantenida a temperatura ambiente con exposición a la luz se degradó en un 76.9 % a las 96 h y la muestra protegida de la luz a temperatura ambiente se degradó hasta un 50.8 %, mientras que la muestra mantenida en congelación solo se degradó un 0.15 % en 96 h. Con ello se encontró que las muestras deben mantenerse en congelación y protegidas de la luz, y que es preferible analizarlas dentro de las 96 h después de ser extraídas para asegurar su estabilidad.

Con base en los resultados anteriores se consideró que el método utilizado para la cuantificación de Casiopeína III-i en sangre es adecuado para el estudio de Farmacocinética.

3.2 Estudio preliminar de Farmacocinética de Casiopeína III-i.

En la Tabla XXII se presentan las concentraciones sanguíneas encontradas durante y después de una administración de Casiopeína III-i por infusión intravenosa. Y en la Figura 9 la gráfica correspondiente a la Farmacocinética del fármaco.



Tabla XXII. Concentraciones sanguíneas de Casiopeína III-i. Estudio Preliminar

Tiempo (min.)	Conc. Sanguínea ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (min.)	Conc. Sanguínea ($\mu\text{g/mL}$)
5	16.5509	100	89.6179
10	17.6797	110	72.6733
20	43.8964	120	65.7797
30	41.3250	140	44.1479
40	80.0998	160	30.1479
50	91.2092	180	21.1990
60	120.6638	210	NC
70	120.4884	240	NC
80	119.0464	270	NC
90	117.1864	300	NC

NC= No cuantificable.

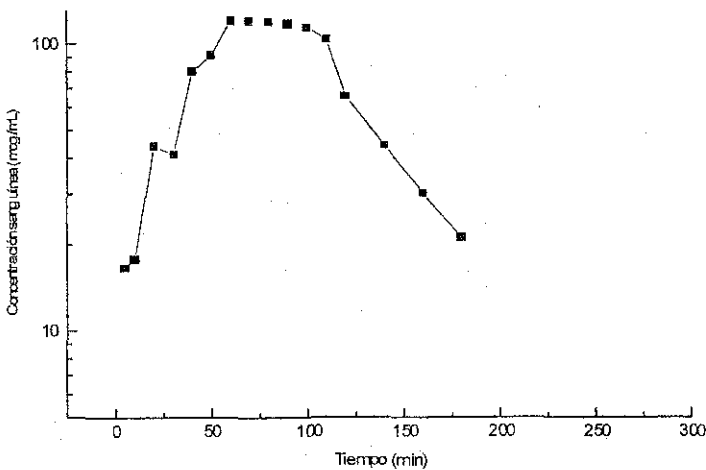


Figura 9. Perfil Farmacocinético de Casiopeína III-i, después de una administración por infusión intravenosa. ($K_0 = 416.67 \mu\text{g/min.}$)



En este caso en que la velocidad de entrada del fármaco al torrente sanguíneo se realiza de acuerdo a un proceso cinético de orden cero, con una administración continua a velocidad constante ($K_0 = 416.67 \mu\text{g}/\text{min.}$), y cuando la velocidad de eliminación desde el sistema es de tipo exponencial, el fármaco tiende a alcanzar un estado estacionario de equilibrio. En este estado estacionario la velocidad de eliminación es igual a la velocidad de entrada del fármaco^{43,44}. Este modelo se puede representar por el esquema descrito en la Figura 10. Y las ecuaciones para determinar los parámetros farmacocinéticos a partir de este modelo se describen en el apéndice II

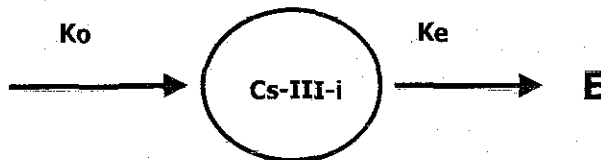


Figura 10. Esquema que describe el modelo farmacocinético de una administración por Infusión Intravenosa

En la Tabla XXIII se muestran los resultados obtenidos para los parámetros farmacocinéticos en el estudio preliminar.



Tabla XXIII. Parámetros Farmacocinéticos de Casiopeína III-i. Estudio preliminar.

Parámetro	Resultado
Peso del Conejo	2.5 kg.
Dosis administrada	25 mg.
K_0	416.67 $\mu\text{g}/\text{min}$.
ABC'_0	13079.83 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$.
ABC^∞_0	20014.53 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$.
Csee	120.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
K_e	0.0148 min^{-1} .
$t_{1/2}$	46.83 min.
Vd	219.3 mL.
Cl	1.91 mL/min.
TMR	88.88 min.

Basándose en estos resultados y a la gráfica de concentración sanguínea versus tiempo en donde se observa que la fase terminal de la curva es a partir de 80 min. aproximadamente, se determinan los parámetros Farmacocinéticos de la Casiopeína III-i en 10 conejos.



3.3 Farmacocinética de Casiopeína III-i.

En las Tablas XXIV y XXV se muestran los resultados de las concentraciones sanguíneas encontradas después de una administración por infusión intravenosa de 10 conejos. Y en las Figuras 11 y 12 las gráficas correspondientes a los perfiles farmacocinéticos.

Tabla XXIV. Datos de concentración sanguínea del conejo 1 al 5.

Tiempo (min)	Concentración sanguínea (µg/mL)				
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5
80	116.1022	120.8526	119.1360	111.7257	119.5480
90	105.7892	97.1445	110.5367	103.7881	117.1510
100	98.3970	87.1900	89.2565	82.3571	119.0592
110	75.5027	69.3229	P	69.3010	77.1739
120	76.9566	47.7080	54.8551	56.2530	61.1778
140	31.5659	28.1598	46.7487	43.0412	51.8962
160	26.2693	20.2609	31.3251	22.7257	24.4343
180	NC	P	22.5589	NC	NC
210	20.7621	21.3968	NC	NC	NC
240	NC	NC	NC	NC	NC
270	NC	NC	NC	NC	NC
300	NC	NC	NC	NC	NC

P= datos perdidos.

NC= No cuantificable.



Tabla XXV. Datos de concentración sanguínea del conejo 6 al 10.

Tiempo (min)	Concentración sanguínea (µg/mL)				
	Conejo 6	Conejo 7	Conejo 8	Conejo 9	Conejo 10
80	115.8505	120.0774	117.5308	112.1586	120.0513
90	116.9868	113.5542	115.2733	72.0731	P
100	110.5446	P	106.2621	62.6243	109.9395
110	84.9684	107.4889	110.2570	55.9329	91.7501
120	81.1844	97.6393	P	51.8275	76.5939
140	68.5479	75.9336	98.2365	P	79.3825
160	47.0844	88.0388	34.6957	52.2589	61.0790
180	NC	48.7761	21.3654	42.9128	48.5982
210	NC	43.8131	NC	39.9122	34.4262
240	NC	23.8873	NC	31.3226	38.4098
270	NC	NC	NC	21.9162	NC
300	NC	NC	NC	NC	NC

P= datos perdidos.

NC= No cuantificable.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

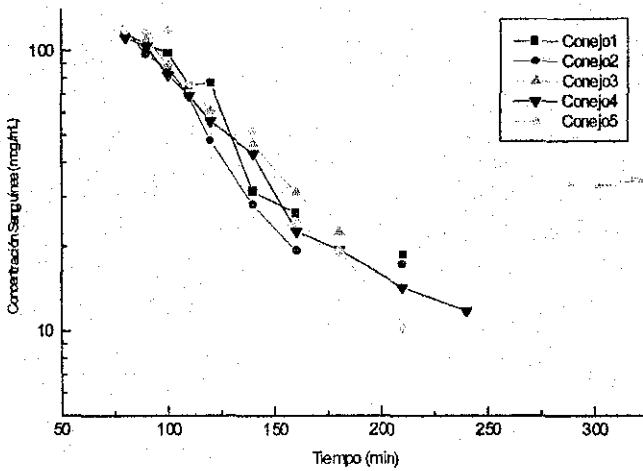


Figura 11. Perfil Farmacocinético de Casiopeína III-i, después de una administración por Infusión Intravenosa. Fase terminal conejos 1 a 5.

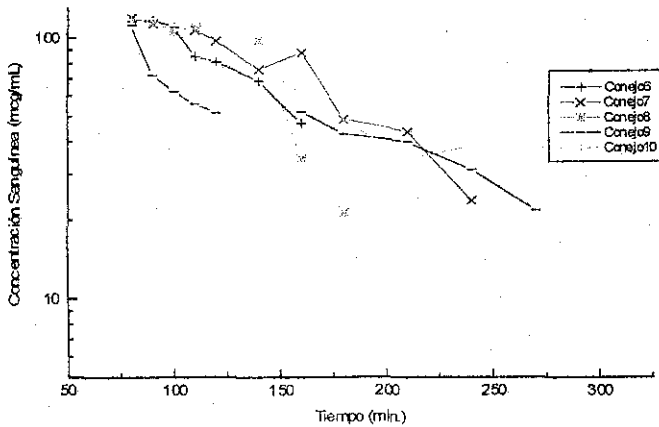


Figura 12. Perfil Farmacocinético de Casiopeína III-i, después de una administración por Infusión Intravenosa. Fase terminal conejos 6 a 10.



En la Tabla XXVI se muestran los datos de concentración sanguínea promedio \pm desviación estándar y el coeficiente de variación. En la Figura 13 se observa el perfil farmacocinético de la Casiopeína III-i promedio \pm desviación estándar.

Tabla XXVI. Datos de concentración plasmática promedio \pm desviación estándar y coeficiente de variación.

Tiempo (min)	Conc. Sanguínea promedio ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE	Coefficiente de variación (%)
80	117.3033 \pm 3.2901	2.8048
90	105.8108 \pm 14.3299	13.5429
100	96.1813 \pm 17.5768	18.2746
110	82.4109 \pm 18.0882	21.9488
120	67.1318 \pm 16.6968	24.8713
140	58.1680 \pm 23.6792	40.7082
160	40.7172 \pm 21.6284	53.1186
180	33.8034 \pm 14.4088	42.6254
210	32.0621 \pm 10.5681	32.9613
240	31.2066 \pm 7.2619	23.2706
270	21.9162 \pm NC	NC
300	NC	NC

NC= No cuantificable.

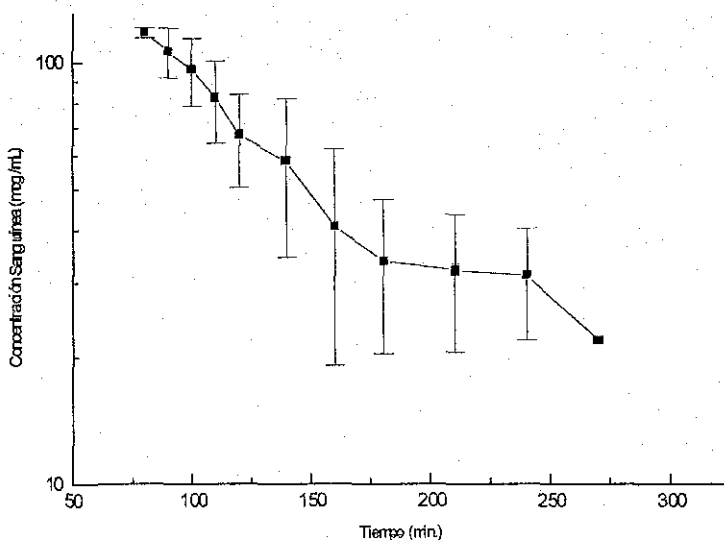


Figura 13. Perfil Farmacocinético de Casiopeína III-i promedio. Datos de la fase terminal después de una administración por infusión intravenosa.

La Tabla XXVII muestra los parámetros farmacocinéticos obtenidos para cada uno de los conejos y en la Tabla XXVIII los parámetros promedio \pm desviación estándar y coeficiente de variación, estos fueron obtenidos con la ayuda del programa Winnonlin Professional versión 1.5, Scientific Consulting INC.



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Tabla XXVII. Datos de los parámetros Farmacocinéticos para Casiopeína III-i de cada uno de los conejos.

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	Conejo 6	Conejo 7	Conejo 8	Conejo 9	Conejo 10
Peso (kg.)	2.5	2.8	3.2	2.6	3.1	2.2	2.8	3.2	3.1	3.8
Dosis admon (mg.)	25	28	32	26	31	22	28	32	22	38
ABC_{80}^i ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min.}$)	12544.68	12128.84	12031.75	10615.79	11848.19	13150.60	18618.42	14184.55	16909.13	18550.90
ABC_{80}^{co} ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min.}$)	20551.73	21875.02	19123.18	16039.37	17384.49	19373.30	29946.48	20305.94	34999.23	32039.81
C _{5sec} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	116.10	120.85	119.14	111.73	119.58	116.99	120.08	117.53	112.16	120.05
Ke (min^{-1})	0.0145	0.0124	0.0168	0.0206	0.0216	0.0188	0.0106	0.0192	0.0062	0.0089
$t_{1/2}$ (min.)	47.92	55.91	41.24	33.61	32.14	36.79	65.67	36.07	112.39	77.49
Vd (mL)	187.31	222.18	226.84	190.40	202.05	141.80	180.19	191.64	216.18	269.50
Cl ($\text{mL}/\text{min.}$)	1.99	2.31	2.66	2.45	2.62	1.67	1.50	2.26	1.30	2.05



Tabla XXVIII. Parámetros Farmacocinéticos promedio \pm D.E y coeficiente de variación.

Parámetro	Promedio \pm D.E	Coefficiente de variación
Peso (kg.)	2.93 \pm 0.45	15.35
Dosis administrada (mg.)	29.30 \pm 4.50	15.35
ABC_{80}^t ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min.}$)	14058.29 \pm 2921.22	20.78
ABC_{80}^{∞} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min.}$)	23163.85 \pm 6636.34	28.65
Csee ($\mu\text{g/mL}$)	117.42 \pm 3.26	2.77
Ke (min^{-1} .)	0.0150 \pm 0.0053	35.32
$t_{1/2}$ (min.)	53.92 \pm 25.41	47.13
Vd (mL)	202.81 \pm 33.88	16.71
Cl (mL/min.)	2.08 \pm 0.47	22.40



En las Tablas XXIV y XXV donde se presentan las concentraciones sanguíneas una vez finalizada la infusión intravenosa, en la que se puede observar que los valores siguen una tendencia similar a los observados en el conejo del estudio preliminar; donde se tiene el perfil completo de la administración por infusión intravenosa (Figura 9).

Al comparar los perfiles obtenidos para los diez conejos (Figuras 11 y 12) se puede apreciar que la fase terminal de estos tiene un comportamiento similar con los observados en la Figura 9. Esta tendencia se aprecia mejor en la Figura 13, donde muestra el promedio de las concentraciones sanguíneas de Casiopeína III-i obtenidas.

Este comportamiento es característico de un Modelo Abierto de un Compartimento, considerando esto y que el fármaco fue administrado a una velocidad de infusión (K_0) de $490.33 \mu\text{g}/\text{min}$, se calcularon los parámetros farmacocinéticos de la Casiopeína III-i para cada uno de los conejos con ayuda del programa Winnonlin Professional versión 1.5. Estos resultados se resumen en la Tabla XXVII, y los resultados promedio se encuentran en la Tabla XXVIII.

Se encontró que los niveles sanguíneos en el estado estacionario (C_{see}) fueron $117.42 \pm 3.26 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $120.26 \mu\text{g}/\text{mL}$ para el estudio preliminar, este nivel sanguíneo esta entre el rango encontrado para los diez conejos.

La constante de eliminación fue $0.0150 \pm 0.0053 \text{ min}^{-1}$ igual a la encontrada en el estudio preliminar (0.0148 min^{-1}). El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue $53.92 \pm 25.41 \text{ min.}$, y el área bajo la curva (ABC_0^∞), $23163.85 \pm 6636.34 \mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$. Los resultados obtenidos en el estudio preliminar también están dentro del rango encontrado para los diez conejos.



El aclaramiento total (Cl_T) fue de 2.08 ± 0.47 mL/min., y el volumen de distribución aparente (V_d) de 202.81 ± 33.88 mL. Considerando que el volumen sanguíneo para un conejo es de 60 mL/Kg de peso, el volumen sanguíneo promedio para los conejos sería de aproximadamente 175.8 mL, lo que nos indicaría que el fármaco se distribuye en agua plasmática. Aunque como sabemos el volumen de distribución de un fármaco es una constante de proporcionalidad matemática que relaciona masa y concentración y no representa necesariamente, una realidad fisiológica^{43,44}. Al determinar el tiempo medio de residencia (TMR), se encontró un valor de 90.86 ± 14.93 min. Al comparar los valores obtenidos en el estudio preliminar para el aclaramiento, volumen de distribución aparente y tiempo medio de residencia se encontró que son muy parecidos.

A pesar de la gran variabilidad que existe entre los conejos, se puede observar que los parámetros farmacocinéticos encontrados en el conejo en el cual se tomaron muestras sanguíneas durante la infusión, como los que solo se tomaron muestras una vez terminada la infusión presentaron resultados similares, con esto se justifica el hecho de que para el estudio final solamente se tomaron muestras sanguíneas una vez terminada la infusión intravenosa, es decir, a partir de 80 min., ya que como se apreció en el perfil farmacocinético del estudio preliminar (Figura 9) en los tiempos de 50 a 80 min. se aprecia una meseta, lo que significa haber alcanzado niveles sanguíneos en estado estacionario, en donde la velocidad de salida (k_e) es igual a la velocidad de entrada (k_o). Así que la fase de eliminación empieza aproximadamente los 80 min.



Por otro lado, es importante destacar que estos datos farmacocinéticos son los primeros para la Casiopeína III-i, por lo que a partir de estos se pueden hacer una serie muy amplia de estudios posteriores, entre los que destacarían, la unión a proteínas, estudios con dosis múltiples para determinar si el fármaco sigue una cinética lineal (dosis independiente) o no lineal (dosis dependiente); diferentes vías de administración para determinar biodisponibilidad y constante de absorción.

Finalmente, por tratarse de un fármaco nuevo aún se tiene mucho campo por investigar y muchas preguntas por contestar, por lo que este trabajo solo representa una pequeña aportación en el conocimiento del comportamiento de estas moléculas dentro del organismo.



CONCLUSIONES



IV CONCLUSIONES

- El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de Casiopeína III-i en sangre de conejo, fue lineal, selectivo, específico, exacto, reproducible y repetible en un intervalo de concentración de 20 a 120 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras deben ser extraídas y mantenidas en congelación protegidas de la luz, para evitar su degradación. Además de que es preferible que sean analizadas dentro las 96 horas posteriores a su extracción. El método analítico es sencillo y requiere un volumen pequeño de muestra (200 μL), por lo que es confiable para ser empleado en estudios farmacocinéticos.
- Al determinar el perfil farmacocinético de la Casiopeína III-i, este se ajusta a un Modelo Abierto de un Compartimento.
- Los parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron los siguientes: Constante de eliminación (K_{el}) 0.0150 min^{-1} , Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) 53.92 min. Presenta un volumen de distribución aparente (V_d) de 202.81 mL y una depuración (Cl) de 2.08 mL/min. El área bajo la curva (ABC) fue de 23163.85 $\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$.



APÉNDICE I



V APÉNDICE I

5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CONEJOS.

Los conejos estuvieron mucho tiempo incluidos en el orden rodentia de los que se han separado por sus características especiales. A diferencia de los roedores que tienen 4 incisivos, los lagomorfos tienen 6, un par accesorio que se localiza inmediatamente atrás del par de incisivos superiores; este par de accesorio carece de filo y solo es moderadamente útil, sin embargo constituye la base científica para alojar a estos animales en un orden separado: los lagomorfos.²⁹ Además de las características de dentición, los lagomorfos presentan otras diferencias con respecto a los roedores:

- a) Son terrestres
- b) Comen solamente vegetales
- c) Sus molares presentan corona elevada y carecen de raíces
- d) El escroto se encuentra en la parte anterior del pene, igual que en los marsupiales.

En la mayoría de los mamíferos placentarios el escroto se encuentra situado detrás del pene.^{29,30}

En la actualidad como *Oryctagus Cuniculus*, siendo el único género del conejo europeo la liebre (*Lepus*) y el conejo americano (*Sylvilagus*) pertenecen a géneros distintos sin que entre ellos se produzcan cruzaas fértiles.³⁰

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



5.2 TAXONOMIA.

Clase: Mammalia
Orden: Lagomorpha
Familia: Leporidae
Género: Oryctolagus
Especie: cuniculus

5.3 RAZAS Y VARIEDADES.

La American Rabbit Bredders Association (ARBA) enlista 30 razas y cerca de 80 variedades de Orytagus cuniculus. Las razas varían en tamaño, color de pelo, así como las que han sido seleccionadas para la producción de pelo, carne o fines de laboratorio. Las principales diferencias se refieren al tamaño, que va desde el gigante de Flandes, de más de 5Kg de peso, al minúsculo de Holanda.^{29,30,31}

5.4 PRINCIPALES USOS DEL CONEJO EN LA INVESTIGACIÓN.

Las ventajas que presentan los conejos para su uso como modelos animales son debidas a ciertas características como son: su tamaño medio, docilidad y facilidad de manejo. De acuerdo a la raza, el conejo varía considerablemente de peso y conformación, proporcionando una serie de tamaños elegibles con los cuales se puede trabajar. Su tasa de madurez, su fertilidad y hábitos alimenticios, permiten la obtención de muestras estadísticamente satisfactorias.

Las grandes venas de las orejas proporcionan un acceso fácil al sistema circulatorio y lo han convertido en un recurso valioso en la investigación serológica e inmunológica. La calidad y cantidad de anticuerpos del conejo son



frecuentemente consideras superiores a las de todos. Debido a su hipersensibilidad a los irritantes, los conejos son utilizados en una gran cantidad de pruebas de control de calidad de productos aplicados a nivel cutáneo así como también para probar la presencia de pirógenos en sustancias preparadas para uso parenteral. En la Tabla XX se muestran algunos estudios en los cuales se emplean conejos como modelo animal. Y en la Tabla XXI se presentan los valores sanguíneos normales para los conejos.

Para la aplicación de fármacos y anestesia se emplean las siguientes vías: ^{30,31}

Subcutánea: Debajo de la piel de la espalda se puede aplicar hasta 30ml. (aguja N. 22).

Intramuscular: Se aplica en los muslos de los miembros posteriores (aguja N. 22-25).

Intraperitoneal: Se aplican en la parte posterior del abdomen (subumbilical). La aplicación debe evitarse del lado derecho ya que se corre el riesgo de puncionar el ciego, se puede inyectar hasta 40ml de líquido (aguja N. 22).

Endovenosa: A través de la vena marginal de la oreja (aguja N.22).

Oral: Por sondeo esofágico, la sonda gástrica para el conejo debe ser de los números 5, 8 o 10 (2-3-5mm de diámetro). El tubo se pasa a través de un orificio practicado sobre una pieza de madera, pieza que se coloca en forma de bocado en el diastema del animal impidiendo así que muerda la sonda. También se puede ocupar una jeringa sin aguja por el espacio interdentario.

Nasal: Con una jeringa se gotea sobre el orificio nasal.



Tabla XXI. Modelo animal para el estudio de algunas enfermedades en donde se emplean conejos.³¹

ENFERMEDAD	MODELO ANIMAL	EQUIVALENCIA EN EL HUMANO
Metabólicas y por deficiencias nutricionales	Arteriosclerosis	Arteriosclerosis
	Hipocalcemia	Hipoparatiroidismo agudo
	Distrofia muscular	Distrofia muscular
Hereditarias	Acondroplasia	Acondroplasia
	Glaucoma hereditario	Glaucoma
	Osteoporosis	Osteoporosis
	Espina bífida	Espina bífida
Endocrinológicas	Tiroiditis	Tiroiditis crónica
Relacionadas a la fisiología reproductiva	Deficiente desarrollo gonadal	Deficiente desarrollo gonadal
	Hipocalcemia postparto	Hipocalcemia postparto
	Toxemia de la preñez	Toxemia de la preñez
	Tumores uterinos	Tumores uterinos
Investigación sobre cáncer	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma (enfermedad con similitudes reservadas)
	Papiloma	Papiloma

Tabla XXII. Valores sanguíneos normales para conejos.^{30,31}

PARAMETRO	VALOR	PARAMETRO	VALOR
Volumen sanguíneo	60ml /Kg (pv)	Monocitos	3%
Eritrocitos	5-5.5 ¹⁰ células / ml	Eosinófilos	1%
Plaquetas	240 ¹⁰ células /ml	Basófilos	2%
Leucocitos	8 - 10 ³ células/ml	Hematocrito	41.5
Neutrófilos	45%	Hemoglobina	13.5 %
Linfocitos	50%	Tiempo de sangría	1 min.



APÉNDICE II



VI APÉNDICE II

La ecuación diferencial que describe el proceso de cambio de la cantidad de Casiopeína III-i en función del tiempo después de una administración por vía intravenosa a velocidad constante es:

$$\frac{dC_{s-III-i}}{dt} = K_0 - K_e C_{s-III-i} \dots (15)$$

Donde:

- $C_{s-III-i}$ Es la cantidad de Casiopeína III-i.
 K_0 La constante de velocidad de infusión.
 K_e La contante de velocidad de eliminación.

La forma integrada de la ecuación (15) es:

$$C_{s-III-i} = \frac{K_0}{K_e} (1 - e^{-K_e t}) \dots (16)$$



Como la velocidad de eliminación se expresa por la concentración de la Casiopeína III-i en el compartimento sanguíneo, la ecuación (16) puede expresarse en función de concentración dividiendo ambos términos por el volumen de distribución.

$$\frac{Cs - III - i}{Vd} = C = \frac{Ko}{VdKe} (1 - e^{-kt}) \dots (17)$$

La ecuación (17) demuestra que con una infusión constante se debe alcanzar el nivel estacionario a t infinito, ya que el termino $(1 - e^{-kt})$ para ese tiempo se reduce a la unidad. Por lo tanto tenemos:

$$Cee = \frac{Ko}{VdKe} \dots (18)$$

Donde:

Cee Concentración en el estado estacionario.

Una vez que se suspende la infusión, la concentración sanguínea desciende en forma exponencial, tal como sucede tras una inyección intravenosa instantánea. La ecuación es similar a la que describe este proceso, solo que la concentración a tiempo inicial Co pasa a ser Cee.

$$\ln C = \ln Cee - Ket' \dots (19)$$

Donde:

t' Tiempo transcurrido después de la infusión.



Por lo que la constante de velocidad de eliminación de primer orden puede calcularse de la fase terminal del gráfico de concentración sanguínea versus tiempo. Los parámetros farmacocinéticos primarios (volumen de distribución aparente y aclaramiento) se calculan con las ecuaciones (20) y (21) respectivamente.

$$Vd = \frac{Ko}{Cee.Ke} \dots(20)$$

$$Cl = Vd.Ke \dots(21)$$

Donde:

Vd Volumen de distribución aparente.

Cl Aclaramiento total.

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$), área bajo la curva (ABC) y tiempo medio de residencia se calculan con las ecuaciones (22), (23) y (24) respectivamente.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{Ke} \dots(22)$$

$$ABC'_0 = \left(\frac{Cs_2 + Cs_1}{2} \right) (t_2 - t_1) + \dots \left(\frac{Cs_n + Cs_{n-1}}{2} \right) (t_n - t_{n-1})$$

$$ABC_0^x = ABC'_0 + \frac{Cee}{Ke} \dots(23)$$



$$TMR = \frac{ABPM}{ABC} \dots(24)$$

Donde:

ABPM Área bajo la curva del primer momento.



BIBLIOGRAFÍA



VII BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Capizz Robert L., **Quimioterapia del cáncer. Bases farmacológicas.**, Editorial Medica Panamericana., México., 196-197.
- 2 Franks L.M. **Introduction to the cellular and molecular biology of cancer.**, Oxford Univ Press, (1986).
3. Goodman, L and Gilman A., **Bases farmacológicas de la terapéutica.**, 5ª edición., Nueva Editorial Interamericana., México., 1047 - 1052., (1978).
4. Murray Robert K., Mayes Peter. **Bioquímica de Harper.** 14º edición., El manual moderno., México, (1996)
5. Lessner Howard E. **Oncología Médica.**, El Manual Moderno. México., (1980).
6. Ruiz A. Lena, Moreno E. Rafael. **Diseño, Síntesis y Caracterización de las Casiopeínas.** 1ª jornada de trabajos en Casiopeínas., Facultad de Química, UNAM. , (1994).
7. Breña V. Leonardo. **Síntesis de Ligantes.** 1ª jornada de trabajos en Casiopeínas., Facultad de Química, UNAM. , (1994).
8. Ruiz A. Lena, Moreno E. Rafael. **Estabilidad de Casiopeínas.** 1ª jornada de trabajos en Casiopeínas., Facultad de Química, UNAM. , (1994).
9. Morales Pedro., **Determinación del potencial citostático de drogas antineoplásicas en desarrollo mediante su efecto sobre el índice mitótico en células de la médula osea de ratón "in vivo".**, Primera Jornada de trabajos en Casiopeínas., UNAM (1994).
10. Rosales Masías. **Evaluación preclínica de fármacos con actividad antineoplásica potencial.**, 3ª jornada de trabajos en Casiopeínas., Facultad de Química, UNAM., (1998).
11. Bravo Gómez M. **Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación**



- de cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino.**, Tesis licenciatura Q.F.B. Facultad de Química., UMAN. (1998).
12. De la Rosa Duque. **Recombinogenic effects induced by Casiopeina III as detected by reverse mutations in SPD8 cells.** 3^{ra} jornada de trabajos en Casiopeínas., Facultad de Química, UNAM., (1998).
13. Gómez Celedonio R., **Evaluación antineoplásica "in vitro"**, Instituto Nacional de cancerología., Primera Jornada de trabajos en Casiopeínas., UNAM (1994).
14. Gracia Isabel., **Evaluación antineoplásica "in vivo"**, Facultad de Química., Primera Jornada de trabajos en Casiopeínas., UNAM (1994).
15. Gómez D. Eusebio., **Informe de casos clínicos de perros y gatos tratados con Casiopeínas.**, FMVZ., Facultad de Química., Primera Jornada de trabajos en Casiopeínas., UNAM (1994).
16. Rendón Elena., **Determinación farmacocinética de las Casiopeínas II y III en ratón, por absorción atómica.**, Facultad de Química., Segunda Jornada de trabajos en Casiopeínas., UNAM (1996).
17. Ruiz A. Lena. **Dirección General de invenciones, marcas y desarrollo tecnológico.** SECOFI, Registro No. 188801-120579-120580. Us Patent number Ap 21(1992)5, 107, 005, Nov 19, (1996)5, 576,326, Feb 18, (1997).
18. Tovar Tovar A. **Estudio electroforético del mecanismo de interacción de la familia de la Casiopeína I, II y III con ADN.** 1^{ra} jornada de trabajos en Casiopeínas., Facultad de Química, UNAM. , (1994).
19. Alpízar Viveros A. **Determinación del pKa y el coeficiente de partición de la Casiopeína III.** 3^{ra} jornada de trabajos en Casiopeínas. , Facultad de Química, UNAM. , (1998).
20. Charles E. Hammer., **Drug development.**, 2^a edición., CRC Press INC., Florida USA., (1990)



21. Welling P, Lasagna L, Banakar V., **The drug development process. Increasing efficiency and cost-effectiveness.**, vol 76., Edition Marcel Dekker, INC., New York USA.,(1996)
22. Karl E. Pecice., **Biopharmaceutical statistic for drug development.**, Edition Marcel Dekker, INC., New York USA.,(1988)
23. **Manual de validación de métodos analíticos**, editado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México.
24. Karnes T., Clark M, **Precision, accuracy, and data acceptance critario in biopharmaceutical analysis.**, Pharmaceutical research., No. 10.,pp 1420-1426., (1993).
25. Karnes T., Shiu G., **Validation of bioanalytical methods.**, Pharmaceutical Research., No. 4., pp 421-426., (1991).
26. James Blanchard., **Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance chromatografic analysis.**, Journal of chomatography., vol 226., 455-460., (1981)
27. John A. Benvenuto, Stephen W Hall, David Farquhar, Katherine Lu, and Ti Li Loo., **High-pressure liquid chromatography in pharmacological studies of anticancer drugs.**,
28. Shad VP, midha KK, Dighe S et al., **Analytical methods validation for bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies.**, J. Pham Sci., 81(3), 309-312., (1992).
29. Olivares G. Araceli., **Manual para el manejo de animales de laboratorio.**, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco., México., 86 - 94.,(1996)
30. Stark Dennis M and Ostrow Marshalle., **Training manual series. Assistant laboratory animal technician.**, vol. uno., American Association for Laboratory Animal Science., USA., (1991).



31. G. L. Van Hoosier and R.F. DiGiacomo., **Laboratory Animal Medicine and Science Series II.**, Health Sciences Center for Educational Resources., University of Washington., USA., (1991)
32. Ette E. I. , Kelman A. W., Howie C. A., and Whiting B., **Influence of inter -animal variability on the estimation of population pharmacokinetic parameters in preclinical studies.**, Clin. Research & reg. Affairs. , 11 (2), 121 - 139 (1994).
33. Stephanie Pepin-Covatta, Charles Letsch, Jean Lang and Jean-Michel Scherrmann., **Preclinical Assessment of immunoreactivity of a new purified equine F(ab')₂ against European viper venom.**, Journal of Pharmaceutical Sciences., Vol. 87, No. 2 (1998).
34. Amita S, Joshi, Shang- Ying P. King et al., **Phase I safety and pharmacokinetic studies of brequinar sodium after single ascending oral doses in estable renal, hepatic, and csrdic allograft recipients.**, J clin pharmacol., vol 37., 1121-1128., (1997).
35. Samir C. Mehta and D. Robert Lu., **Interspecies pharmacokinetics scaling of BSH in mice, rats, rabbits and humans.**, Biopharmaceutics and drug disposition., vol 16., 735-744., (1995)
36. Harold Boxenbaum., **Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics.**, Journal of pharmacokinetics and Biopharmaceutics., vol 10.,No. 2., 201-227., (1982).
37. Harold Boxenbaum., **Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin.**, Journal of pharmacokinetics and Biopharmaceutics., vol 8., 165-176., (1980).
38. Joyce Mordenti. **Man versus beast: Pharmacokinetic scaling in mammals.**, Journal of pharmaceutical sciences., Vol. 75., N. 11., (1986).



39. Joyce Mordenti. **Pharmacokinetic scale-up: Accurate prediction of human pharmacokinetic profiles from animal data.**, Journal of pharmaceutical sciences., Vol. 74., N. 10., (1985).
40. Ganesh R. Iyer, Robert A. Bellontone and David R Taft., **In vitro characterization of the erythrocyte distribution of methazolamide: A model of erythrocyte transport and binding kinetics.**, Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics., Vol. 27, N. 1 (1999).
41. Per J. Wistrand and Per Baathe., **Inhibition of carbonic anhydrase activity of whole erythrocytes.**, Acta pharmacol. Et toxicol. Vol. 26., 145-168., (1968).
42. Benet L., Massoud N., Gambertoglio J. **Pharmacokinetic basic drug treatment.**, Raven Press., 195-220., (1984).
43. Gibaldi M. **Farmacocinética.**, Primera edición., Reverte., España., (1982).
44. Wagner J. **Farmacocinética Clínica.**, Primera edición., Reverte., España., (1982).

