

00550
27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA DE LA CASIOPEÍNA II GLY EN
RATAS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.B. LEOBARDO REYES VELASCO



**Ciencias
Químicas**

TUTOR: DRA. LENA RUIZ AZUARA AÑO: 2003

A

TESIS CON
VALLE DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OF.CPCQ.461/03

BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

Presente

Me es grato informarle que el alumno **LEOBARDO REYES VELASCO**, con número de cuenta 500007970, presentará su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "Farmacocinética Preclínica de la Casiopeína II gly en ratas", ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Mario Allamirano Lozano	FES-Zaragoza
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. David Quintanar Guerrero	FES-Cuautitlán
Primer suplente	Dra. Patricia García López	Inst. Nal. de Cancerología
Segundo suplente	Dra. María Eva González Trujano	Inst. Nal. de Psiquiatría

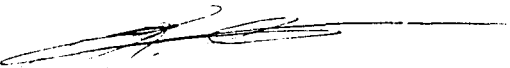
Este oficio cancela y sustituye al 305/03 de fecha 9 de abril de 2003.

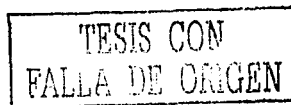
Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, D.F. a 30 de mayo de 2003.


DR. RAYMUNDO CEA OLIVARES
Coordinador del Programa



c.c.p. Integrantes del Jurado
Interesado
Expediente
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química

Nota: Se recuerda a los miembros del jurado que el plazo máximo para revisión de la tesis es de 30 días naturales a partir de la recepción de la misma.

AGRADECIMIENTOS:

A la Subdirección de Intercambio Académico, dependiente de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por la Beca de Intercambio otorgada durante el periodo de Agosto de 2000 a Julio de 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2

El presente trabajo se soportó económicamente gracias a los proyectos PAPIIT IN212100 y 6390-05, así como CONACYT G35012-N.

La realización de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 112, Biofarmacia, y en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) del conjunto "E", Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE GENERAL.

Resumen	1
Abstract	2
	Capítulo I. Introducción.	3
1.1.	Introducción.....	4
	Capítulo II. Antecedentes.	7
2.1.	Cáncer.....	8
2.1.1.	Agentes físicos, biológicos y químicos que causan cáncer.....	10
2.2.	Carcinógenos químicos y la evolución natural de la neoplasia ...	13
2.2.1.	Patogenia de la neoplasia. Aspectos biológicos.....	13
2.2.2.	Mecanismos celulares y moleculares en las etapas de carcinogénesis.....	17
2.2.3.	Blancos genéticos moleculares de carcinógenos que dañan el ADN.....	19
2.2.4.	Regulación del ciclo celular.....	25
2.3.	Quimioterapia, la búsqueda de fármacos más efectivos.....	32
2.3.1.	Resistencia a fármacos.....	34
2.3.2.	Mecanismo de acción de fármacos antineoplásicos.....	36
2.3.3.	Complejos metálicos como agentes anticancerígenos.....	37
2.3.3.1.	Toxicidad de quimioterapéuticos basados en metales.....	39
2.3.3.2.	Toxicidad de metales.....	41
2.3.4.	Casiopéinas.....	43
2.3.4.1.	Casiopéina II gly.....	45
2.4.	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....	49
2.5.	Pruebas preclínicas de fármacos.....	50
2.5.1.	Guía FDA de los requerimientos para pruebas no clínicas.....	51
2.5.2.	Tipos de estudios no clínicos.....	52
2.5.2.1.	Estudios farmacológicos.....	52
2.5.2.2.	Estudios de toxicidad.....	54
2.6.	Farmacocinética preclínica del cisplatino.....	55
	Capítulo III Planteamiento del problema e hipótesis	59
3.1.	Planteamiento del problema.....	60
3.2.	Hipótesis.....	62
	Capítulo IV. Objetivos y Parte Experimental.	63
4.1.	Objetivos.....	64
4.2.	Parte experimental.....	65
4.2.1.	Reactivos.....	65
4.2.2.	Material biológico.....	65
4.2.3.	Equipo.....	66
4.2.4.	Software.....	67
4.2.5.	Preparación de soluciones.....	67
4.2.6.	Método analítico.....	70
4.2.6.1.	Selectividad.....	70
4.2.6.2.	Linealidad.....	70
4.2.6.3.	Precisión.....	71

E

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.2.6.4.	Exactitud	71
4.2.6.5.	Límite de detección	72
4.2.6.6.	Límite de cuantificación	72
4.2.6.7.	Estabilidad	72
4.2.6.8.	Robustez	72
4.3.	Farmacocinética preclínica	73
4.3.1.	Estudio farmacocinético	73
4.3.2.	Tratamiento de la muestra plasmática	76
4.4.	Condiciones cromatográficas	77
	Capítulo V. Resultados.	78
5.1.	Condiciones cromatográficas	79
5.2.	Validación del método analítico	79
5.2.1.	Selectividad	79
5.2.2.	Linealidad del sistema	82
5.2.3.	Precisión del sistema	83
5.2.4.	Linealidad del método	84
5.2.5.	Precisión del método	85
5.2.5.1.	Repetibilidad	85
5.2.5.2.	Reproducibilidad	85
5.2.6.	Exactitud del método	86
5.2.7.	Recobro (%)	87
5.2.8.	Límite de detección	87
5.2.9.	Límite de cuantificación	87
5.2.10.	Estabilidad	88
5.2.11.	Robustez	88
5.3.	Farmacocinética preclínica	89
5.3.1.	Estudio farmacocinético	89
	Capítulo VI. Análisis de Resultados	93
6.1.	Desarrollo y validación del método analítico por CLAR	94
6.2.	Farmacocinética preclínica.	96
	Capítulo VII. Conclusiones.	98
7.1.	Conclusiones	99
Bibliografía	100

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1	Cánceres comunes causados por químicos carcinógenos.....	12
Tabla 2	Características morfológicas y biológicas de las fases de inicio, promoción y progresión durante la carcinogénesis.....	14
Tabla 3	Algunos mecanismos celulares y moleculares en carcinógenos multifase.....	18
Tabla 4	Características de protooncogenes, oncogenes celulares y genes supresores tumorales.....	20
Tabla 5	Funciones de oncogenes representativos y genes supresores tumorales.....	21
Tabla 6	Mecanismos potenciales de activación de oncogenes.....	22
Tabla 7	Anormalidades cromosomales asociadas con cánceres humanos..	30
Tabla 8	Cantidad de caseína IIgly (mg) administrada a cada rata para cubrir la dosis de 8 mg/Kg en el estudio farmacocinético.....	74
Tabla 9	Diseño de los intervalos de muestreo para cada rata.....	75
Tabla 10	Linealidad del sistema.....	82
Tabla 11	Análisis de varianza para la linealidad del sistema.....	83
Tabla 12	Precisión del sistema.....	83
Tabla 13	Linealidad del método.....	84
Tabla 14	Análisis de varianza para la linealidad del método.....	85
Tabla 15	Precisión del método (repetibilidad).....	85
Tabla 16	Precisión del método (reproducibilidad).....	86
Tabla 17	Exactitud del método.....	86
Tabla 18	Recobro (%) del método.....	87
Tabla 19	Estabilidad de caseína II gly a -20°C.....	88
Tabla 20	Concentración plasmática de caseína IIgly en plasma de rata vs tiempo.....	89
Tabla 21	Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa WinNonlin.....	91
Tabla 22	Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa PK Analyst.....	92

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Diagrama de componentes de vías de transducción de señales y el ciclo celular.....	24
Figura 2	Estructura de la casiopeína II gly.....	48
Figura 3	Casiopeína II gly en fase móvil, 50 µg/mL con estándar interno	79
Figura 4	Casiopeína II gly en plasma de rata, 50 µg/mL con estándar interno	80
Figura 5	Blanco plasma de rata, con estándar interno	80
Figura 6	Blanco Meb 128, con estándar interno	81
Figura 7	Blanco Meb 134, con estándar interno	81
Figura 8	Linealidad del sistema	82
Figura 9	Linealidad del método	84
Figura 10	Perfil farmacocinético de Cp de casiopeína II gly vs tiempo	90
Figura 11	Modelo abierto de dos compartimentos por bolo I.V.	90

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

La casiopeina Ilgly, [acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)Cu (II)] NO₃, se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra tejidos cervico-uterinos HeLa y CaLo, células murinas de leucemia L1210, S180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxico y también induce apoptosis. El efecto más serio in vivo de la casiopeina Ilgly es la hemólisis de los glóbulos rojos, y su toxicidad hacia las células sanas es menor comparada con el cis-platino. Esta casiopeina es soluble en soluciones acuosas, y su DL₅₀ en ratones hembra cepa NIH, por administración i.v. es de 15.85 mg/Kg bajo una dosificación única.

OBJETIVOS. Desarrollar, implementar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de casiopeina Ilgly en plasma de ratas; y determinar la farmacocinética preclínica de la casiopeina Ilgly en ratas.

METODOLOGÍA. El método analítico se desarrolló de acuerdo a un diseño experimental sencillo. Se evaluaron los siguientes parámetros de acuerdo a lo especificado para métodos analíticos de estudios farmacocinéticos: selectividad/especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), estabilidad y robustez. Para la cuantificación de la casiopeina Ilgly en la muestra plasmática se realizó un proceso de extracción sólido-líquido utilizando cartuchos Sep-Pak vacc C18, 500 mg, 3 cc eluyendo la casiopeina Ilgly con metanol, se evaporó a sequedad con N₂, y se reconstituyó para la inyección cromatográfica. Para la farmacocinética preclínica se utilizó un grupo de 20 ratas administradas con una dosis de 8 mg/Kg de casiopeina Ilgly por vía i.v., tomando muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240 y 360 min), analizadas por CLAR. De los datos obtenidos se determinaron los parámetros farmacocinéticos ABC, Cp_{max}, Vd, Cl, β, T_{1/2}, TMR, para establecer el modelo al que mejor se ajustaron estos datos.

RESULTADOS. Se obtuvieron las mejores condiciones cromatográficas: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu ADVp Columna Waters Symetry C18, 4.6x250 mm, 5µm, λ: 273 nm, Flujo 0.7 mL/min, Fase móvil MeOH/H₂O, 58:42 v/v, pH=4.0 c/CH₃COOH. Tiempo de retención de la casiopeina Ilgly 4.6 minutos. El método fue específico, lineal en un rango de 2.5 a 50 µg/mL, (r=0.9933), preciso, exacto (C.V. ≤ 15%), LOD de 0.52 µg/mL, LOQ de 2.5 µg/mL, y estable durante 4 semanas en congelación a -20°C y 24 hr a 6°C. Los valores obtenidos de la farmacocinética se ajustaron a un MADC por bolo i.v., con los siguientes parámetros: ABC_{0-∞} = 1988.093 µg/mL.min, Cp_{max} = 33.793 µg/mL, Vd = 0.065L, Cl = 1.114 mL/min, β = 0.003 min⁻¹, T_{1/2} = 228.18 min., MRT = 262.15 min., α = 0.068 min⁻¹, A = 29.041 µg/mL, B = 4.752 µg/mL, K₁₀ = 0.017 min⁻¹, K₁₂ = 0.042 min⁻¹, K₂₁ = 0.012 min⁻¹.

CONCLUSIONES. El método desarrollado resultó confiable para la determinación de casiopeina Ilgly en plasma de rata. El método validado en el rango de concentraciones de 2.5 a 50 µg/mL, mostró buena precisión y exactitud, así como límites de detección y cuantificación bajos. El recobro fue bueno, reproducible y constante en el rango de la curva de calibración. Se sugiere que el método es suficientemente sensible para realizar estudios farmacocinéticos preclínicos.

ABSTRACT.

Casiopeina Igly [aqua (N-N= 4,7 dm-1,10-phenantroline) (N-O= glycine) Cu(II)]NO₃, is a potentially useful antineoplastic agent. It is very active against L1210 leukemia cells, S180, B16 and LW1, also kills cells by apoptosis. Induces a weak recombination action and has the ability to degrade DNA *in vitro* under a range of conditions. The major effect of Casiopeina Igly is the red blood cells haemolysis and its toxicity toward normal cells is minor compared to Cisplatin. The Casiopeina Igly is soluble in aqueous solutions and its DL₅₀ in female mice NIH by i.v. administration is 15.85 mg/Kg for only dosification.

Purpose: Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeina Igly® in rat plasma and to perform preclinical pharmacokinetic in rat plasma.

Methods: The analytical method was developed in accordance to single experimental design, it were evaluated the parameters in accordance to specifications for analytical methods in pharmacokinetics studies. The extraction was solid-liquid with Sep-pak C18 cartridges. In order to determine the pharmacokinetic profile of this drug, 20 male Wistar rats of 300 g body weight received a single i.v. dose of 8 mg/Kg of Casiopeina Igly. Blood samples were taken at 0, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240 and 360 minutes postdose. Plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C until analysis using the HPLC method developed. Data obtained were used to determine AUC_{0-∞}, C_{pmax}, Cl, β, T_{1/2}, MRT Vd, and to establish the best model adjusting these data.

Results: It was obtained the better chromatographic conditions, Casiopeina Igly retention time was 4.6 minutes. The method was specific, linear at range from 2.5 to 50 µg/mL (r=0.9933) precision and accuracy C.V. <15%, LOD of 0.52 µg/mL, LOQ of 2.5 µg/mL, and stable for 4 weeks frozen at -20°C and 24 hr at 6°C. The model obtained was TCOM, for bolus i.v., with following parameters: AUC_{0-∞}= 1988.093 µg/mL.min; C_{pmax}= 33.793 µg/mL; Cl= 1.114 mL/min; Vd= 0.065 L; β= 0.003 min⁻¹; T_{1/2}= 228.184 minutes; MRT= 262.15 minutes; α= 0.068 min⁻¹; A= 29.041 µg/mL; B= 4.752 µg/mL; K₁₀= 0.017 min⁻¹; K₁₂= 0.042 min⁻¹; K₂₁= 0.012 min⁻¹.

Conclusions: The developed method proved to be useful and reliable for determining Casiopeina Igly in rat plasma. The method was validated from concentrations 2.5 to 50 µg/mL. It had good repeatability and accuracy at low limits of quantification and detection. The recovery of Casiopeina Igly was reproducible and constant over the entire range of the calibration line. This method could be sufficiently sensitive to perform in future preclinical pharmacokinetics studies.

CAPÍTULO I.
INTRODUCCIÓN.

1.1. INTRODUCCIÓN.

Se define al cáncer como una proliferación de células, las cuales pierden los rasgos de controles normales, resultando en un crecimiento irregular, falta de diferenciación, invasión de tejidos locales y metástasis.¹

Entre los tratamientos útiles contra el cáncer, tenemos a la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia, la hormonoterapia, la crioterapia y en buen número de casos, la combinación de éstas.

La importancia de encontrar terapias alternativas para el tratamiento del cáncer en nuestro país, se ha incrementado en los últimos años, ya que esta enfermedad es la segunda causa de muerte en el mundo y también en México. La búsqueda de compuestos análogos de fármacos comerciales con objetivos tales como aumentar su potencia, disminuir su toxicidad, alterar su absorción, asegurar una protección más adecuada, etc., ha sido la meta en los descubrimientos de fármacos nuevos y sus derivados.

En México la necesidad de importación de estos productos y su elevado costo, hace que el desarrollo de productos antineoplásicos adquiera prioridad. Todo lo anterior ha llevado al desarrollo de fármacos a base de cobre, las Casiopeínas, nuevos compuestos de coordinación con potencial antineoplásico.

La familia de las casiopeínas contiene cobre (II) como metal, y en la esfera de coordinación tienen dos ligandos bidentados, uno de ellos es una diimina (N-N) y el otro puede ser un aminoacidato (N-O) o donador (O-O). Para la obtención de estos complejos se ha considerado que el metal sea esencial y presente una toxicidad relativamente baja, que su estado de oxidación sea similar al de los metales que se encuentran en los fluidos biológicos. Por otro lado, los ligandos deben tener la capacidad de formar quelatos sistemas cis y cierto grado de hidrofiliicidad e hidrofobicidad. Según estas características 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.^{1,2,3}

La casiopeina IIgly [Acua (4,7-dimetil- 1,10- fenantrolina) (glicina) cobre (II)] NO₃ (P.M.: 423.5 gr/mol; pka: 5.4) ha mostrado actividad antineoplásica y una toxicidad menor hacia las células sanas que el cisplatino; se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo Calo, murinas leucemia L1210, y S180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxico e induce apoptosis. El efecto más serio in vivo de la casiopeina IIgly es la hemólisis de glóbulos rojos, la cual se debe a la toxicidad del cobre.^{4,5,6}

Algunas de las pautas importantes en el desarrollo de un nuevo fármaco es lo concerniente al estudio de los procesos ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción). Estudios farmacocinéticos, monitoreo y toxicidad; requieren de contar con un método analítico en fluidos biológicos, confiable y validado, que ayude a medir las concentraciones del fármaco inalterado en suero, plasma, sangre total u orina.^{7,8,9,10,11}

Todas las variables del método deben ser consideradas, incluyendo el procedimiento de muestreo, preparación de las muestras, separación cromatográfica, detección y evaluación de los datos, y el uso de la misma matriz en donde se encuentran las muestras.⁸

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es una técnica que permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos. La separación se basa en la distribución del soluto entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal manera que cada uno de los componentes de la mezcla migra a diferentes velocidades por la fase estacionaria. Con esta técnica se obtienen separaciones en términos de minutos e inclusive en algunos casos en segundos, con buena resolución y sensibilidad.

El método CLAR permite el análisis de compuestos de origen orgánico, inorgánico, iónico, covalente, así como de compuestos de alto peso molecular. Su importancia radica en el variado campo de aplicación que tiene en distintas áreas.^{12,13,14,15,16,17,18}

El procedimiento de validación incluye primero la validación del método analítico (selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, recobro, estabilidad y robustez), y segundo la validación de la estabilidad en la matriz biológica.¹⁹

Los estudios de farmacocinética y toxicocinética de un nuevo fármaco se conducen mejor usando las mismas especies animales, rango de dosificación y ruta de administración. Un número suficiente de animales debe incluirse en cada dosis para asegurar que la validación inherente no interfiera con los resultados. La información obtenida de estudios farmacocinéticos puede usarse para optimizar el diseño de estudios preclínicos, y extrapolar los resultados en situaciones clínicas.

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.

Los parámetros farmacocinéticos a ser considerados incluyen, el área bajo la curva (ABC), concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (T_{max}), volumen de distribución (V_d), depuración (Cl), y tiempo de vida media de eliminación ($T_{1/2}$).

Es también importante evaluar los metabolitos del fármaco, y su posible contribución sobre el perfil de la actividad total. Los datos obtenidos de estudios farmacocinéticos son de utilidad ya que proveen bases cruciales para el conocimiento de los efectos biológicos del fármaco, identificando y diseñando estudios preclínicos apropiados, los que tienen un papel primordial en la seguridad y eficacia de los fármacos.^{7, 8, 9, 10, 11}

CAPÍTULO II.

ANTECEDENTES.

2.1. CÁNCER.

El término cáncer describe una serie de lesiones subsecuentes de la enfermedad neoplasia. La neoplasia o la lesión constitutiva, un *neoplasma*, se define como un crecimiento de tejido con alteraciones hereditarias relativamente autónomo.²⁰ Los puntos críticos de esta definición son (1) los aspectos hereditarios de la neoplasia al nivel de célula somática o germinal, y (2) la autonomía relativa de las células neoplásicas, que refleja su regulación anormal de expresión genética, que es inherente en las células neoplásicas u ocurre en respuesta a estímulos ambientales. Las neoplasias pueden ser *benignas* o *malignas*. La distinción crítica entre estas clases se relaciona con la característica del crecimiento metastásico exitoso de neoplasias malignas, pero no de benignas. Las *metástasis* son crecimientos secundarios de células que provienen de la neoplasia primaria. Los cánceres son neoplasias malignas, en tanto que el término "tumor" describe lesiones ocupadoras de espacio que pueden ser neoplásicas o no.

El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano a cualquier edad. La mayoría de los cánceres son potencialmente curables si son detectados en sus etapas iniciales. Los pacientes pueden ayudar a reconocer los signos iniciales de algunas malignidades posibles con el desarrollo de autoexaminaciones. Las pruebas de diagnóstico y la terapia son esenciales para resultados óptimos.²¹

La nomenclatura de las neoplasias depende principalmente sobre si la neoplasia es benigna o maligna y, en este último caso, si se deriva de tejido epitelial o mesenquimatoso. Para la mayoría de los neoplasias benignas, el tejido de origen va seguido por el sufijo *-oma*: fibroma, lipoma, adenoma, y así sucesivamente. Para neoplasias malignas cuyo origen se deriva de tejido mesenquimatoso, se agrega el término *sarcoma* al descriptor del tejido: fibrosarcoma, osteosarcoma, liposarcoma, y así sucesivamente. Las neoplasias malignas derivadas de tejidos de origen ectodérmico o endodérmico (epitelial) son nombrados *carcinomas*, con un descriptor del tejido que lo precede: carcinoma epidermoide (piel), carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma gástrico, y otros por el estilo.

En general un *carcinógeno* es un agente que causa o induce neoplasia. De manera más específica, un *carcinógeno* es un agente cuya administración a animales previamente no tratados conduce a un aumento estadísticamente significativo en la incidencia de neoplasias de uno o más tipos histogenéticos, en comparación con la incidencia en animales apropiados no tratados.

Esta definición incluye la inducción de neoplasias que normalmente no se observan, la inducción temprana de neoplasias que generalmente se observan, y/o la inducción de más neoplasias que se encuentran normalmente. Aunque es importante distinguir entre los agentes que inducen neoplasias con acción directa sobre las células que llegan a ser neoplásicas y las cuales producen neoplasia con acciones indirectas en el animal entero, esto no siempre es posible. Algunos agentes, tales como los supresores inmunes, pueden incrementar la incidencia de neoplasias en tejidos que fueron previamente expuestos a los efectos indirectos de carcinógenos en el animal como el huésped. Cuando la acción de un químico es causa de un incremento en neoplasias, se conoce como indirecta –que es mediada por su efecto sobre otras células que sufren carcinogénesis- que el agente no puede ser designado como un carcinógeno.²¹

2.1.1. Agentes físicos, biológicos y químicos que causan cáncer.

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

i) Físicos:

Energía radiante: Los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma son mutágenos y carcinógenos. Estas radiaciones lesionan al ADN de varias maneras. La radiación ultravioleta puede causar la formación de dímeros de pirimidina, pueden crearse sitios apurínicos o apirimídicos por eliminación de las bases correspondientes; pueden producirse roturas en hebras sencillas o dobles, o entrecruzamiento entre ellas. Es causa definitiva de cáncer de piel (carcinoma basal y escamoso, melanoma, y especialmente en xenoderma pigmentoso).

Se supone que la lesión del ADN es el mecanismo básico de carcinogénesis de la energía radiante. Aparte de los efectos directos sobre el ADN, los rayos X y gamma provocan la formación de radicales libres en los tejidos. Los radicales hidroxilos resultantes, superóxido y otros, pueden interactuar con el ADN y algunas macromoléculas y conducir a alteraciones moleculares. La irradiación crónica en la piel conlleva a dermatitis crónica y en algunas ocasiones a carcinoma de células escamosas.^{22,23}

ii) Biológicos:

Virus: Los virus vinculados con malignancias humanas incluyen a los papilomavirus humanos (carcinoma cervical), citomegalovirus (sarcoma de Kaposi), virus de Epstein-Barr (linfoma de Burkitt, linfoma inmunoblástico y carcinoma nasofaríngeo), y virus de la hepatitis B (carcinoma hepatocelular). Los retrovirus humanos han sido vinculados con linfomas de las células T (virus humanos linfotrópicos de células T [HTLV-1]), los cuales tienen una predilección para implicaciones de piel y hueso, hipercalcemia y una fase leucémica. El mecanismo de la transformación neoplásica de HTLV-1 es la integración de los provirus (copia del ADN de doble cadena, y del ARN del genoma viral) dentro del genoma celular. El HTLV-2 se ha asociado ligeramente con una forma antigua inusual de leucemia de enlace de células T. Los tipos de VIH I y II están vinculados patológicamente con el SIDA, los pacientes con SIDA están predispuestos al sarcoma de Kaposi y al linfoma, los cuales pueden ser de origen viral.^{22,23}

Parásitos: El parásito *Schistosoma haematobium* se han vinculado a cáncer de paletilla, el cual se desarrolla usualmente después de una inflamación crónica y fibrosis. Se ha vinculado a *Opisthorchis sinensis* con el carcinoma del páncreas y de los conductos biliares.

Otros: Los pacientes con desordenes inmunológicos están predispuestos a neoplasia linforeticular y deben ser protegidos periódicamente; el desarrollo de nuevas linfadenopatías sospechosas deben ser evaluadas por biopsias. En pacientes con ataxia-telangectasia, la incidencia de leucemia linfoblástica aguda (LLA), tumores de cerebro, y cáncer gástrico exceden a la población normal. Los pacientes con el síndrome de Wiskott-Aldrich y agammaglobulinemia asociada a X también tienen un alto alcance para linfoma y LLA.

Los pacientes con inmunodeficiencia, como resultado de fármacos inmunosupresivos o infección por VIH, son de alto riesgo para varios neoplasmas, especialmente linfoma celular y sarcoma de Kaposi. Similarmente, los pacientes con SLE, RA, o síndrome de Sjögren son de alto riesgo para linfoma, usualmente el tipo celular B, presumiblemente relacionado con el estatus inmunológico alterado.

iii) Carcinogénesis química:

Un extenso número de compuestos químicos son carcinógenos (Tabla 1). 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; la alimentación; el estilo de vida o a otros factores (algunos fármacos).^{22,23}

Se refiere como un proceso multipasos: (1) En la iniciación, una célula que experimenta un evento carcinogénico puede desarrollar potencialmente en un clon neoplásico. (2) En la promoción, la cual es irreversible, continúa la existencia de la proliferación clonal neoplásica, que depende de un químico o un agente con actividad carcinogénica pequeña. (3) En la progresión, el crecimiento irreversible de células alteradas ocurre (neoplasia). Un agente que posee una pequeña o nula potencia carcinogénica (un cocarcinógeno) incrementa el efecto carcinogénico de otro agente

cuando la exposición es simultánea. La carcinogénesis química está influenciada por la edad, estatus endócrino, dieta, otros agentes exógenos (cocarcinógenos o promotores) y estatus inmunológico.

Tabla 1. Cánceres comunes causados por químicos carcinógenos.

Carcinógeno	Tipo de Cáncer	Carcinógeno	Tipo de Cáncer
Carcinógenos ocupacionales		Carcinógenos por estilo de vida	
Hollín y aceite mineral	Cáncer de piel	Alcohol	Cáncer de esófago, bucofaringeo, laringe e hígado.
Arsénico	Cáncer de pulmón y piel	Mascado de betel	Cáncer de boca
Asbesto	Cáncer de pulmón, mesotelioma	Tabaco	Cáncer de pulmón, esofaríngeo, laringe de paletilla, de cabeza y cuello
Tintes de cabello y aminas aromáticas	Cáncer de paletilla	Fármacos carcinógenos	
Benceno	Leucemia	Agentes alquilantes	Leucemia
Níquel	Cáncer de pulmón, del seno nasal	Dietilestilbestrol	Adenoma celular hepático, cáncer vaginal
Formaldehído	Cáncer nasofaríngeo	Oximetolona	Cáncer hepático
Cloruro de vinilo	Angiosarcoma hepático	Torotrast	Angiosarcoma
Pinturas, pesticidas no arseniosos, escape de diesel, cromatos.	Cáncer de pulmón		

*Los trabajadores de la salud expuestos a fármacos antineoplásicos, tienen también riesgos de alcanzar efectos adversos sobre la reproducción.

2.2. CARCINÓGENOS QUÍMICOS Y LA EVOLUCIÓN NATURAL DE LA APARICIÓN DE NEOPLASIA.

2.2.1. Patogenia de la neoplasia: Aspectos Biológicos.

Se cree que la patogenia de la neoplasia consta de al menos tres etapas definidas de manera operativa; empieza con el *inicio* y va seguida por una etapa intermedia de *promoción*, a partir de la cual evoluciona la etapa de *progresión*. En la tabla 2 se enlistan las características biológicas de las etapas de inicio, promoción y progresión. Es durante la primera y última etapas de la aparición de neoplasias (inicio y progresión) que pueden observarse cambios estructurales en el genoma (ADN). Los cambios estructurales comentados tienen más probabilidades de ser la causa de la inducción de estas etapas, en especial la etapa de inicio. La etapa intermedia de promoción no parece comprender cambios estructurales directos en el genoma de la célula, sino que, en su lugar, depende de una expresión alterada de genes.^{21,22,23,24}

Tabla 2. Características morfológicas y biológicas de las fases de inicio, promoción y progresión durante la carcinogénesis.

Inicio	Promoción	Progresión
Irreversible en células viables.	Reversible tanto para la expresión del gen como a niveles celulares.	Irreversible.
"Célula madre" iniciada no identificable morfológicamente.	Población de células promotoras dependiente de la administración continúa del agente promotor.	Alteración discernible morfológicamente en la estructura genómica celular, originada por inestabilidad del cariotipo.
Eficiencia sensible a xenobióticos y otros factores químicos.	Eficiencia sensible a envejecimiento y factores de la dieta y hormonales.	Crecimiento de células alteradas sensible a factores ambientales durante la fase temprana de esta etapa.
Aparición espontánea de células iniciadas. Requiere división celular para "fijación".	Los agentes promotores endógenos pueden efectuar promoción "espontánea".	
Respuesta a la dosis que no muestra un umbral fácilmente mesurable.	La respuesta a la dosis muestra umbral y efecto máximo mensurables.	En esta etapa se observan neoplasias benignas o malignas.
Potencia relativa de iniciadores dependientes de la cuantificación de lesiones preneoplásicas después de un periodo definido de promoción.	La potencia relativa de promotores medida por su eficacia para causar expansión de la población de células iniciadas.	Los agentes "progresores" hacen avanzar a las células promovidas hacia esta etapa.

Inicio. Al igual que los fenómenos mutacionales, el inicio requiere una o más rondas de división de células para la "fijación" del proceso. Los parámetros cuantitativos del inicio, se han demostrado en diversos sistemas experimentales; sin embargo, estos parámetros pueden estar regulados por alteración del metabolismo de xenobióticos y por hormonas tróficas. El metabolismo de los agentes iniciantes hacia formas no reactivas, y la alta eficiencia de la reparación del ADN de los tejidos pueden alterar el proceso de inicio.

Una de las características de la etapa de inicio es su irreversibilidad en el sentido de que el genotipo, o el fenotipo, o ambos de la célula iniciada se establecen en el momento de inicio. Hay pruebas de que se están acumulando de que no todas las células iniciadas sobreviven durante todo el lapso de vida del organismo o el periodo de un experimento. Su muerte parece deberse al proceso normal de la muerte celular programada o apoptosis. El inicio espontáneo o fortuito de células en diversos tejidos es muy frecuente. Si esto es cierto, la aparición de neoplasia puede estar en función únicamente del efecto de los agentes en las etapas de promoción o progresión.

Promoción. Como en la etapa del inicio, diversas sustancias químicas inducen esta fase. Sin embargo, al contrario de los químicos que inducen la etapa de inicio, no hay evidencia de que los agentes promotores o sus metabolitos interactúan directamente con el ADN, ni que se requiere metabolismo para su eficacia.

La característica distintiva de la promoción como contraste con el inicio o la progresión es la naturaleza reversible de esta etapa. La regresión de lesiones preneoplásicas luego de supresión de los agentes promotores puede deberse a apoptosis. Este mecanismo propuesto se soporta por la demostración de que muchos agentes promotores inhiben la apoptosis en lesiones preneoplásicas. Otras vías potenciales de esta reversibilidad operacional son la "rediferenciación" o remodelación. Así, las células en la fase de promoción son dependientes de la administración continua del agente promotor.

Otra característica de la fase de promoción es su susceptibilidad a la regulación por factores fisiológicos. La fase de promoción puede regularse por el proceso de envejecimiento y por factores de la dieta y hormonales. Muchos factores reguladores son en sí agentes promotores. Algunas hormonas pueden ser carcinógenas. Estas hormonas

son agentes promotores efectivos y así llegan a servir como una fuente exógena o endógena para la regulación de la proliferación celular durante la carcinogénesis. Esos agentes fisiológicos pueden ser un componente de la promoción endógena de células iniciadas.

Las relaciones entre dosis y respuesta de agentes promotores muestran curvas parecidas a una sigmoide, con un umbral observable y un efecto máximo. El efecto umbral de los agentes promotores puede considerarse una consecuencia de la naturaleza reversible de sus efectos a nivel celular. El efecto máximo se debe a una saturación de la unión a ligando en el primer caso y a la promoción de todas las células iniciadas en el segundo. Aunque es imposible equiparar de manera directa las variables en los dos procesos, la similitud de las formas de las curvas es sorprendente. La potencia relativa de los agentes promotores puede determinarse en función de su capacidad para inducir el crecimiento clonal de células iniciadas. Así, la tasa neta de crecimiento de lesiones preneoplásicas puede emplearse para determinar las potencias relativas de los agentes promotores.

Progresión. La transición desde la generación temprana de células iniciadas hasta la población de células malignas desde el punto de vista biológico, constituye la parte principal de la historia natural del desarrollo de neoplasias. Las características de la progresión maligna (tasa de crecimiento, invasividad, frecuencia de metástasis, capacidad de respuesta a hormonas y características morfológicas) varían de forma independiente conforme se desarrolla la enfermedad. Estas características se han atribuido a la inestabilidad del cariotipo durante la etapa de progresión irreversible. Las alteraciones ambientales pueden influir sobre la etapa de progresión. Por ejemplo, la exposición a agentes promotores puede alterar la expresión de genes e inducir proliferación celular. Sin embargo, como el crecimiento de la neoplasia continúa y aparece inestabilidad cariotípica, las respuestas a los factores ambientales se pueden alterar o perder. Los agentes que actúan únicamente para suscitar la transición de una célula desde la etapa de promoción hasta la de progresión suelen denominarse adecuadamente *agentes progresores*. Esos agentes tienen la característica de inducir aberraciones cromosómicas, pueden no tener

por necesidad capacidades de inicio, y en algunos casos pueden incrementar la clastogénesis relacionada con la inestabilidad cariotípica en evolución. Como con las dos etapas de inicio y promoción, la progresión espontánea puede también ocurrir. De hecho, la progresión espontánea sería favorecida altamente por la replicación celular incrementada. Los mecanismos durante la progresión que llegan a contribuir a la inestabilidad cariotípica que está surgiendo incluyen la inhibición de la actividad de topoisomerasa para reparación del ADN, amplificación de genes e integridad alterada del telómero. Al igual que las dos etapas de inicio y promoción, también llega a ocurrir progresión espontánea. De hecho, la replicación celular incrementada fomentaría mucho la progresión espontánea.^{21,22,23,24}

2.2.2. Mecanismos Celulares y Moleculares en las etapas de Carcinogénesis.

Aunque las características descriptivas y morfológicas de las etapas de la carcinogénesis son críticas para el conocimiento completo de los mecanismos moleculares de la carcinogénesis, pueden ser necesarios para el control de la enfermedad a través de la terapia racional, diagnóstico temprano y métodos de prevención razonables. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos moleculares de la carcinogénesis es incompleto.

Inicio. Al menos tres procesos son importantes en el inicio: metabolismo, reparación de ADN y proliferación celular. La perturbación de cualquiera de estas vías tiene impacto sobre el inicio. Las células iniciadas son difíciles de distinguir desde el punto de vista morfológico y fenotípico de sus homólogas normales, y las alteraciones moleculares de las cuales depende el inicio pueden ser igualmente sutiles. En la tabla 3 se enlistan un número de características mecánicas moleculares de las etapas de inicio, promoción y progresión.

Los cambios genéticos necesarios para inducir la etapa de inicio no deben ser necesariamente los que producen alteraciones cromosómicas estructurales toscas obvias o flagrantes. La variabilidad individual, las diferencias de especies, y el organotropismo de

la etapa de inicio, comprenden equilibrio del metabolismo del carcinógeno, la proliferación celular y la reparación del ADN.

Tabla 3. Algunos Mecanismos Celulares y Moleculares en Carcinogénesis Multifase.

Inicio	Promoción	Progresión
Mutaciones simples (transiciones, transversiones, deleciones pequeñas, y otras) que afectan el genoma celular.	Aumento o represión reversible de la expresión de gen mediado por receptores específicos para el agente promotor individual.	Alteraciones genéticas complejas (translocaciones cromosómicas, deleciones, amplificación de gen, recombinación y otros) originadas por inestabilidad cariotípica en evolución.
En algunas especies y tejidos, mutaciones de punto en protooncogenes u oncogenes celulares potenciales	Inhibición de la apoptosis por el agente promotor.	Cambios irreversibles de la expresión de gen fetal, expresión alterada del gen del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC), y producción ectópica de hormona.
Mutaciones en genes de vías de transducción de señal que pueden producir un fenotipo alterado.	Ninguna alteración estructural directa en el ADN por acción o metabolismo del agente promotor.	Selección de células neoplásicas para crecimiento óptimo del fenotipo/genotipo en respuesta al ambiente celular e incluso la evolución de inestabilidad del cariotipo.

2.2.3. Blancos genéticos moleculares de carcinógenos que dañan el ADN.

Aunque muchos genes son afectados por la acción de ciertos químicos carcinogénicos, se ha asumido que las mutaciones en pocos genes relativamente específicos puede ser más crítica a transformación neoplásica. Con el descubrimiento y elucidación de la función de oncogenes virales y sus contrapartes celulares, protooncogenes, la suposición original se cerró con la realidad. Tres diferentes clases de genes tienen un papel primordial en los procesos neoplásicos (Tabla 4). Aunque otros genes operativos en la reparación del ADN, metabolismo de carcinógenos y anomalías del sistema inmune generan predisposición hereditaria para el desarrollo de neoplasia, son los productos de los protooncogenes, los oncogenes celulares, y los genes supresores tumorales que se han relacionado de manera más estrecha con la transformación neoplásica.

Los oncogenes tienen actividad de manera primaria en el crecimiento celular, transducción de señales y transcripción nuclear. Se atribuyen funciones similares a genes supresores tumorales conocidos, pero, además, al menos dos genes supresores tumorales participan en la regulación del ciclo celular.

Las mutaciones en protooncogenes pueden depender de su activación, con transformación neoplásica subsiguiente similar a la que se observa después de expresión alterada de oncogenes celulares. Únicamente las mutaciones de punto, las inserciones y deleciones pequeñas, y posiblemente el estado de mutilación alterado son fenómenos que pueden originar inicio. Las alteraciones más complejas en el genoma serían características de la etapa de progresión.

La activación de protooncogenes y oncogenes celulares por mutaciones base específicas, deleciones pequeñas y mutaciones por desplazamiento de estructura depende de la síntesis de ADN en presencia de daño del ADN, incluso la presencia de aductos. El análisis de mutaciones en genes específicos en potencia comprendidos en la transformación neoplásica es posible a partir de muestras muy pequeñas mediante muestras pequeñas moleculares.

Tabla 4. Características de protooncogenes, oncogenes celulares y genes supresores tumorales.

Protooncogenes	Oncogenes celulares	Genes supresores tumorales
Dominante.	Dominante.	Recesiva.
Especificidad de tejido amplia para aparición de cáncer.	Especificidad de tejido amplia para aparición de cáncer.	Considerable especificidad de tejido para la aparición de cáncer.
La herencia de línea germinal rara vez está comprendida en la aparición de cáncer.	La herencia de línea germinal rara vez está comprendida en la aparición de cáncer.	La herencia de línea germinal suele quedar comprendida en la aparición de cáncer.
Análogo a ciertos oncogenes virales	No hay análogos conocidos en virus oncógenos.	No hay análogos conocidos en virus oncógenos
Mutaciones somáticas activadas durante todas las etapas de desarrollo neoplásico.	Mutaciones somáticas activadas durante todas las etapas de desarrollo neoplásico.	Las mutaciones de la línea germinal pueden iniciar, pero la mutación hacia neoplasia sólo ocurre durante la etapa de progresión.

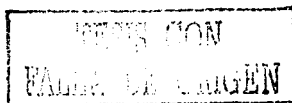


Tabla 5. Funciones de oncogenes representativos y genes supresores tumorales.

Funciones de productos genéticos.	Genes.	Localización celular.
A. Oncogenes		
Factores de crecimiento	Sis fgf	Extracelular
Receptor/proteína tirosina-quinasa	Met, neu	Extracelular/ membrana celular
Proteína tirosina-quinasa	Src, ret	Membrana celular/citoplasma
Membrana asociada a proteínas G	Ras, gip-2	Membrana celular/citoplasma
Proteína citoplasmática serina-quinasa	Raf, pim-1	Citoplasma
Factores de transcripción nuclear	Myc, fas, jun	Núcleo
Desconocido indeterminado	Bcl-2, crk	Mitocondria/citoplasma
B. Genes supresores		
Activación GTP-asa	NF1	Membrana celular/citoplasma
Ciclo celular-represor regulador nuclear transcripcional	RB-1	Núcleo
Ciclo celular- factor de transcripción nuclear	P53	Nuclear
Dedo de zinc, factor de transcripción	WT-1	Nuclear
Reparación ADN emparejado mal hecho	hMLH-1	¿Núcleo?
Dedo de zinc, factor de transcripción?	BFGA-1	Desconocido

TESIS CON
VALOR DE ORIGEN

Algunas clases de genes parecen ser apropiados como blancos para carcinógenos que dañan el ADN no está por completo claro por la función real de las mutaciones de protooncogen y oncogen celular en el establecimiento de carcinogénesis. Entre las lesiones preneoplásicas más tempranas estudiadas (tabla 6), menos de una tercera parte muestra mutaciones en la familia del gen *ras*, pero es totalmente posible que otros protooncogenes y oncogenes celulares puedan ser blancos. Las pruebas de que los genes supresores tumorales puedan ser blancos para el inicio de aparición de enfermedad maligna temprana provienen principalmente de estudios de neoplasia hereditaria por mecanismos genéticos. En estos raros cánceres hereditarios, uno de los alelos de un gen supresor tumoral contiene una mutación de línea germinal en todas las células del organismo.

Tabla 6. Mecanismos potenciales de activación de Oncogenes.

Evento	Consecuencia	Ejemplos
Mutación base en secuencias codificadas	Nuevo producto genético con actividad alterada	v- <i>onc</i> genes, carcinoma de paletilla
Supresión en secuencias no codificadas	Regulación alterada de genes normales	Transformación de fibroblasto <i>in vitro</i> .
Promoción alterada para ARN-polimerasa	Transcripción incrementada de mRNA (producción normal de genes)	Transformación celular <i>in vitro</i> , linfoma en pollos.
Inserción o sustitución con elementos de ADN repetitivos ("transposones")	Regulación alterada de genes (\sphericalangle normal?)	Tumor venéreo canino, mieloma en ratón
Translocación cromosomal	mARN alterado, nuevos genes, regulación alterada de expresión genética.	Linfoma de Burkitt en humanos, plasmacitoma en ratón.
Amplificación de genes	Expresión incrementada de genes normales	Carcinoma de colon en humanos, carcinoma de paletilla
Hipometilación del gen c- <i>onc</i>	Regulación alterada de la expresión del gen (\sphericalangle ?). gen normal.	Cáncer de colon y pulmón en humanos.

Promoción. Los agentes promotores ejercen sus efectos sobre la expresión de genes principalmente por perturbación de las vías de transducción de señal. El mecanismo de acción de agentes promotores en la alteración de la expresión de genes puede estar mediado por receptores específicos. Esta hipótesis proporciona una explicación parcial de la especificidad histica demostrada por muchos agentes promotores. El concepto receptor-ligando de la acción de estos últimos se basa en las relaciones entre dosis y respuesta que comprenden agentes farmacológicos. Las suposiciones básicas de estas interacciones arguyen que el efecto del agente es directamente proporcional al número de receptores ocupados por el ligando. La actividad intrínseca de la sustancia química, y las vías de transducción de señal disponibles en el tejido son factores importantes en la determinación del tipo de respuesta observada y del grado de la misma.

Varios agentes promotores hepáticos, incluso el fenobarbital, ciertos esteroides, y proliferaciones de peroxima, aumentan de manera selectiva la proliferación de células dentro de lesiones preneoplásicas en el hígado de rata. La habilidad de los agentes promotores a los niveles celular y molecular para aumentar de modo selectivo la proliferación celular de células preneoplásicas. El parámetro celular que se opone a la mitosis es la muerte celular programada o apoptosis. Este proceso queda inhibido de manera notoria por muchos agentes promotores, pero no se entienden bien sus mecanismos. Varios genes específicos parecen estar comprendidos en este proceso, incluso el protooncogén *c-myc*, el oncogén celular *bcl-2*, el TGF- β , y el gen supresor tumoral *p53*.^{21 22 23 24}

2.2.4. Regulación del ciclo celular.

En la figura 1 se presenta un diagrama de la integración del ciclo celular y la apoptosis con las vías de transducción de señal. Los enlaces conectivos entre la transducción de señal y el ciclo celular todavía no son muy claros. Un mecanismo crítico para la regulación de todas las fases del ciclo celular es la fosforilación de proteína. Diversas cinasas con diferentes especificidades de aminoácido y proteína controlan la activación e inactivación de genes dependientes del ciclo celular. El mecanismo molecular principal que relaciona la transducción de señal al ciclo celular es la fosforilación de diversos factores de transcripción. Una vía de proliferación celular está mediada por proteincinasas activadas por mitógeno (MAPK), que a su vez son activadas por fosforilación mediada por las vías de transducción de señal. La fosforilación de ciclinas (proteínas que son críticas en el paso de una célula por el ciclo celular) por medio de diversas cinasas dependientes de ciclina (CDK) da por resultado diferentes niveles de fosforilación durante distintas partes del ciclo celular. Esto, junto con la síntesis y desintegración rápidas de ciclinas y otras proteínas dependientes del ciclo celular, durante el ciclo, permite que este último ocurra de una manera reproducible. La producción excesiva de cualquier ciclina o cinasa dependiente de la misma, o una falta de la producción de uno de estos factores, conduce a la inestabilidad cariolípica, que es característica de la progresión. Otro gen supresor tumoral, el *p53*, también participa como un factor de transcripción, lo que evita la continuación del ciclo celular cuando hay daño del ADN. Esta pausa permite a las células reparar ese daño o, si el daño es excesivo, sufrir apoptosis. Si el gen *p53* muestra una mutación, o falta, la pausa no ocurre, y el ciclo continúa la replicación a pesar de la presencia de daño que produce mutaciones o clastogénesis. Es obvio que el enlace mecánico faltante es una clara comprensión del aumento selectivo del ciclo celular en células preneoplásicas por agentes promotores. Hay varias posibilidades, entre ellas aumento de las concentraciones de receptores o de cualesquiera de los componentes de la vía de transducción de señal, y mutaciones de factores de transcripción, ciclinas, cinasas dependientes de ciclina y otros componentes del ciclo celular.

Progresión. Esta etapa por lo general aparece a partir de células en la etapa de promoción, pero también de manera directa a partir de células normales, como resultado de la administración de dosis relativamente altas, a menudo citotóxicas, de carcinógenos completos que tienen capacidad de inducir tanto inicio como progresión. Además, la incorporación hacia el genoma, de información genética como virus oncogénicos, la transfección estable de material genético, o las alteraciones cromosómicas espontáneas pueden inducir la etapa de progresión. El principal dato característico de esta etapa es la inestabilidad cariotípica en evolución. Las células en la etapa de progresión pueden evolucionar de tal manera que las características de invasión, crecimiento metastático y anaplasia, así como la tasa de crecimiento y las respuestas a influencias hormonales cambian hacia grados cada vez mayores de enfermedad maligna. Puede entenderse que estas "características independientes" sobrevienen por cambios cariotípicos que están apareciendo de modo constante en las células durante la etapa de progresión. Estas "características" pueden incluir aspectos como la expresión de genes fetales, la expresión de las proteínas de superficie clases I y II del complejo de histocompatibilidad mayor (NCH), y la producción ectópica por células derivadas de tejidos no productores de hormonas. Puesto que la actividad cariotípica tiene pocas probabilidades de conducir directamente a mutaciones de punto en oncogenes y genes supresores tumorales, es más probable que su aparición refleje la selección de células más idóneas para el ambiente de crecimiento de una neoplasia.

La inestabilidad genética propia de esta etapa es principalmente un reflejo de las mutaciones de punto o de las amplificaciones de genes. Muchos mecanismos pueden conducir a inestabilidad cariotípica, entre ellos alteración del aparato mitótico y de la función del telómero, hipometilación de ADN, recombinación, así como amplificación de genes y transposición de los mismos.

Cuando un tumor crece, los nutrientes son provistos por difusión directa por la circulación. La invasión de un tejido local puede resultar en presión sobre tejidos normales, los cuales pueden provocar inflamación, o el tumor puede producir sustancias (colagenasas) que provocan la destrucción enzimática de tejidos. Subsecuentemente, la

síntesis del factor angiogénesis de tumores causa la formación de un suministro vascular independiente del tumor. Casi de inicio un tumor puede derramar células dentro de la circulación. Para modelos animales, esto se estima que un tumor de 1 cm derrama ≥ 1 millón de células/24 horas en la circulación venosa. La probabilidad de que una célula tumoral circulante llegue a convertirse en un tumor metastásico se estima en $\leq 1:1$ millón.

La metástasis se desarrolla cuando las células tumorales se adhieren al endotelio vascular y penetran dentro de los tejidos circundantes, sobreviviendo y engendrando tumores independientes a sitios distantes. Así, el crecimiento del tumor reinicia, interrumpiendo el tejido normal y la función del órgano. Los tumores metastásicos pueden dar origen a otras metástasis.

Los experimentos sugieren que la metástasis no es un evento aleatorio y que el tumor primario puede regular el crecimiento de tumores metastásicos (por ejemplo: en células de carcinoma renal, la velocidad de crecimiento es similar en el tumor primario y en los nódulos metastásicos). Teóricamente, la remoción del tumor primario puede resultar en un crecimiento rápido de la metástasis.

Las mutaciones en los genes son parcialmente responsables para el crecimiento y reproducción de células malignas. Estas mutaciones alteran la cantidad o comportamiento de las proteínas codificadas por genes reguladores del crecimiento y alteran la división celular. Hay dos categorías principales de genes mutados, estos son los oncogenes y los genes supresores.

Las cinéticas celulares son importantes en el diseño de regímenes de fármacos antineoplásicos. Muchos fármacos antineoplásicos son efectivos únicamente si las células están en el ciclo celular, y algunos fármacos actúan únicamente durante una fase específica del ciclo. Las cinéticas celulares pueden influenciar en los horarios de dosificación y los tiempos de los tratamientos.^{21,22,23,24}

Oncogenes. Son formas anormales de los genes que usualmente regulan el crecimiento celular. Por ejemplo, el gen *ras* es anormal en cerca del 25% de los cánceres humanos. La proteína Ras (codificada por el gen *ras*) regula o señala la división celular. En la mayoría de las situaciones el gen es inactivo, pero en estas células malignas la proteína Ras es activa y señala la división de las células, aún cuando ellas no deberían.

Otro ejemplo de la actividad oncogénica involucra a la proteína cinasa, enzima que ayuda la regulación de muchas actividades celulares, particularmente señalando de la membrana celular al núcleo, así iniciando la entrada de la célula dentro del ciclo celular y controlando algunas otras funciones. Algunos cánceres humanos (por ejemplo: cáncer de vejiga, cáncer de mama, leucemia mielocítica crónica [LMC]) contienen la enzima cinasa estructuralmente alterada. Cuando hay sobreproducción o alteración de la enzima cinasa estimula continuamente a la división celular.

Los oncogenes celulares son amplificados en algunas malignancias humanas (por ejemplo: *C-myc* y *N-myc* en células pequeñas de cáncer de pulmón, *N-myc* en neuroblastoma, *C-erb B-2* en cáncer de mama). La activación de los oncogenes no es completamente comprendida, pero muchos factores pueden contribuir, incluyendo carcinogénesis química (por ejemplo: humo del tabaco) o agentes infecciosos (por ejemplo: virus).

La activación puede resultar de la reorganización cromosomal (ADN). En el linfoma de Burkitt, t(8;14) mueve el locus *C-myc* sobre el cromosoma 8 a una posición distal para el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el cromosoma 14, incrementando la síntesis de la inmunoglobulina. En la LMC, el t(9;22) resulta en una proteína quimérica, una fusión de la porción terminal N de *bcr* y la porción terminal C de *abl*. Estas translocaciones del ADN están localizadas cerca de los genes responsables de crecimiento y proliferación celular.

Genes supresores tumorales. Normalmente suprimen el crecimiento de malignancias, por codificación para proteínas que suprimen la iniciación y crecimiento tumorales. Por ejemplo, el gen retinoblastoma (*RB*) codifica para la proteína *pRB*, la cual regula el ciclo celular por el paro en la replicación del ADN. Las mutaciones en el gen *RB*

ocurren en 30 a 40% de todos los cánceres humanos, permitiendo que las células resulten afectadas para dividirse continuamente.

Otra proteína reguladora importante, *p53*, previene la replicación de ADN dañado en células normales promueve la muerte celular (apoptosis) en células con ADN anormal. Cuando la proteína *p53* se encuentra alterada o inactiva, permite a la célula con ADN anormal, que sobreviva y se divida. Las mutaciones se pasan a células hijas, confiriendo una probabilidad alta de neoplasias. El gen *p53* aparece defectuoso en la mayoría de los cánceres humanos.

Aunque la heterogeneidad fenotípica ocurre con cualquier malignancia, genotípicamente un cáncer dado se cree que proviene de un clon de células transformadas. Los factores que finalmente causan daño genético o cambios cromosomales son desconocidos; sin embargo, la supresión, traslocación o duplicación de genes importantes da a un cáncer celular una ventaja proliferativa sobre las células normales, y un tumor puede desarrollarse.

Las anomalías cromosomales son encontradas en ciertos cánceres humanos (ver tabla 1); por ejemplo, cerca del 80% de pacientes con LMC tienen el cromosoma Filadelfia (Ph) t(9;22). Empleando G6PD como un marcador de proteínas, únicamente una sola isoenzima esta presente en RCBs y WCBs de pacientes con LMC, mientras los fibroblastos de estos pacientes contienen ambas isoenzimas. Estos descubrimientos indican que un cambio cromosomal se presenta en las células malignas. La pérdida de alelos localizados sobre los cromosomas 17p y 18p parece importante en la etiología de cáncer colorectal. La pérdida de los alelos sobre el cromosoma 17p también ha sido implicada en el cáncer de mama, gliomas, carcinoma de pulmón y osteosarcoma. Los sitios 17p y 18p han sido sugeridos como la localización de los genes supresores.

Tabla 7. Anormalidades cromosomales asociadas con cánceres humanos.

Tipo de cáncer	Anormalidad cromosomal	Tipo de cáncer	Anormalidad cromosomal
Leucemia mieloide		Tumores sólidos Adenocarcinomas	
Leucemia mielocítica crónica	t(9:22)	Cáncer de pulmón células pequeñas	3p-
Leucemia mielógena aguda con maduración	t(8:21)	Riñón	3p-
Leucemia promielocítica aguda	t(15:17)	Útero	1q-
Leucemia no linfocítica con basófilos incrementados	t(6:9)	Próstata	10q-
Leucemia monocítica aguda	11q-	Vejiga	-9 o inv 9, 11, 5
Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia	Inv 16	Colón	17q-, 18p-
Leucemia mielógena aguda relacionada con terapia	-7 o del (7q) o -5 o del (5q)	Sarcomas	
Linfomas malignos		Liposarcoma mixoide	t(12:16)
De Burkitt	t(8:14)	Sarcoma sinovial	t(x:18)
De no Hodgkin	t(14:18), t(11:14)	Rhabdomyosarcoma alveolar	t(2:13)
Leucemia linfocítica		Condrosarcoma mixoide extraesquelético	t(9:22)

Continuación Tabla 7

Leucemia linfoblástica aguda	t(1:19), t(8:14), t(8:22)	Tumor de Ewing	t(11:22)
Leucemia linfocítica crónica	t(11:14), t(14:19), t(2:14), -12	Neuroepitelioma periférico	t(11:22)
Enfermedades mieloproliferativas	+1	Misceláneos	
		Disferminoma ovárico y testicular	Inv 12
		Retinoblastoma	13q-
		Tumor de Wilsms	11p-
		Neuroblastoma	1p-
		Melanoma maligno	6q o inv6
		Mesotelioma	3p-

t= traslocación; q= ramificación larga del cromosoma; inv= inversión; p= ramificación corta del cromosoma; -= supresión; += cromosoma extra.

Un mecanismo de la conversión cromosomal del epitelio normal a cáncer se ha propuesto para la poliposis familiar del colón. Primeramente, la pérdida de un gen supresor sobre el cromosoma 5 hace al epitelio hiperproliferativo. Un cambio de metilación en el ADN resulta en un adenoma primario que el oncogen *ras* convierte a un adenoma intermediario; la pérdida del gen supresor sobre el cromosoma 18 lo convierte finalmente en un adenoma, y la pérdida de un gen en el cromosoma 17 lo convierte en cáncer. Otros cambios genéticos se requieren para que el cáncer alcance la metástasis.

El análisis cromosomal de las células cancerosas puede proveer información pronostica o terapéutica; por ejemplo, pacientes con leucemia mielógena aguda y cromosomas normales tienen un mejor pronóstico que aquellos con cromosomas

anormales. Similarmente, pacientes con una traslocación de los cromosomas t(15:17) siempre desarrollar leucemia promielocítica aguda.

En algunas enfermedades congénitas los cromosomas se rompen fácilmente, poniendo a los niños en un riesgo alto de desarrollar leucemia aguda y otros tipos de cáncer. Esto incluye al síndrome de Bloom (un desorden autonómico recesivo con enanismo, un eritema facial fotosensitivo telangiectático y características faciales), el síndrome de Fanconi, y el síndrome de Down (trisomía en el cromosoma 21).^{21,22,23,24}

2.3. QUIMIOTERAPIA, LA BÚSQUEDA DE FÁRMACOS MÁS EFECTIVOS.

El tratamiento de los tumores cancerosos puede ser desarrollado por cirugía, radioterapia, inmunoterapia, crioterapia y quimioterapia, y sus combinaciones, dependiendo del tipo de cáncer, la distribución y el estado del paciente. La cirugía es la más confiable y rápida de todas las terapias, pero únicamente es efectiva contra tumores sólidos localizados, pero presenta el riesgo de recurrencia debido al origen de la malignancia que puede ser en otro sitio del cuerpo (metástasis), o que el tumor no fue completamente extirpado. Por lo tanto, el método usado comúnmente es la quimioterapia combinada con la cirugía y la radioterapia.²⁵

El primer tratamiento sin cirugía para cáncer fue reportado por Marie y Pierre Curie hace 100 años cuando descubrieron el radio. El radio fue reconocido rápidamente por su potencial radioterapéutico. Sin embargo, algunos años después se encontró que el radio es radiotóxico y sus descubridores (Marie y su hermana Irene) murieron por las consecuencias hematológicas de la exposición al radio.

En 1909 Ehrlich promulgó el término "bala-mágica", a una quimioterapia que probó ser efectiva contra microorganismos sin afectar al huésped, cuando él sintetizó arsfenamina (Salvarsán) para el tratamiento de la sífilis.²⁶ El ejemplo del radio es una lección para recordar que cuando un nuevo fármaco se selecciona o diseña, la selectividad terapéutica es difícil de alcanzar en el caso del cáncer, debido a que las

células cancerosas y las células normales muestran similitudes bioquímicas y fisiológicas.²⁷

Durante la segunda guerra mundial se observó que los agentes alquilantes "mostazas nitrogenadas" producían hipoplasia, adelantando con ensayos en humanos con neoplasmas hematopoyéticos, leucemia y carcinomas.²⁸ Este descubrimiento impulsó la búsqueda de muchos nuevos complejos tales como otros agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de la vinca, antibióticos, hormonas y enzimas durante las décadas de los 50's y 60's.²⁹ Todos los compuestos considerados para estos estudios fueron complejos orgánicos.

Medio siglo después de los descubrimientos de Ehrlich, Barnett Rosenberg, mientras miraba el efecto de un campo eléctrico sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, observó que bajo sus condiciones experimentales (usando electrodos de platino en una solución que contenía cloruro de amonio, bajo la irradiación solar) la bacteria aumentó 300 veces su propia longitud sin división celular.³⁰ Experimentos más detallados determinaron que este efecto no fue ocasionado por el campo eléctrico, pero se formó un complejo de platino bajo tal ambiente. Rosenberg sintetizó una serie de complejos de platino con configuración *cis* los cuales mostraron actividad antitumoral notable en experimentos con animales.³¹ Fortuitamente Rosenberg descubrió la aplicación del primer quimioterapéutico metálico, *cis*-diaminodicloro platino (II) (cisplatino), el cual permanece a la fecha como uno de los fármacos anticancerígenos más exitoso. Este compuesto había sido sintetizado desde finales del siglo XIX.

El cisplatino es efectivo contra los tumores testicular, ovárico, cabeza, cuello y vesícula, prolongando la supervivencia y en la mayoría de los casos la remoción.³² Sin embargo, el cisplatino presenta serios efectos adversos, donde los más importantes son: nefrotoxicidad, ototoxicidad, mielotoxicidad, neuropatía periférica, náusea y vómito. La hidratación de los pacientes por infusión de solución salina y diuréticos permite el uso de altas dosis sin dañar los riñones.³³

La principal desventaja clínica establecida para fármacos antineoplásicos es su baja especificidad para tejidos tumorales, resultando en una toxicidad sistémica, algunos efectos adversos y velocidades lentas de curación, dando como consecuencia la

necesidad de una dosificación más alta. Esto se ha contemplado en los sistemas de liberación de fármacos (por ejemplo, microesferas, liposomas, anticuerpos o proteínas séricas, hormonas con alta afinidad para receptores hormonales en tumores, y polímeros) los cuales pueden transportar al sitio blanco del tumor al agente citotóxico mientras que los tejidos normales evitan la mayoría de los problemas de especificidad y alta toxicidad.³⁴ Tales estrategias, sin embargo, no pueden reducir la resistencia multifarmacológica inducida en ciertos tumores.³⁵ Nuevas terapias y estrategias necesitan encontrarse, particularmente debido a la resistencia a fármacos.

2.3.1. RESISTENCIA A FÁRMACOS.

La resistencia a fármacos presenta el principal obstáculo para la quimioterapia. Algunos tumores (por ejemplo, cáncer de pulmón y colon) se han reportado que son resistentes a los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, mostazas, ciclofosfamida).^{36, 37}

La mezcla heterogénea de células que forman el tejido tumoral contiene un número de células resistentes y sensitivas. Después del tratamiento las células sensitivas son eliminadas pero las células resistentes son inafectadas, quedándose activas y posiblemente proliferando más rápido como una respuesta al daño tisular.³⁵ El mecanismo de resistencia es probablemente un proceso multifactorial debido a que la resistencia a un quimioterapéutico por células tumorales puede ser comunicada por algunas otras, aún si los fármacos tienen diferentes mecanismos de acción, así se alcanza la resistencia multifarmacológica.^{36, 38} La resistencia multifarmacológica es el resultado de muchos procesos diferentes que permiten a la célula reparar el daño, eliminar, inactivar o simplemente reducir la acción del fármaco.^{36, 39} La resistencia puede tener un mecanismo pasivo o activo, dependiendo del proceso involucrado, por ejemplo, la resistencia pasiva puede ser por una disminución o mutación de las enzimas que activan el fármaco en el transporte del complejo a través de la membrana celular resultando en una baja actividad.⁴⁰ La resistencia activa, sin embargo, es la respuesta de las vías bioquímicas

para el flujo, unión, almacenamiento y transporte del fármaco en la célula, por ejemplo, un incremento en el mecanismo de reparación del ADN.^{35,41,42}

Las células eucarióticas han desarrollado una red de mecanismos, los cuales aseguran que el material genético dañado sea reparado antes de la división. Estos mecanismos involucran a el gen *p53*, y una serie de sistemas enzimáticos tales como la reparación de escisión de base (VER), la reparación de escisión de nucleótido (NER) y el sistema de reparación desigual.⁴³ Un factor común en la resistencia tumoral y su desarrollo es el resultado de mutaciones en el gen *p53*, estas mutaciones se encontraron en el 50% de los cánceres humanos.⁴⁴ La función de la proteína supresora de tumores *p53* parece ser en mantener la integridad del genoma, así como la culminación exitosa de las diferentes etapas en el ciclo celular. En la mayoría de los tumores, el gen *p53* está inactivo o incapacitado, resultando en un ciclo celular fuera de control que ignora las señales externas y que evade la apoptosis debido a que el *p53* también ayuda a desencadenar el proceso apoptótico y causa una detención en la etapa G1.^{44,45,46} Las células que exhiben resistencia al cisplatino pueden también presentar mutaciones en el gen *p53*⁴⁷, pero no como una simple adaptación debido a que otros genes pueden estar involucrados, tales como *Bcl-xl*.⁴⁸

Otros mecanismos de resistencia a fármacos metálicos se dan por un efectivo mecanismo de detoxificación, el cual involucra niveles incrementados de glutatión (GSH) o metalotioneina (MT) y una disfunción en el transporte del fármaco a través de la membrana celular, resultando en un descenso, la presencia de mecanismos de remoción que reconocen a los complejos metálicos formadores de aductos (por ejemplo, cisplatino) y los sistemas de reparación que están involucrados en el ciclo celular detienen la muerte celular.^{48 49 50 51 52}

2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.

Los fármacos antineoplásicos disponibles en la actualidad se categorizan en tres amplios grupos dependiendo de su mecanismo de acción: los que interactúan con el ADN, los que se asocian a receptores de membrana, y los que se unen a un antígeno expresado sobre la membrana celular.⁵³

Un número de mecanismos de acción incluyen:

Los antimetabolitos son fármacos que actúan como sustratos falsos en reacciones bioquímicas de la célula viviente. Estos fármacos interactúan con moléculas incapacitándolas para desarrollar sus funciones (por ejemplo: metotrexato, fluorouracilo). Los inhibidores de topoisomerasas son complejos que inhiben la actividad de las topoisomerasas, que son las enzimas responsables del desenrollamiento de la doble hélice del ADN durante la replicación, resultando en un rompimiento en el ADN y la muerte celular (por ejemplo: doxorubicina). Algunos alcaloides de plantas son también utilizados como fármacos que previenen la división celular por su unión a la proteína tubulina, la cual forma las fibras microtubulares para organizar la división cromosomal durante la replicación celular. La unión de los alcaloides a la tubulina inhibe la formación de los microtúbulos (por ejemplo: vinblastina, paclitaxel). Algunas hormonas inhiben la división celular por su interferencia con la síntesis del ADN, tales como la prednisolona, o pueden tener una actividad antagónica en el crecimiento del tumor, que depende de la actividad de la hormona, por ejemplo, tamoxifén usado para tumores dependientes de estrógenos.^{54 55}

Los agentes alquilantes forman uniones con secuencias particulares de ADN produciendo cambios estructurales en la doble hélice del ADN impidiendo su división, el resultado de estas interacciones puede también causar rompimientos en la hebra, o la activación de los mecanismos de reparación, que si no es capaz de reparar el daño, desencadena el suicidio celular (por ejemplo: ciclofosfamida, bleomicina, cisplatino).

La bleomicina es un antibiótico el cual se ha usado exitosamente contra tumores en oncología clínica. Además requiere de oxígeno molecular y de hierro o cobre como cofactores, formando un complejo metálico que en la presencia de un agente reductor o

H₂O₂ ocasiona daño en biomoléculas, principalmente en el ADN, pero también en el ARN, paredes celulares y otras moléculas pequeñas.⁵⁶

El modo de acción del cisplatino es por interacción directa con el ADN, cambiando su arreglo conformacional, por su unión a dos guaninas adyacentes (G - G) inhibiendo la replicación del ADN.^{57,58} El isómero *trans* (transplatino) es inactivo contra células tumorales, y es incapaz de formar el aducto G - G. La citotoxicidad del cisplatino contra las células en división se ha relacionado con la formación de aductos de ADN los que producen el daño en el ADN y la introducción de genes involucrados en la detención del crecimiento (familia GADD) y reparación del ADN (*p53* y *p21*). Se considera que estos genes detienen a la célula antes de la división y así reparan el daño o desencadenan el proceso apoptótico.^{57,58}

Sin embargo, el efecto adverso más significante del cisplatino es la nefrotoxicidad, y puede no relacionarse al daño a ADN o a la inhibición de la división, debido a que la velocidad de división en este órgano es muy lenta. En cambio la toxicidad renal del cisplatino se ha relacionado con su actividad sobre la mitocondria, resultando en una disfunción en la respiración y en la liberación del Ca²⁺ (59) y su unión a la tubulina resulta en la inhibición de la polimerización de microtúbulos.⁶⁰

2.3.3. COMPLEJOS METÁLICOS COMO AGENTES ANTICANCERÍGENOS.

Los metales se han utilizado en la medicina desde hace miles de años por los egipcios (más de 3000 A.C.), los chinos (entre 2500 - 2000 A.C.), y los griegos, pero permanecieron en el olvido hasta el descubrimiento del cisplatino por Rosenberg (1965) y sus primeros sucesos clínicos. Debido a que muchos nuevos compuestos de platino o con otros metales se han sintetizado y probado contra una variedad de células cancerosas y tumores. Algunos de estos complejos se han evaluado en pruebas clínicas o se encuentran ahora en el desarrollo preclínico.^{61,62,63}

Como un posible modo de actividad química, los metales pueden participar en reacciones biológicas del tipo redox (hierro y cobre)⁶⁴, recibiendo la sustitución de ligandos

con moléculas biológicas (cisplatino)⁶⁵ formando estructuras específicas alrededor del centro metálico, con reactividad específica.⁶⁶ Otros tienen isótopos radiactivos, los cuales pueden utilizarse para la caracterización de tumores o para inmunoterapia (¹³¹yodo unido a un anticuerpo).⁶⁷ Una mejor comprensión de las interacciones entre un metal o un complejo metálico con moléculas biológicas ayudaría para el diseño de complejos metálicos más específicos y efectivos para la terapia del cáncer.⁶⁸

El modo de acción del cisplatino ha inspirado el diseño de otros complejos metálicos planos y otros complejos no planos (complejos octaédricos de rutenio y rodio) que también se unen al ADN, principalmente intercalándose entre bases de pares de guanina.⁶⁹ En adición al cisplatino, algunos complejos de platino han demostrado efectividad contra diferentes tumores *in vitro* e *in vivo*, y son utilizados ahora en pruebas clínicas.

En adición a los numerosos complejos de platino sintetizados y evaluados, complejos de coordinación de otros metales tales como bismuto, germanio (IV), iridio, molibdeno, paladio, titanio (IV), rutenio (III), rodio (I, II y III), oro (III), vanadio y cobre (II) también se han evaluado. De estos los que parecen tener una actividad significativa y así utilizarlos en pruebas clínicas, son el spirogermanio, nitrato de galio, rutenio (III) indazol, *cis*-dietoxibis(1-fenilbutano-1,3-dionato) titanio (IV) (budotitano), y titanoceno dicloruro.^{32 63 66.70}

Los complejos metálicos varían ampliamente en su actividad biológica y sus mecanismos de acción dependiendo de su estructura química, ligantes, resistencia y estabilidad, forma metálica y configuración. Muchos de ellos son complejos de coordinación con una estructura cuadrada plana, en donde el metal forma el centro de la molécula.³² Así el ligante también puede determinar el modo de acción dependiendo de sus propiedades de enlace. Si el complejo es altamente estable y puede interactuar con moléculas hidrofóbicas uniendo al metal consigo (membranas y moléculas con carga como el ADN). Si este enlace es débil, puede ser intercambiado por agua, nucleobases o grupos sulfuro.⁷¹

Mientras el principal modo de acción del cisplatino se ha relacionado a su unión con ADN, el ARN también puede ser un blanco, resultando en la inhibición o transcripción.⁷²

Sin embargo, el cisplatino puede interactuar con otros componentes celulares y estructuras tales como proteínas, enzimas y mitocondrias^{59,60} o interferir en el proceso metabólico por su unión a ATP o GTP. La morfología del epitelio tubular del riñón después del tratamiento con cisplatino indica un daño mitocondrial significativo suponiendo que su citotoxicidad también involucra efectos sobre el sistema de la cadena respiratoria.⁵⁹

Algunos de estos complejos metálicos se han evaluado en tumores y células cancerosas, con en espera de pruebas clínicas. Sin embargo, también han mostrado ser tóxicos, este es quizás el principal factor limitante para su liberación final en el tratamiento en humanos.

2.3.3.1. TOXICIDAD DE QUIMIOTERAPÉUTICOS BASADOS EN METALES.

Antes del descubrimiento del cisplatino, los metales de transición fueron considerados como tóxicos no selectivos y así se evitó su uso en medicina. Después de su descubrimiento como un fármaco anticancerígeno potente, dos problemas principales se desencadenaron, su alta toxicidad y la resistencia adquirida por algunos tumores. Los principales efectos adversos son la nefrotoxicidad (necrosis tubular aguda en el empalme cortico medular del riñón); ototoxicidad (pérdida de la alta frecuencia auditiva); neurotoxicidad (neuropatía periférica) y toxicidad hematológica se han observado en la mayoría de los pacientes tratados con cisplatino, así como también vómito y náusea severos.^{40 65,73} Es posible que la nefrotoxicidad del cisplatino se aumente por otros iones metálicos (hierro y cobre) los cuales llegan a ser desplazados de sus depósitos induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO).^{74,75,76} Un análogo del cisplatino, el carboplatino, también presenta efectos adversos tales como la mielosupresión, neuropenia y trombocitopenia, y anemia, junto a la nefrotoxicidad, pero su toxicidad es significativamente más baja que el complejo padre.⁴⁰

El principal sitio de acción de los complejos de platino es la unión al ADN y ARN, inhibiendo la división celular. Sin embargo su toxicidad está directamente relacionada a células que sufren división constante, tales como los folicúlos del cabello, células

reproductivas, médula ósea y mucosa gastrointestinal.⁷⁵ Sin embargo, otros blancos moleculares también se asocian con la toxicidad del platino. Estos incluyen su unión a fosfolípidos y proteínas de la membrana plasmática que inducen cambios estructurales en la membrana y daño por lipoperoxidación, desactivación de enzimas por interacciones con el grupo sulfhídrido en sus sitios activos, y cambios en la estructura y actividad funcional por la unión a la estructura del citoesqueleto (tubulina), inhibiendo la polimerización y la despolimerización.⁶⁰

Los efectos tóxicos del nitrato de galio incluyen pneumonitis, peritonitis, lesión en hígado, y daño tubular renal en ratas y ratones. *In vitro* inhibe a las polimerasas del ADN y ARN, así como a la proteína reguladora del crecimiento de membrana, tirosina fosfatasa. Los complejos de oro producen efectos adversos sobre el corazón y los pulmones, y los complejos de rutenio muestran alguna toxicidad ligera en hígado y riñón, así como anemia. Mientras que los complejos de cobre, tales como el *trans*-[bis(saliciladoximato)cobre (II)] causa fiebre, cansancio y ceguera.^{32,77}

Por ejemplo, el cisplatino presenta sus primeros efectos adversos después de su tratamiento como toxicidad gastrointestinal (náusea y vómito, ulceraciones oral e intestinal, diarrea). Más tarde pueden causar supresión de médula ósea e inmunosupresión (lo que incrementa el riesgo de infecciones oportunistas). Otros efectos menos comunes son reacciones en piel, alopecia y toxicidad sobre los tejidos hepático, pulmonar, cardiaco, genitourinario y nervioso central. En algunos casos pueden presentarse esterilidad y malformaciones congénitas, esto probablemente ocurre debido a que los compuestos anticancerígenos pueden producir mutaciones^{36,60,78}, llegando a ser una fuente para malignancias secundarias.^{79,80}

La toxicidad de los complejos metálicos varía, como su actividad antineoplásica y modo de acción, dependiendo de su especificación (forma química, estado de oxidación y estado de unión) en los sistemas biológicos.⁸¹ Los complejos metálicos que tienen alta afinidad por grupos SH así como por la unión por cadenas dobles, la disponibilidad de tales ligandos determinan las interacciones entre el complejo y las estructuras que los soportan, así como la fuerza de la interacción.⁸²

2.3.3.2. TOXICIDAD DE METALES.

Los complejos metálicos pueden sacar a un componente de su toxicidad hasta su centro metálico puro debido a la disociación del complejo o por blancos específicos de tejidos o compartimentos donde los metales se pueden liberar.

Los metales normalmente entran al cuerpo por ingestión, y en pocos casos por absorción en piel e inhalación. Desde el tracto gastrointestinal, los metales son absorbidos y distribuidos a través del cuerpo por la circulación, principalmente por las proteínas del plasma (albúmina y transferrina) donde ellos forman enlaces débiles hasta su liberación en el tejido blanco.⁸³ Esto también se aplica para fármacos con metales los cuales se absorben por el tracto gastrointestinal o se han inyectado en la circulación (i.v.) donde pueden unirse a las proteínas del plasma, principalmente a la albúmina.³⁴

La toxicidad del metal es también el resultado de los atributos físico-químicos comunes de los iones metálicos. Por ejemplo, la toxicidad del plomo y cadmio se ha relacionado con su capacidad para reemplazar al calcio en proteínas esenciales o lípidos causando efectos de transformación.⁸² Otros metales como el mercurio tienen alta afinidad por sitios de cisteína, en donde pueden reemplazar a los iones de cobre o zinc, resultando en la desactivación de las enzimas.

La toxicidad del metal se relaciona también con su especificación, donde algunas formas químicas son inactivas mientras que otras pueden ser tóxicas, algunas formas se absorben mientras que otras no. Su actividad depende del metal, el ligando o ambos.⁸⁴ Se ha demostrado que la toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad de un metal depende de su forma química, así como de su potencial para interactuar con las biomoléculas. Los complejos organometálicos en algunos casos disminuyen (cobre-cisteína) o exceden por mucho la toxicidad de estas formas inorgánicas de los metales que les dan origen.^{81 85 86}

Los metales de transición y sus complejos pueden causar daño celular catalizando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).⁸⁷ El hierro, cobre, cromo, cobalto, níquel y vanadio presentan electrones no apareados y pueden comportarse como donadores y aceptores de electrones, un ambiente perfecto para catalizar reacciones con

oxígeno y moléculas orgánicas (lípidos). Tal capacidad de los metales para participar en reacciones de óxido-reducción se ha utilizado por todas las especies de organismos vivientes, donde las moléculas que contienen metales desarrollan las tareas más difíciles en el metabolismo, así como la generación de energía. El hierro, zinc y cobre están presentes en los sitios catalíticos de muchas enzimas, y su actividad y estructura dependen completamente del metal correcto en su forma química adecuada.⁸⁸ Debido a la reactividad de tales metales no es sorprendente que una vez absorbidos, son inactivados efectivamente por aparecer fuertemente unidos para su transporte, almacenamiento y eliminación.^{89,90} Así los metales o complejos metálicos afectan a esos órganos involucrados en su transporte, almacenamiento, disposición y excreción (intestino, hígado y riñón), así como tejidos con alta sensibilidad a ellos (cerebro).

Los sistemas biológicos utilizan acarreadores y moléculas de almacenamiento que por un lado protegen de la reactividad de un metal (hierro) y por otro lado son capaces de donar a otras células (la transferrina recoge al hierro del hígado y plasma y lo transporta a otros tejidos) o por la incorporación específica en el sitio activo de la enzima y otras macromoléculas (hemoglobina, catalasa).

La deficiencia en el transporte o eliminación de los metales en el cuerpo lleva a daño catastrófico para las biomoléculas, por ejemplo, la deficiencia en el transporte de cobre conduce a la cirrosis hepática, síntomas neurológicos y cáncer prematuro en pacientes con la enfermedad de Wilson. Los excesos de iones cobre, hierro o cromo "libres" pueden participar en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en reacciones de Fenton generando el grupo altamente reactivo hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el cual es capaz de degradar proteínas, lípidos y ADN.^{91,92,93} La generación incontrolada de ERO se ha asociado con carcinogénesis, mutagénesis, citotoxicidad, algunas enfermedades (Parkinson, Alzheimer, aterosclerosis) y al proceso del envejecimiento.^{89,94,95,96}

2.3.4. 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.²²

La mayor parte de los agentes antineoplásicos actúan específicamente sobre procesos como la síntesis de ADN, la transcripción o la función del huso mitótico y por ende se les considera específicos del ciclo celular.^{22,23}

La razón para la búsqueda de nuevos compuestos se basa en el deseo de encontrar compuestos con las siguientes características:

- 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.^{97,98,99}

Dentro de las nuevas moléculas con actividad citostática y antineoplásica se tiene a las casiopeinas. La familia de las casiopeínas contiene cobre (II) como metal, y en la esfera de coordinación tienen dos ligantes bidentados, uno de ellos es una diimina (N-N) y el otro puede ser un aminoacidato (N-O) o donador (O-O), cuya fórmula general es

$[\text{Cu}(\text{NN})(\text{ON})]\text{NO}_3$ o $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{OO})]\text{NO}_3$.⁴ Para la obtención de estos complejos se ha considerado que el metal presenta una toxicidad relativamente baja, que su estado de oxidación sea similar al de los metales que se encuentran en los fluidos biológicos. Por otro lado, los ligantes deben tener la capacidad de formar quelatos y cierto grado de hidrofiliicidad e hidrofobicidad. Según estas características 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.^{1,2,3}

De acuerdo a estudios realizados con cisplatino se ha encontrado que los compuestos de coordinación que cumplan con los siguientes postulados tienen potencial antineoplásico:

- 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, a excepción del postulado b, además de tener un buen efecto antineoplásico lento en las pruebas *in vitro* como *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.^{97,98,99}

Actualmente se han sintetizado más de 100 compuestos, los cuales se han agrupado en subfamilias Casiopeína I, Casiopeína II, Casiopeína III, Casiopeína VIII. Estas subfamilias de casiopeínas son tóxicas para bacterias y han demostrado ser activas contra algunas líneas celulares tumorales *in vitro* (L1210 y CaLo)^{5,6} y tumores implantados en

ratón (sarcoma S180, melanoma melanótico B16, tumor de Lewis, LW-1, y leucemia linfoide L1210.⁴

El modo de acción de las casiopeínas es todavía desconocido, pero estudios *in vitro* sugieren que el complejo se une con el ADN.

2.3.4.1. CASIOPEÍNA IIGLY.

La casiopeína Iigly nitrato de acua 4,7-dimetil- 1,10- fenantrolina, glicina, cobre (II) (P.M.: 423.5 gr/mol; pka: 5.4) ha mostrado actividad antineoplásica y una toxicidad menor hacia las células sanas que el cis-platino; se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo Calo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxico e induce apoptosis. El efecto más serio *in vivo* de la casiopeína Iigly es la hemólisis de glóbulos rojos, la cual se debe a la toxicidad del cobre.¹⁰⁰

La casiopeína Iigly tiene un modo de acción diferente comparada con el cisplatino, en un estudio, células resistentes y células sensibles al cisplatino (L1210 leucemia murina y CH1 carcinoma ovárico, respectivamente) ambas fueron tratadas con casiopeína Iigly a la misma concentración, y se encontró que ambos tipos celulares no sobrevivieron.¹⁰⁰ Esto debe considerarse apropiado debido a que existe la necesidad de fármacos activos contra tumores con resistencia multifarmacológica, los cuales involucran nuevas vías de citotoxicidad.⁷¹ La casiopeína Iigly reduce la expresión de metalotioneina, la cual es uno de los medios conocidos usados por las células cancerosas resistentes para eliminar a los fármacos anticancerígenos basados en metales.⁴⁸ También se une al ADN y aunque esto no es único, lo novedoso de su actividad puede deberse a que reacciona con agentes reductores y rompe la molécula de doble hélice en lugar de inhibir la replicación por cambios estructurales sobre la molécula del ADN o aumentando la reparación del ADN.^{101 102. 103 104}

Siguiendo un destino lógico después de una administración intravenosa, la casiopeína Iigly se une libremente a proteínas, tal como la albúmina, en la mayor parte

probablemente vía el centro de cobre.¹⁰⁵ Esto supondría que la mitad de la glicina es sustituida por un ligante más fuerte, que se une al centro de cobre y a la esfera de fenantrolina. Hay alguna evidencia de que la glicina de la casiopeína IIgly es desplazada inmediatamente después de una administración *i.v.* en ratón e *in vitro* en presencia de proteínas.¹⁰⁶

La unión de la casiopeína II gly a proteínas parece ser relativamente débil debido a que el complejo muestra más afinidad por membranas celulares, como resultado de la lipofiliidad de la fenantrolina.¹⁰⁷ Sobre el mecanismo para atravesar la membrana plasmática, puede reaccionar con receptores de membrana, proteínas de membrana y lípidos de membrana, particularmente ácidos grasos insaturados, los cuales son susceptibles de oxidación por cobre.^{106,107} Se ha reportado hemólisis de glóbulos rojos, oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y daño por lipoperoxidación, lo que sugiere que el daño en membranas puede ser un componente significativo de la citotoxicidad de la casiopeína IIgly.¹⁰⁸

Si el traslado a través de la membrana es rápido, la casiopeína IIgly puede alcanzar el interior de la célula como un complejo intacto, donde puede unirse a proteínas y lípidos citosólicos, reacciona con organelos celulares (mitocondria), pequeñas moléculas tales como glutatión, ácido ascórbico, aminoácidos, enzimas que contienen metales, proteínas (hemoglobina), ARN y posiblemente ADN, y también interfiere en los procesos metabólicos (generación de ATP). Es posible que cuando el complejo (Cu-fenantrolina) alcanza el núcleo u otras estructuras, previamente se une a una serie de moléculas. Algunas de estas moléculas son el medio de protección de la célula contra la toxicidad de metales, pero la presencia del ligante hace esta unión débil, y permite a la molécula reaccionar con otras moléculas presentes con una afinidad igual o más alta (O_2^-) formando moléculas de reactividad diferente (H_2O_2 o $\cdot OH$)¹⁰⁸

El mayor efecto adverso *in vivo* producido después del tratamiento con casiopeína IIgly (dosis de 5 mg/Kg) es la hemólisis aguda.¹⁰⁹ Esto puede explicarse por la alta afinidad de la casiopeína IIgly por estructuras hidrofóbicas (membranas) entrando rápidamente en la célula más cercana, resultando en una dosis alta del complejo de cobre en eritrocitos, los cuales son las células más expuestas durante la administración *i.v.* de la casiopeína

Ilgly. Los eritrocitos son células muy susceptibles al ataque del cobre debido a su contenido de oxígeno y la oxidación de la hemoglobina, los que pueden beneficiar a la lipoperoxidación y la hemólisis.¹¹⁰ La oxidación de la hemoglobina es posible únicamente después de la disminución de los mecanismos enzimáticos de protección (superóxido dismutasa Cu/Zn [SOD] y catalasa) que se observan *in vivo* antes de la hemólisis. La hemólisis es el resultado del daño oxidativo a la membrana celular, la oxidación de hemoglobina y la disminución de SOD, con los glóbulos rojos lisados se perpetúa una reacción en cadena a otras células.

Es también notable que el complejo (o al menos el ligante fenantrolina) puede metabolizarse, principalmente por isoformas de P450 debido a su estructura aromática plana. Hay alguna evidencia para la inducción de P450 por casiopeína Ilgly y fenantrolina *in vivo*, que sugiere que el ligante fenantrolina y no necesariamente el complejo entero puede ser metabolizado.¹¹¹

La alta reactividad de la casiopeína Ilgly como el resultado de cambios en su estado químico (Cu^{2+} a Cu^+) puede involucrar una vida corta. Debido a la alta reactividad de la casiopeína Ilgly, forma especies reactivas de oxígeno (ERO) o reacciona con biomoléculas (grupos SH), produciendo lesiones en tales moléculas. Una de las razones para la toxicidad de la casiopeína Ilgly puede ser el insulto inmediato a las moléculas vecinas, produciendo daño sobre la membrana celular y más adelante a otras moléculas internas (ADN) o estructuras (mitocondria).

La casiopeína Ilgly como muchos otros complejos de metales de transición, muestra actividad antineoplásica y no sorprendentemente citotoxicidad también. Esto es el resultado de la falta de especificidad para el tipo de células que ataca. Posiblemente una molécula acarreadora (liposoma, hormona, proteína o anticuerpo) podrían utilizarse para ayudar a la casiopeína Ilgly a tener mayor especificidad sobre las células blanco en sistemas biológicos.¹⁰⁸

Se ha demostrado que el complejo ataca una variedad de sitios blanco por su unión y reactividad con las moléculas de la estructura. Esta propiedad de unión de la casiopeína Ilgly le permite la formación de aductos de ADN y deformaciones (torceduras en la doble hélice), también el acoplamiento cruzado de ADN-proteína, proteína-proteína, o puentes

peptídicos (S-S) inactivan la replicación, algunas proteínas, receptores o estructuras enzimáticas. Lo cual en paralelo para la generación de ERO, produce cambios estructurales que incapacitan a las vías metabólicas celulares vitales, la integridad celular y destruyen por necrosis o desencadenando la muerte celular programada.^{112,113} Esta reactividad de la casiopeína IIgly le permite actuar de forma diferente dependiendo del tipo celular y de la concentración del fármaco, así como de otras sustancias presentes (agentes reductores), y efectivamente determinan la forma de la muerte celular (necrosis o apoptosis).

Mientras que la generación de ERO por la casiopeína IIgly le permite el daño y muerte celulares en procesos como la apoptosis, falla respiratoria y trastornos en membrana, los cuales serían atractivos si ocurrieran más específicamente en células cancerosas. No hay evidencia clara de blancos específicos por casiopeína IIgly a células tumorales, pero la sensibilidad de estas células puede resultar en sus niveles bajos de mecanismos protectivos (SOD) y mutaciones en los sistemas de reparación además de su desarrollo activo. En realidad, el principal problema observado con casiopeína IIgly es que debido a su rápida reactividad no puede ser específica para células cancerosas, como un complejo intacto. Tal reactividad reduciría la efectividad de la casiopeína IIgly como un fármaco quimioterapéutico.¹⁰⁸

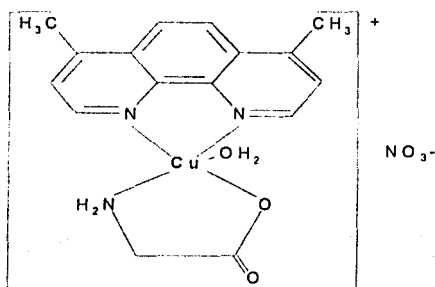


Figura 2. Estructura de la Casiopeína IIgly. [Acua (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicina) Cu (II) NO₃

2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es la técnica más común para la separación y medición de muchos compuestos diferentes con cambios químicos pequeños en sus estructuras. La CLAR se ha utilizado para analizar muchos analitos diferentes debido a su alta fuerza resolutive. Se pueden separar compuestos si estos muestran afinidad diferente entre dos fases. La primera fase se denomina fase estacionaria, la cual está contenida dentro de la columna, su forma depende del tipo de columna. La segunda fase se denomina fase móvil, esta fase es el (los) solvente(s) usados para eluir los complejos en la columna. Tales separaciones se basan en interacciones hidrofóbicas, adsorción, intercambio iónico y tamaño molecular dependiendo de la fase estacionaria seleccionada.

En CLAR de fase reversa, la fase móvil es polar (solvente) y la fase estacionaria es no polar (silica gel unido a cadenas de 18 carbonos). Este es el mecanismo más común de separación desde que se usa una fase móvil acuosa siguiendo la manipulación de condiciones tales como pH y fuerza iónica para acelerar o retardar la elusión de las sustancias bajo estudio.

La separación de metales, sus quelantes y complejos metálicos se ha estudiado por CLAR y se considera una técnica promisoría para trazas metálicas, fármacos metálicos y determinaciones tóxicas de metales¹². Sin embargo, el bajo recobro de metales también se ha observado en los sistemas de CLAR, lo cual sugiere interacciones entre la fase estacionaria y los metales.

Los avances en la instrumentación, columnas, etc. La preparación de muestras es necesaria esencialmente cuando se trata de muestras biológicas. Los procedimientos más comunes son la extracción en fase sólida (EFS) y la extracción líquido-líquido. Sin embargo, se han encontrado muchos problemas debido a los cambios en la estabilidad de los complejos metálicos y quelantes, tales como baja resolución y recobro de algunos iones metálicos.¹²

2.5. PRUEBAS PRECLÍNICAS 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 en animales preceden siempre el inicio de estudios en humanos.⁹

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 en estudio se da por terminado o se suspende.⁹

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 proveen 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.^{9,10}

Los estudios en animales se desarrollan antes y durante los estudios clínicos, el término "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 efecto del fármaco en humanos.^{9,10,11}

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.^{9,10,11}

2.5.1. 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).^{9,10}

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 pruebas en animales y para cada clase de fármacos específicos, así como, el uso de tecnologías computarizadas para el análisis de los datos no clínicos.^{9,10}

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 éstas 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 las 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.^{9 10,11}

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 diálogo con FDA para revisar el tipo y número de pruebas no clínicas requeridas, estas se consideran de acuerdo a factores importantes como son:^{9 10,11}

- Estructura química del fármaco y la similitud 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).

2.5.2. 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.^{9,10,11}

2.5.2.1. 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.^{9,10}

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.^{9,10} 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.

Los valores farmacocinéticos más importantes de un fármaco son: volumen de distribución (Vd), depuración o aclaramiento (Cl), constante de velocidad de absorción (k_a), área bajo la curva (ABC), tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$), constante de velocidad de eliminación (k_e o β), concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo para alcanzar la concentración máxima (T_{max}), momento del área bajo la curva (ABCM), determinación del número de compartimentos y determinación del tipo de cinética al intervalo de dosificación, sirven para determinar el comportamiento de un fármaco dentro del organismo y conocer su farmacocinética. La farmacocinética sirve para conocer la dinámica de absorción, distribución, metabolismo y excreción, explica las fluctuaciones plasmáticas, urinarias, histológicas, etc., de los fármacos.

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 espectroscopía de masa del fármaco inalterado y/o metabolitos en tejidos o fluidos.^{9,10}

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 (F, fracción del fármaco que llega a la 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 (Vd) 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 o depuración (Cl), representa la capacidad del organismo para eliminar el fármaco. El concepto representa la velocidad de eliminación del fármaco en 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.^{9,10}

2.5.2.2. ESTUDIOS DE TOXICIDAD.

Dependiendo de la naturaleza del fármaco, usos y datos de estudios anteriores se determina el programa de estudios toxicológicos que pueden incluir todos o algunos de los estudios siguientes:^{9,10,11}

- Estudios de toxicidad aguda.
- Estudios de toxicidad subaguda o subcrónica.

- Estudios de toxicidad crónica.
- Estudios de carcinogenética.
- Estudios de toxicidad especial.
- Estudios de toxicidad reproductiva.
- Estudios de genotoxicidad.
- Estudios de toxicocinética.

2.6. FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA DEL CIS-PLATINO.

a) Cuando se les administró cisplatino a ratas, los niveles plasmáticos del fármaco mostraron un patrón difásico. La vida media del cisplatino en la fase α fue de 0.23 horas, y en la fase β , de 16.3 horas.

b) Cuando se les administró cisplatino a ratas diariamente por 14 y 21 días, la vida media del cisplatino en la fase β en la sangre, después de la inyección final en el periodo de 14 días, fue de 15.3 horas, y en el periodo de 21 días, fue de 18.9 horas; estas vidas medias no difieren significativamente de la contraparte, siguiente a la administración de una dosis simple de cisplatino.

Durante el periodo de 14 días, el nivel plasmático de cisplatino, permaneció similar al determinado después de la administración de la dosis simple. Mientras el nivel del día final del periodo de 21 días de tratamiento se mantuvo por arriba del nivel del día final del tratamiento del periodo de 14 días.

c) Cuando se les administró cisplatino a perros, los niveles plasmáticos de cisplatino mostraron un patrón difásico, siendo las vidas medias de cisplatino en las fases respectivas 0.26 y 92.9 horas. Cuando el cisplatino en el plasma era fraccionado en las formas unido a proteínas y desunido a proteínas, casi toda la porción de cisplatino en la fase α estaba desunida a proteínas, y en la fase β estaba unida a proteínas.

Cuando se administró cisplatino diariamente por infusión i.v., el nivel plasmático llegó a meseta en 3 días. El nivel plasmático de cisplatino 4 horas después de la inyección final, en la administración de 5 días fue 4.1 veces tan alto como el posterior a la

administración del primer día. La vida media del cisplatino en la fase β a este nivel, fue dos veces tan alta como la posterior a la administración de la dosis simple.

d) Cuando se administró cisplatino por infusión i.v., el nivel plasmático del agente mostró un patrón similar al posterior a la administración de la dosis simple.

e) Cuando se les administró cisplatino a ratas, los niveles de cisplatino en la piel, tracto urinario, riñones, glándulas adrenales y contenidos intestinales fueron mayores que en el plasma 30 minutos después de la administración.

Especialmente, los niveles de cisplatino en los riñones y en el tracto urinario fueron 5 veces el nivel plasmático. El nivel plasmático de cisplatino descendió constantemente con el paso del tiempo, mientras los niveles de cisplatino en los órganos descendieron lentamente. Se distribuyeron grandes cantidades en estos órganos blanco, el tracto urinario y la próstata, mientras que apenas se determinó en los testículos.

f) Cuando el cisplatino se administró diariamente, los niveles en los tejidos y órganos tendieron a aumentar, comparados con los posteriores a la administración de una dosis simple.

Los niveles en riñones, hígado y tracto urinario permanecieron altos y especialmente los de los riñones e hígado prácticamente no mostraron tendencia a decrecer.

Se retuvo cisplatino en la próstata, uno de los órganos blanco, mientras que después de la administración de la dosis simple, no se encontró en los testículos. Tampoco se encontró en el cerebro, sugiriendo que el cisplatino no pasa a través de la barrera hematoencefálica.

g) Cuando a ratas hembras se les administró cisplatino, los niveles en ovarios, útero y otros órganos blanco fueron mayores a los niveles plasmáticos, y permanecieron altos aún a una semana después de la administración. Cuando a los animales se les administró cisplatino diariamente los niveles en los ovarios y útero no descendieron con el paso del tiempo.

h) Cuando a ratas preñadas se les administró cisplatino, se determinó que solamente el 0.5% de las dosis totales administradas, se habían transferido a los fetos.

El nivel de cisplatino en el líquido amniótico permaneció por debajo del límite cuantificable, mientras que el nivel en placenta fue más alto que el nivel plasmático, y este nivel permaneció aún 24 horas después de la administración, lo cual sugiere que la placenta puede prevenir que el cisplatino sea transferido a los fetos.

i) La adición de cisplatino al plasma humano resultó en la formación de cisplatino unido a albúmina y globulina. Cuando el producto de la reacción se fraccionó por ultrafiltración en cisplatino unido a proteínas y no unido a proteínas, el cisplatino en el filtrado descendió con el paso del tiempo.

Este descubrimiento prueba que el cisplatino se une a proteínas a un rango determinado. El filtrado contenía 4 metabolitos desconocidos y ninguno de ellos pudo ser identificado.

j) La constante de unión del cisplatino a albúmina sérica K, fue de 1.15×10^4 , y la cantidad máxima de unión N, fue de 3.3.

k) Cuando se les administró cisplatino a perros, y la orina fue extraída y purificada cromatográficamente a las 8 horas de la administración, se encontraron 3 clases de metabolitos con un P.M. de 1 000 o menor.

Como el cisplatino se une rápidamente a la albúmina y a las globulinas en la sangre, estos metabolitos presumiblemente podrían ser complejos de cisplatino con aminoácidos.

l) Cuando se les administró cisplatino a ratas normales, con cáncer y preñadas, el rango de recuperación urinario de cisplatino a las 24 horas fue de aproximadamente 30%, y el rango de recuperación urinario a las 48 horas fue del 50% en todos estos tipos de ratas.

Cuando a tales ratas se les administró cisplatino diariamente durante 21 días, el rango de recuperación urinaria de cisplatino a las 24 horas, después de la administración diaria, se encontró en el rango del 30–40% en la mayoría. El rango de recuperación fecal de cisplatino a las 48 horas no fue más de 1% tanto después de la administración de la dosis diaria

m) Cuando se les administró cisplatino a ratas, el 6.8% de la dosis administrada de cisplatino fue excretado en bilis durante las 48 horas siguientes a la administración.

Cuando la bilis de las ratas dosificadas con cisplatino fue mandada al duodeno, el cisplatino no fue excretado en heces.

n) Cuando se les administró cisplatino a perros en una sola inyección, el rango de recuperación urinaria a las 24 horas fue del 62%. Cuando la misma dosis fue administrada durante una hora, el rango de recuperación urinaria a las 24 horas fue del 20% y el rango de recuperación urinaria a las 92 horas fue del 37.8%, el cual es 20% más bajo que el rango después de la administración de una dosis única en una sola inyección.

o) Cuando se les administró cisplatino a perros diariamente durante 5 días, el rango de recuperación urinario después de cada administración permanece constante mayormente en el rango del 11-15%. Estos valores fueron solo $\frac{1}{4}$ de la administración de una dosis simple.⁴⁰

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

3.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los países desarrollados y subdesarrollados las principales amenazas contra la vida son las enfermedades cardiacas, el cáncer y la aterosclerosis, que principalmente atacan de los 50 años en adelante.

El cáncer o neoplasias malignas, constituyen un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales que no son susceptibles a las señales de control de células normales del organismo. Este crecimiento sin restricciones como la diferenciación, limitación del tamaño del órgano, regulación hormonal, etc., permite que las células se infiltren en tejidos adyacentes destruyéndolos y frecuentemente sean capaces de inducir metástasis regionales y/o a distancia.

Es importante señalar que el cáncer constituye hoy día un problema de salud pública no solo en México, sino en todo el mundo. En nuestro país ocupó en 1995 el 2º lugar como causa de mortalidad, siendo responsable del 11.2% de las muertes ocurridas en ese año (48 222). Con base en los datos anteriores se plantea que el cáncer es un problema de salud muy importante y que la quimioterapia es uno de los tratamientos que se utilizan para evitar esta enfermedad, por lo que es necesario encontrar fármacos que actúen de manera selectiva sobre las células cancerosas. La búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticancerígena es un esfuerzo justificado dada la importancia de este grupo de enfermedades en el mundo entero y en nuestro país, este problema cobra una mayor relevancia debida a la situación de la industria farmacéutica, ya que la terapia anticancerígena es toda de importación lo que aumenta su costo.

Por lo anterior, la casiopeina II gly se ha mostrado como un fármaco con actividad antineoplásica y con una toxicidad menor hacia células sanas comparada con el cisplatino. Ésta se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, Calo, murinas de leucemia L1210, S180, B16 y LW1, es citotóxico e induce apoptosis.

La evaluación de fármacos requiere de diferentes pruebas experimentales para determinar tanto su actividad biológica, eficacia, especificidad, farmacocinética,

Planteamiento del Problema e Hipótesis

farmacodinamia, toxicidad y su mecanismo de acción. En el caso de fármacos antineoplásicos, la evaluación preclínica requiere de diferentes pruebas experimentales con las cuales se puedan determinar los efectos que se producen sobre las funciones celulares involucradas en la inhibición del desarrollo de neoplasias.

Con base en los objetivos de la farmacología preclínica para fármacos antineoplásicos, las pautas a seguir son las siguientes: desarrollo de métodos analíticos sensibles; determinación del grado de unión a proteínas plasmáticas; determinación del metabolismo *in vitro* e *in vivo*, e identificación del metabolismo gastrointestinal; definición de un esquema de dosificación óptimo; determinación del perfil farmacocinético y la información acerca de la absorción, metabolismo y excreción en varias especies; así como la correlación entre la concentración plasmática (C_p) y/o área bajo la curva (ABC) con la seguridad, eficacia y toxicidad del fármaco en desarrollo.

Para cubrir con lo anterior se llevaron a cabo ensayos farmacológicos y toxicológicos, en los cuales se involucraron al menos a dos especies animales, roedores y no roedores así como la vía, el esquema de dosificación y la farmacocinética en estas especies

Con base en este marco, es que se plantea el siguiente trabajo, con el desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de la casiopeína IIgly en plasma de ratas, que nos permita realizar estudios de farmacocinética preclínica en una especie de roedores (ratas); con los parámetros obtenidos de este estudio (Cl, Vd, $T_{1/2}$, etc.), se tendrá el comportamiento de la casiopeína IIgly en el organismo del roedor, y con esto se ayudará al escalamiento de dosis en otras especies para determinar la eficacia y seguridad de este fármaco en estudios posteriores y así poder iniciar la fase clínica, con lo que se ayudaría a optimizar el tratamiento del cáncer en nuestro país

3.2. HIPÓTESIS.

Ho: El comportamiento farmacocinético de la casiopeína Igly podrá ajustarse a un modelo compartimental lineal.

CAPÍTULO IV.

OBJETIVOS Y PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. OBJETIVOS.

- Desarrollar, implementar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), para la cuantificación de la casiopeína IIgly en plasma de ratas.
- Determinar la farmacocinética preclínica de la casiopeína IIgly en ratas.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL.

4.2.1. REACTIVOS.

- Casiopeína Ilgly, lote Meb 138, sintetizada en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Metanol, grado HPLC, TecnoLab.
- Heparina, solución inyectable, Inhepar, 1000 UI/mL, ampolleta c/10 mL, Laboratorios Pisa, S.A.
- Ácido acético glacial ACS, JT Baker, cat. No. 9507-02, 1 Lt.
- Prednisona, estándar de referencia USP.
- Ácido hexansulfónico (sal sódica) CRETIB.
- Agua desionizada, grado Millipore, 18 Megaohms-cm.
- Solución glucosada al 5%, Dextrabott al 5%, lote No. 58-524MC3, No. F203, 500 mL. Abbott Laboratories de México, S.A. de C.V.

4.2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

20 ratas Wistar macho (250 – 300 g) adquiridas de Harlan-México-Facultad de Química, UNAM, estuvieron bajo condiciones ambientales controladas que incluyeron extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora, éste se realizó mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de $3\mu\text{m}$ en el aire de inyección. La temperatura se mantuvo a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa en 55%, los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 horas. Se les proporcionó alimento esterilizable para ratón/rata Harlan Tekland y agua *ad libitum*, la cual se acidificó hasta alcanzar un pH de 2.5, las jaulas para su alojamiento fueron de acrílico cristal transparente con las siguientes dimensiones: 32 x 47 x 20 cm (5 ratas/caja), la cama fue de viruta esterilizada y el cambio de jaulas se realizó cada tercer día, los bebederos se lavaron un día a la semana y se esterilizaron.

4.3.3. EQUIPO.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu:

Bomba isocrática modelo: LC 10 ADVP, cat. No. 228-39000-92, No. de serie C2096365042US.

Autoinyector modelo: SIL 10ADVP, Loop de 50 μ L, cat. No. 228-39005-92, No. de serie C2105360009US.

Detector UV/Vis, modelo: SPD 10 AVP, cat. No. 228-393000-92, No. de serie C2099350103KG.

Sistema controlador modelo: SCL 10 AVP, cat. No. 228-34350-92, No. de serie C21013650227US.

-Desionizador Milli-Q Water System, Millipore No. 01395-C, Millipore Corporation.

-Potenciómetro Orion Research, modelo: 301, análogo s/n 46562.

-Centrífuga Eppendorf, modelo: 5416, No. 5416B, 01202.

-Balanza granataria Ohaus Harvard Trip, No. de serie 21975.

-Baño María Imperial Bath, Lab-Line, modelo: 18000, No. de serie 06090-0432.

-Congelador Lab-Line, Frigid-Cab, cat. No. 3552, temperatura -20°C, No. de serie 194-004

-Vortex Maxi Mix II, Thermolyne, modelo: M37615, No. de serie 871990647059.

-Balanza analítica Sartorius, modelo: A210P, No. de serie 40040065.

-Espectrofotómetro UV/Vis Shimadzu, modelo: UV-1601, No. de serie 62121.

-Distribuidor de vacío para extracción en fase sólida (Manifold System) Visiprep Supelco, 12 puertos, modelo: 5-7030-U.

4.2.4. SOFTWARE.

-Shimadzu Class-Vp, versión 5.2, Chromatography Laboratory Automated Software System, Shimadzu Corporation (1999).

- SCI Software, Win-Nonlin, Standard Edition, versión 1.1, Scientific Consulting INC. (1984-1996).

- Micro Math PK Analyst. Pharmacokinetic Data Analysis, versión 1.0 for Microsoft Windows (1986-1995).

4.2.5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Fase móvil MeOH/H₂O 58:42 v/v, pH = 4.0 con ácido acético.

Filtrar y medir 580 mL de metanol grado HPLC con filtros de membrana de 0.45 µm de tamaño de poro, adicionar 420 mL de agua desionizada, mezclar y ajustar el pH de la mezcla a 4.0 con ácido acético glacial.

Solución de ácido hexansulfónico (sal sódica) 0.02 M.

Pesar 0.3764 g de ácido hexansulfónico (sal sódica), disolver con agua desionizada, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, ajustar el pH a 4.0 con ácido acético, y aforar con agua desionizada.

Solución de prednisona 100 µg/mL, en fase móvil (estándar interno).

Pesar 0.01 g de prednisona (estándar de referencia USP), disolver con la solución de fase móvil, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar al aforo con la misma fase móvil. La concentración así obtenida es de 100 µg/mL.

Solución stock de casiopeína Igly 1 mg/mL en plasma de rata.

Pesar 0.01 g de casiopeína Igly Meb 138, disolver con el menor volumen ($\leq 10\%$ del volumen total) de la solución de fase móvil, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL aforar con plasma de rata Wistar, previamente descongelado y centrifugado. La concentración así obtenida es de 1 mg/mL. El plasma de rata se obtuvo mediante punción cardiaca de las ratas Wistar, obteniéndose en promedio un volumen de 10 mL de sangre por cada animal; posteriormente la sangre colectada en tubos con heparina como anticoagulante, se centrifugaron a 3 500 rpm durante 15 minutos, para separar el plasma del paquete globular, el plasma fue almacenado en tubos con tapa rosca de 25 x 200 cm y congelado a -20°C .

Curva de calibración, casiopeína Igly en plasma de rata.

De la solución stock de casiopeína Igly en plasma de rata, se realizan diluciones sucesivas para obtener las diferentes concentraciones de la curva de calibración (50, 25, 10, 5 y $2.5\ \mu\text{g/mL}$).

Tomar 0.5 mL de la solución stock de casiopeína Igly en plasma de rata y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, aforar con plasma de rata Wistar, para obtener una concentración de $50\ \mu\text{g/mL}$. A partir de ésta última solución se realizaron diluciones sucesivas para obtener los siguientes puntos de la curva de calibración.

Tomar 2.5 mL de la solución de $50\ \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL, aforar con plasma de rata para obtener una concentración de $25\ \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata.

Tomar 2.0 mL de la solución de $25\ \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con plasma de rata para obtener una concentración de $10\ \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata.

Tomar 2.5 mL de la solución de $10\ \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con plasma de rata para obtener una concentración de $5\ \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata.

Objetivos y Parte Experimental

Tomar 2.5 mL de la solución de 5 $\mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con plasma de rata para obtener una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata.

Soluciones para la preparación de las muestras de control de calidad.

Concentración alta (40 $\mu\text{g/mL}$).

Tomar 1 mL de la solución stock de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con plasma de rata para obtener una concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$.

Concentración media (20 $\mu\text{g/mL}$).

Tomar 2.5 mL de la solución de 40 $\mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con plasma de rata para obtener una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Concentración baja (4 $\mu\text{g/mL}$).

Tomar 1 mL de la solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma de rata, llevar a un matraz volumétrico de 5 mL y aforar con plasma de rata para obtener una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$.

Solución de casiopeína Igly 5 mg/mL en solución glucosada al 5%.

Pesar 0.125 g de casiopeína Igly Meb 138, llevar a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y aforar con solución glucosada al 5%, para obtener una concentración de 5 mg/mL.

4.2.6. MÉTODO ANALÍTICO.

El método analítico se desarrolló de acuerdo a un diseño experimental sencillo, se evaluaron los siguientes parámetros de acuerdo a lo especificado para métodos analíticos en la armonización de Analytical Methods Validation, para estudios farmacocinéticos: selectividad/especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), recobro absoluto, estabilidad de las muestras en el disolvente de inyección y estabilidad de la muestra a largo plazo, y robustez del método analítico.^{114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123}

4.2.6.1. Selectividad.- Es la capacidad que tiene un método analítico para que la respuesta obtenida proceda del fármaco de interés y no de otros componentes que están presentes en la matriz de estudio como productos de degradación. Se demuestra experimentalmente trabajando con blancos, placebos (matrices usadas), productos de degradación (para formas farmacéuticas) o metabolitos (para fluidos biológicos).

4.2.6.2. Linealidad.- Es su capacidad para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un intervalo. La linealidad del sistema, generalmente se determina construyendo una curva de calibración utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución estándar y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. Para evaluar este parámetro se considera el coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m), ordenada al origen (b), y el coeficiente de variación global (CV).

La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 5 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados), cada uno de manera independiente haciendo los análisis por triplicado, el análisis se realiza bajo las mismas condiciones de operación. Los criterios para evaluar este parámetro son los mismos que para la linealidad del sistema.

4.2.6.3. Precisión.- Del sistema (repetibilidad); es el grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos dentro de una serie de mediciones efectuadas en una misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación (analista, día, laboratorio, etc.), generalmente se expresa en términos de coeficiente de variación. Se determina por el análisis por quintuplicado de una misma solución estándar correspondiente a la concentración del 100% establecido para la linealidad del sistema, su criterio de aceptación es un coeficiente de variación $\leq 2\%$.

Del método: se realizan mediciones individuales, 5 determinaciones por concentración, un mínimo de 3 concentraciones (alta, media, baja, muestras de control de calidad) en la matriz biológica.

Muestras de control de calidad.- Muestras de plasma más cantidad de analito, para obtener concentraciones alta, media y baja, diferentes de los puntos de la curva de calibración, pero sin salir del rango de trabajo.

Repetibilidad.- Analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de 3 concentraciones conocidas: alta, media y baja del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El CV no debe ser mayor que el 15%.

Reproducibilidad.- Analizar por duplicado durante 3 días un mínimo de 3 concentraciones conocidas, alta, media y baja del o los componentes por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. Tiene el mismo criterio de aceptación que para la repetibilidad.

4.2.6.4. Exactitud.- Es la concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor considerado como verdadero. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido al analizar muestras a las que se adicionó cantidades conocidas del analito. El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del 15% del valor nominal de concentración.

4.2.6.5. Límite de detección (LOD).- Es la mínima concentración que da una señal detectable sin confundirse con el ruido del sistema. Para evaluarlo se hacen diluciones seriadas de la sustancia estándar del analito, hasta obtener una respuesta de dos veces por encima del ruido del sistema cromatográfico. También se determina mediante el intercepto y la pendiente de la curva promedio de calibración por la siguiente fórmula: $LOD = 3.3 \sigma_b / X_m$.

4.2.6.6. Límite de cuantificación (LOQ).- Es la mínima concentración en la cual el método analítico es lo suficientemente preciso y exacto para dar un estimado satisfactorio de una muestra de concentración desconocida. El punto más bajo en la curva de calibración puede aceptarse como el LOQ si: no hay presencia de interferencia en blancos con el tiempo de retención del analito a esta concentración; y el pico del analito (respuesta) es identificable, discreto y reproducible con una precisión de 20% y exactitud de 80-120%.

4.2.6.7. Estabilidad.- Con este parámetro se conocen las condiciones en las cuales las muestras se obtienen durante el proceso de análisis, mantienen constantes sus propiedades medibles en un tiempo determinado. Esto proporciona una mayor confiabilidad de los resultados, pues permite determinar si la muestra presenta degradación durante el tratamiento, durante el almacenamiento, antes de medir su respuesta para ser cuantificada. Se realiza analizando soluciones estándares del analito antes de su almacenamiento. Después se almacenan en diferentes condiciones de temperatura, iluminación, pH, etc. Posteriormente se vuelven a analizar a diferentes tiempos según se haya establecido el protocolo de estabilidad.

4.2.6.8. Robustez.- Es el grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba, obtenidos mediante el análisis de las mismas bajo diversas condiciones. Los cambios están controlados, se hacen cambios deliberados para seguir manteniendo respuestas aceptables. La evaluación de la robustez debe considerarse durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento en estudio. Debe mostrar la confiabilidad en un análisis

con variaciones deliberadas de los parámetros del método. Para evaluarse por ejemplo en CLAR, cambios que afectan la respuesta: flujo, cambio en los componentes de la fase móvil, polaridad de la columna, polaridad en los disolventes de la fase móvil, diluciones.

4.3. FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA.

4.3.1. Estudio farmacocinético.

Se tomó un grupo de 20 ratas Wistar macho de 12-13 semanas (250-300 gr de peso), se colocaron en el bioterio de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) del conjunto "E" de la Facultad de Química, en las condiciones ya descritas. Las ratas se ponen en ayuno a las 21:00 hrs del día previo al estudio farmacocinético, dejándoles solamente agua *ad libitum*.

El día del estudio, se pesó a cada una de las ratas, y se marcaron de forma tal que no exista confusión en el estudio. Se inicia la administración de la casiopeína IIgly a una dosis de 8 mg/Kg (50% de la DL₅₀ en ratón), partiendo de una solución de 5 mg/mL de casiopeína IIgly en solución glucosada al 5%, por vía i.v. (vena caudal de la cola).

Para la administración de la casiopeína IIgly se inmovilizó a la rata colocándola en una trampa, evitando así el movimiento de la misma, procurando que la aguja de la jeringa de insulina (27 G x13 mm) en la cual se inyecta el fármaco, no salga de la vena caudal de la cola. esto se verificó con la observación de la no presencia de necrosis en el sitio de administración, en caso de que la aguja no estuviera en vena se presentaría la necrosis en la cola de la rata. debida a la toxicidad del fármaco, aunado a esto se observó adsorción del fármaco en la cánula en estudios previos, por lo tanto se decidió optar por vía i.v por bolo. Este procedimiento inicia con los tiempos de muestreo más prolongados, dejando un intervalo de 10 minutos entre cada administración, y así hasta cubrir con todas las ratas.

Tabla 8. Cantidad de casiopeína Ilgly (mg) administrada a cada rata para cubrir la dosis de 8 mg/Kg en el estudio farmacocinético.

Rata	Peso corporal (g)	Cantidad (mg)	Volumen (mL) administrado sol'n casiopeína Ilgly 5 mg/mL en sol'n. glucosada al 5%
1	273	2.184	0.44
2	264	2.112	0.42
3	260	2.080	0.42
4	311	2.488	0.49
5	256	2.048	0.41
6	310	2.480	0.49
7	304	2.432	0.48
8	291	2.328	0.46
9	271	2.168	0.43
10	318	2.544	0.51
11	266	2.128	0.43
12	273	2.184	0.44
13	221	1.768	0.35
14	313	2.504	0.50
15	281	2.248	0.45
16	213	1.704	0.34
17	269	2.152	0.43
18	273	2.184	0.44
19	265	2.120	0.42
20	307	2.456	0.49
Promedio	276.95	2.2156	0.442
Desviación estándar	28.66	0.2293	0.045
C.V.%	10.35	10.35	10.19

Una vez que se cumplen los tiempos de muestreo, se realizó la obtención de sangre (volumen aproximado de 2 mL para cada rata en cada intervalo) por el seno orbital, empleando un tubo capilar con heparina, colectando la sangre en tubos Vacutainer heparinizados, agitando suavemente para homogeneizar la sangre con el anticoagulante, evitando la formación de trombos; posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, para separar el plasma del paquete globular, este plasma se transfirió a tubos limpios y se congeló a -20°C, para su posterior análisis y así realizar la cuantificación de la casiopeina IIg_{ly}, en base al tratamiento de la muestra plasmática. A continuación se presentan los diferentes intervalos de tiempo a los cuales se realizó el muestreo (0, 10, 20, 30, 45 60, 120, 180, 240 y 360 minutos postdosis). Se tomaron dos puntos de muestreo para cada rata, según la tabla 9.

Tabla 9. Diseño de los intervalos de muestreo para cada rata.

Tiempo (minutos)	Ratas
0	1,10,11,20
10	1,2,11,12
20	2,3,12,13
30	3,4,13,14
45	4,5,14,15
60	5,6,15,16
120	6,7,16,17
180	7,8,17,18
240	8,9,18,19
360	9,10,19,20

4.3.2. Tratamiento de la muestra plasmática.

Se toma 1 mL de plasma de rata, se adiciona 0.5 mL de metanol y se agita por 20 segundos en vortex. La mezcla resultante se centrifuga a 5 000 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante se transfiere a un tubo limpio, y se adiciona con 0.5 mL de una solución de ácido hexansulfónico (sal sódica) 0.02 M, pH = 4.0, se agita en vortex durante 15 segundos para homogeneizar la mezcla.

Se realiza una extracción sólido-líquido utilizando cartuchos Sep-pack vacc C18, 500 mg, 3 cc, éstos se acondicionan con 4 mL de metanol y 1 mL de la solución de ácido hexansulfónico 0.02 M, con vacío en un sistema Visiprep. La muestra plasmática (última mezcla) se pasa por el cartucho acondicionado, y se lava el cartucho con 1 mL de la solución de ácido hexansulfónico 0.02 M y 1 mL de agua desionizada. Se deja secar por 3 minutos, se cambian los tubos en el sistema Visiprep y se desechan los residuos obtenidos, se colocan tubos limpios, y se eluye a la caseína Igly con 1.5 mL de metanol. Se evapora el eluido a sequedad en baño maría con N₂, se reconstituye con 0.5 mL de una solución de prednisona 100 µg/mL en fase móvil (estándar interno), se agita hasta disolver, y finalmente se transfiere a un vial para inyectar 50 µL en el sistema cromatográfico.

De los datos obtenidos de la cuantificación, se determinaron los parámetros farmacocinéticos ABC, Cp⁰, T_{max}, Cl, Ke, T_{1/2}, Vd; y con el análisis de éstos parámetros se determinó el modelo farmacocinético al que mejor se ajusten los datos obtenidos, con el uso del programa SCI Software WinNonlin, Standard Edition, versión 1.1 (Scientific Consulting INC, 1984-1996); así como con el programa MicroMath PK Analyst Pharmacokinetics (1986-1995) Data Análisis versión 1.0 for Microsoft Windows. Así también se determinaron parámetros modelo-independientes, como el tiempo medio de residencia (TMR), empleando la técnica de momentos estadísticos.

4.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu:
- Bomba: LC 10 ADVP.
- Autoinyector: SIL 10ADVP.
- Detector: UV/Vis SPD 10 AVP.
- Sistema control: SCL 10 AVP.
- Software: Shimadzu Class VP version 5.2.
- Fase móvil: Metanol/agua 58:42 v/v, pH = 4.0 c/CH₃COOH.
- Flujo de corrida: 0.7 mL/min.
- Longitud de onda: 273 nm.
- Columna analítica: Waters Symetry C18, 5µm, 250 x 4.6 mm, W10261 F011.
- Precolumna Phenomenex KJO-4282, con cartuchos C18 AJO-4287, 4 x 3 mm.
- Tiempo de corrida: 15 minutos.
- Temperatura: ambiente (20 – 25 °C).

CAPÍTULO V.

RESULTADOS.

5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

- Tiempo de retención de la casiopeína Igly: T.R.= 4.6 minutos.
- Tiempo de retención de la prednisona (estándar interno): T.R.= 9.6 minutos.
- Tiempo de retención de la heparina (anticoagulante): T.R.= 6.6 minutos.

5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

5.2.1. SELECTIVIDAD.- Para la evaluación de la selectividad, se realizó el análisis cromatográfico de la casiopeína Igly en solución de fase móvil con el estándar interno (prednisona 100 µg/mL) figura 3; casiopeína Igly en la matriz plasmática, figura 4; blanco de plasma de rata, figura 5; blanco de [Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)]NO₃ (Meb 128), figura 6; y un blanco de [Cu (glicina)]NO₃ (Meb 134), figura 7; que son los componentes de la casiopeína Igly.

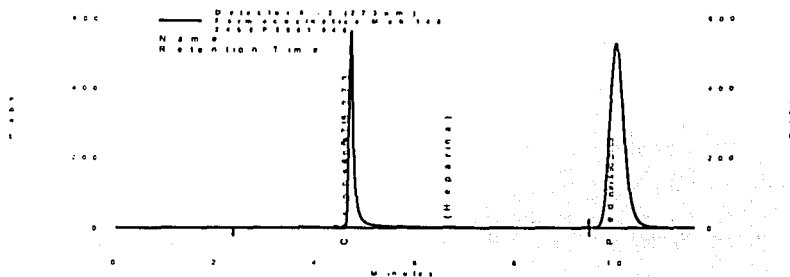
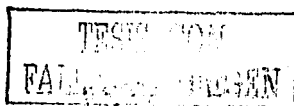


Figura 3. Casiopeína Igly en fase móvil, 50 µg/mL con estándar interno (prednisona 100 µg/mL). Tiempo de retención Casiopeína Igly= 4.6 min., tiempo de retención Prednisona= 9.96 min.



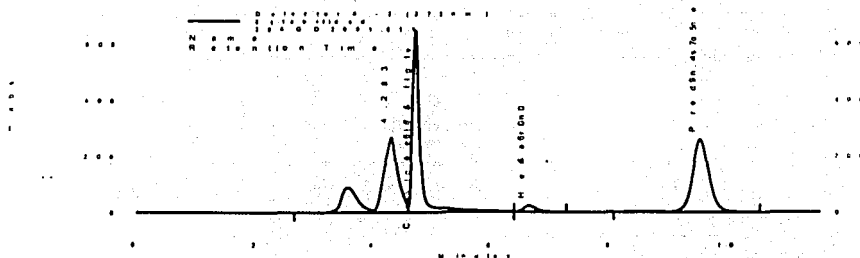


Figura 4. Casiopeína IIgly en plasma de rata, 50 µg/mL, con estándar interno (prednisona 100 µg/mL) y heparina (anticoagulante). Tiempo de retención Casiopeína IIgly= 4.6 min., tiempo de retención Prednisona= 9.47 min., tiempo de retención anticoagulante= 6.6 min.

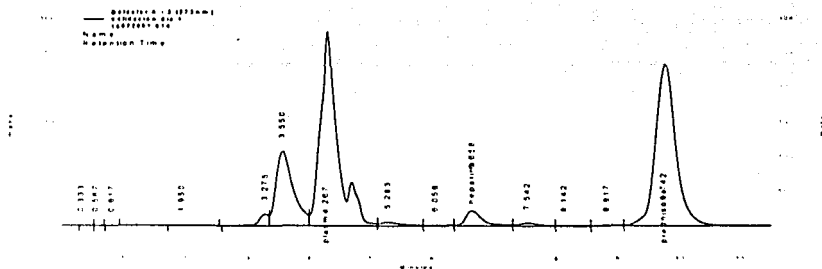


Figura 5. Blanco plasma de rata con estándar interno (prednisona 100 µg/mL) y heparina (anticoagulante). Tiempo de retención plasma= 4.27 min., tiempo de retención Prednisona= 9.74 min., tiempo de retención Heparina= 6.66 min.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

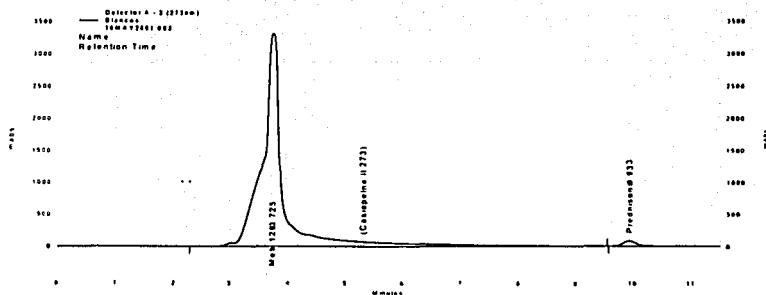


Figura 6. Blanco Meb 128 [Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)]NO₃, con estándar interno (prednisona 100 µg/mL) en fase móvil. Tiempo de retención Meb 128= 3.73 min., tiempo de retención Prednisona= 9.93 min.

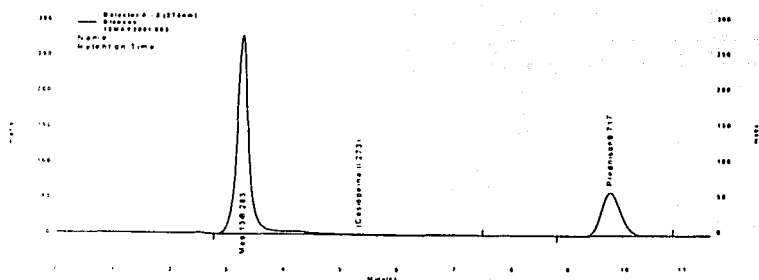


Figura 7. Blanco Meb 134 [Cu(glicina)]NO₃, con estándar interno (prednisona 100 µg/mL) en fase móvil. Tiempo de retención Meb 134= 3.28 min., tiempo de retención Prednisona= 9.72 min.

TESIS CON
 FALLA DE CALIDAD

5.2.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.- Se realizó con el análisis de 3 curvas de calibración, en un rango de 2.5 a 50 µg/mL, de casiopeína IIgly, en solución con fase móvil, con el estándar interno de prednisona, y se reporta la relación de áreas entre la casiopeína IIgly y la prednisona, tablas 10 y 11, figura 8.

Tabla 10. Linealidad del sistema.

Conc.(µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva3	Promedio	Desvest	C.V %
2.5	0.160	0.159	0.160	0.160	0.00057	0.36
5	0.190	0.186	0.187	0.188	0.00208	1.11
10	0.227	0.222	0.231	0.227	0.00451	1.98
25	0.440	0.436	0.452	0.443	0.00833	1.88
50	0.874	0.878	0.889	0.880	0.00776	0.88

La curva promedio de las tres curvas es la siguiente:

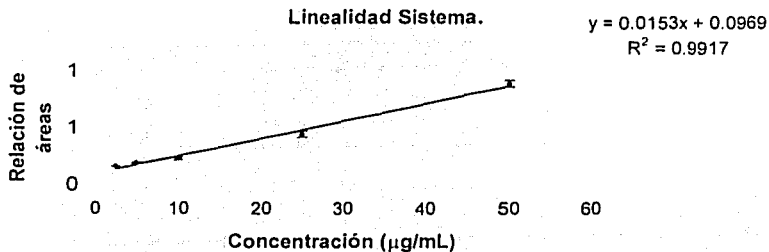


Figura 8. Linealidad del sistema.

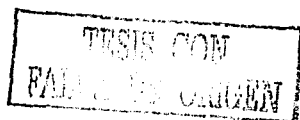


Tabla 11. Análisis de varianza para la linealidad del sistema.

ANOVA LINEARIDAD
SISTEMA.

Fuente de Variación	GL	SC	SCM	Fcal	Ftab
Regresión	1	1.086049	1.086049	3372.137	4.667186
Error de regresión	13	0.004187	0.000322		
Falta de ajuste	3	0.003878	0.001293	41.78358	3.708266
Error puro	10	0.000309	3.09E-05		

5.2.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA.- Se expresa generalmente en términos de coeficiente de variación. Se determinó con el análisis por quintuplicado de una misma solución estándar correspondiente a la concentración del 100% establecido para la linealidad del sistema, en este caso el nivel de concentración seleccionado dentro la curva de calibración (25 μ g/mL), tabla 12.

Tabla 12. Precisión del sistema.

Rep. 1	Rep.2	Rep.3	Rep.4	Rep. 5	Promedio	Desv. Est.	C.V. %
24.99	25.01	24.94	25.02	25.34	25.06	0.1595	0.63

5.2.4. LINEALIDAD DEL MÉTODO.- Se siguió con las mismas condiciones que para la linealidad del sistema, sólo que las curvas se realizaron en plasma de rata, tablas 13 y 14, figura 9.

Tabla 13. Linealidad del método.

Conc.(µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	Desvest	C.V %
2.5	0.111	0.106	0.111	0.109	0.002	2.16
5	0.132	0.130	0.149	0.137	0.009	6.22
10	0.219	0.193	0.230	0.214	0.016	7.25
25	0.437	0.367	0.316	0.373	0.050	13.29
50	0.857	0.883	0.78	0.840	0.044	5.21

La curva promedio de las tres curvas es la siguiente:

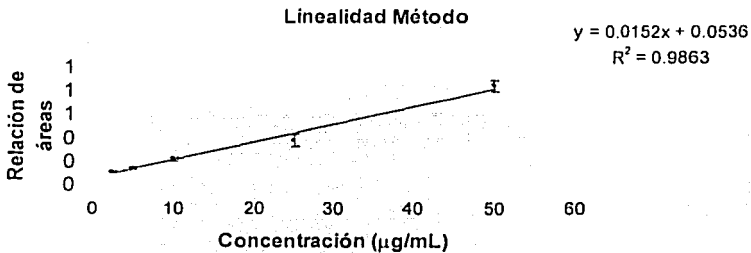


Figura 9. Linealidad del método.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14. Análisis de varianza para la linealidad del método.

ANOVA LINEARIDAD
METODO.

Fuente de Variación	GL	SC	SCM	Fcal	Ftab
Regresión	1	1.071016	1.071016	518.4913	4.667186
Error de regresión	13	0.026853	0.002066		
Falta de ajuste	3	0.012778	0.004259	3.026091	3.708266
Error puro	10	0.014075	0.001408		

5.2.5. PRECISIÓN DEL MÉTODO.

5.2.5.1. Repetibilidad.- Se realizó con el análisis por quintuplicado de los puntos controles (concentraciones de casiopéina IIgly en plasma de rata, baja: 4 µg/mL, media: 20 µg/mL y alta: 40 µg/mL) verificando que el coeficiente de variación (C.V.) fuera menor al 15%, tabla 15.

Tabla 15. Precisión del método (repetibilidad).

Conc. (µg/mL)	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Promedio	Desv. Est.	C.V. %
4	0.1544	0.1565	0.1561	0.1554	0.1505	1.0557	0.18333	1.17
20	0.3671	0.3885	0.44030	0.38753	0.34888	0.38627	1.399585	3.62
40	0.6417	0.7022	0.8069	0.6995	0.5962	0.68934	0.07911	11.47

5.2.5.2. Reproducibilidad.- Los puntos controles se analizaron por triplicado en tres días diferentes, verificando que el C.V. fuera menor al 15%. Se presentan los promedios de cada día en cada nivel de concentración, tabla 16.

Tabla 16. Precisión del método (reproducibilidad).

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Día 1	Día 2	Día 3	Promedio	Desv. Est.	C.V. %
4	0.115423	0.112890	0.109911	0.112741	0.002759	2.45
20	0.386277	0.326561	0.316288	0.343042	0.037793	11.02
40	0.673145	0.567093	0.600921	0.613719	0.054172	8.82

5.2.6. EXACTITUD DEL MÉTODO.- Con base en los resultados de repetibilidad y reproducibilidad del método, se calculó el porcentaje recuperado, para cada uno de los puntos controles, en función al valor nominal de cada concentración, tabla 17.

Tabla 17. Exactitud del método.

Valor nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Día 1, % recuperado	Día 2, % recuperado	Día 3, % recuperado	Promedio	Desviación estándar	C.V. %
4	101.75 (4.07)	97.00 (3.90)	92.75 (3.71)	97.33	4.50	4.63
20	109.50 (21.90)	89.85 (17.97)	86.45 (17.29)	95.26	12.44	13.06
40	101.95 (40.78)	84.50 (33.80)	90.07 (36.03)	92.17	8.91	9.67

5.2.7. RECOBRO (%).- Se realizó obteniendo la relación entre dos curvas de calibración en el rango de trabajo establecido, la primera de ellas en la matriz biológica (plasma de rata), y la segunda en solución (fase móvil), para determinar el porcentaje de recobro entre el sistema y el método. El C.V. total debe ser menor o igual al 15%, tabla 18.

Tabla 18. Recobro (%) del método.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Método	Sistema	Relación	Recobro (%)
2.5	0.109	0.160	0.68125	68.13
5.0	0.137	0.188	0.72872	72.87
10.0	0.214	0.227	0.94273	94.27
25.0	0.373	0.443	0.84198	84.19
50.0	0.840	0.880	0.954545	95.45

Promedio total: 80.98%

Desviación estándar: 10.74

Coefficiente de variación: 13.26%

5.2.8. LÍMITE DE DETECCIÓN.- Se calculó a partir de la fórmula del intercepto y la pendiente de la curva promedio para la linealidad del método, ($\text{LOD} = 3.3$ desviación estándar intercepto/ promedio de las pendientes), resultando un valor de $0.52 \mu\text{g/mL}$.

5.2.9. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.- Se tomó el nivel más bajo de concentración en la curva de calibración ($2.5 \mu\text{g/mL}$) mediante un análisis por quintuplicado, cuyo resultado fue preciso y exacto con un C.V. de 1.95%.

5.2.10. ESTABILIDAD.- La casiopeína IIgly fue estable hasta 30 días en el plasma de rata en ciclos de congelación-descongelación. Esto se determinó realizando el análisis de los puntos control en ciclos de congelación-descongelación a diferentes intervalos de tiempo (24, 48, 72 horas, 7, 14 y 30 días). Se compararon las respuestas obtenidas contra puntos controles de preparación reciente.

En la tabla 19 se reportan las concentraciones obtenidas en ciclos de congelación-descongelación de -20°C a temperatura ambiente, a diferentes intervalos de tiempo:

Tabla 19. Estabilidad de casiopeína IIgly a -20°C .

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	$-20^{\circ}\text{C}/24$ h	$-20^{\circ}\text{C}/48$ h	$-20^{\circ}\text{C}/72$ h	$-20^{\circ}\text{C}/7$ días	$-20^{\circ}\text{C}/14$ días	$-20^{\circ}\text{C}/30$ días
4	4.3	4.14	3.99	4.04	4.09	3.75
20	20.57	22.39	20.84	20.61	20.90	20.92
40	40.17	41.09	40.35	40.60	40.80	40.12

5.2.11. ROBUSTEZ.- El método analítico desarrollado fue poco robusto, ya que cuando se cambia la relación de fases, la señal de casiopeína IIgly mostraba un cambio drástico en el tiempo de retención y en su simetría.

5.3. FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA.

5.3.1. Estudio farmacocinético.

En la tabla 20, se presentan los resultados obtenidos para la concentración plasmática de casiopeína IIgly en los diferentes intervalos de tiempo en los que se llevó a cabo el estudio de farmacocinética preclínica en ratas:

Tabla 20. Concentración plasmática de casiopeína IIgly en plasma de rata vs tiempo.

Tiempo (minutos)	Cp ($\mu\text{g/mL}$)	Desv. estándar	Ln Cp	n*
10	19.44	15.52	2.97	4
20	11.34	12.43	2.43	4
30	7.76	0.21	2.05	3
45	7.38	-----	1.99	1
60	3.20	2.86	1.16	3
120	3.08	0.27	1.12	3
180	2.66	2.15	0.98	3
240	2.56	0.42	0.94	2
360	1.91	1.18	0.64	3

* n = número de muestras para la cuantificación de la concentración.

Se realizó el análisis farmacocinético de los datos obtenidos, con la ayuda del paquete Win-Nonlin versión 1.1, se obtuvo el siguiente perfil farmacocinética, figura 10.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Farmacocinética Casiopeína Ilgly en plasma de ratas.

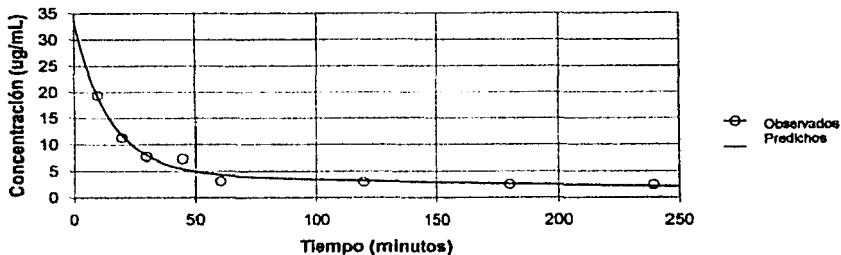


Figura 10. Perfil farmacocinético de Cp de Casiopeína Ilgly vs tiempo.

De los datos obtenidos, el modelo farmacocinético al que mejor se ajustaron éstos fue el modelo abierto de dos compartimentos, con administración por bolo intravenoso, sin tiempo lag y considerando microconstantes de velocidad (figura 11). Los valores de los diferentes parámetros para este modelo analizados con el Win-Nonlin, versión 1.1, se presentan en la tabla 21.

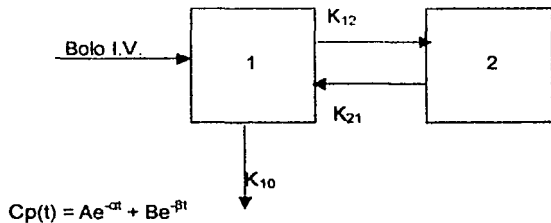


Figura 11. Modelo abierto de dos compartimentos por bolo I.V., sin tiempo lag y microconstantes de velocidad al cual se ajustaron los datos obtenidos.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa WinNonlin.

Parámetro	Valor estimado	Parámetro	Valor estimado
Volumen (Lts)	0.065565	$T_{1/2\alpha}$ (min)	10.11312
K_{10} (min^{-1})	0.016998	$T_{1/2\beta}$ (min)	228.1846
K_{12} (min^{-1})	0.042331	A ($\mu\text{g/mL}$)	29.04056
K_{21} (min^{-1})	0.012249	B ($\mu\text{g/mL}$)	4.752077
ABC_{0-} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	1988.093	C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	33.79263
$T_{1/2}k_{10}$ (min)	40.77934	Cl (mL/min)	1.114400
α (min^{-1})	0.068539	TMR (min)	262.1504
β (min^{-1})	0.003038	Vdee (Lts)	0.292149

Los datos también se analizaron por el paquete PK Analyst, haciendo el ajuste con el modelo abierto de dos compartimentos con bolo intravenoso, eliminación de primer orden, y con microconstantes de velocidad (tabla 22).

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa PK Analyst.

Parámetro	Valor estimado	Parámetro	Valor estimado
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	33.77674	B ($\mu\text{g/mL}$)	4.742971
K_{10} (min^{-1})	0.016962	$ABC_{0,-}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	1991.269
K_{12} (min^{-1})	0.042312	ABCPM ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}^2$)	524031.8
K_{21} (min^{-1})	0.012215	TMR (min)	263.1646
$T_{1/2k_{10}}$ (min)	40.86369	ABC trapezoidal ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	2071.469
α (min^{-1})	0.068463	$ABC_{0,1}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	1233.256
β (min^{-1})	0.003026	ABCPM $_{0,1}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}^2$)	91642.92
$T_{1/2\alpha}$ (min)	10.12436	TMR $_{0,1}$ (min)	74.30972
$T_{1/2\beta}$ (min)	229.0324	ABC trapezoidal $_{0,1}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$)	1225.583
A ($\mu\text{g/mL}$)	29.03377		

CAPÍTULO VI.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

6.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR.

En los cromatogramas mostrados en las figuras 3 a la 7, el tiempo de retención obtenido para la casiopeína IIgly fue de 4.6 minutos. No se presentó interferencia alguna de picos del plasma de rata para el tiempo de retención de la casiopeína IIgly. Los posibles compuestos de descomposición fueron [CuI(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)] y [Cu(II)(glicina)] los cuales se demostró, mediante su análisis por CLAR, que los tiempos de retención obtenidos para éstos compuestos fueron 3.73 y 3.28 minutos. No mostraron interferencia alguna en comparación con el T.R. de casiopeína IIgly. El anticoagulante utilizado en todas las muestras fue la heparina, cuyo tiempo de retención fue de 6.6 minutos en las condiciones cromatográficas establecidas.

Se encontró una relación lineal ($r = 0.9933$, $r^2 = 0.9867$) para la linealidad en relación de áreas de picos de casiopeína IIgly a diferentes concentraciones (2.5, 5.0, 10.0, 25.0 y 50.0 $\mu\text{g/mL}$) en plasma de rata, sobre el área del pico del estándar interno (prednisona, 100 $\mu\text{g/mL}$ en fase móvil), considerando el análisis de 3 curvas en un día, además los coeficientes de variación fueron menores al 15% en cada nivel de concentración, además se comprobó la linealidad mediante el análisis de varianza y los resultados obtenidos en la prueba de hipótesis para la ordenada al origen.

La precisión del método fue evaluada mediante muestras de control de calidad, preparadas en un mismo día en cinco determinaciones para cada concentración usando una solución stock. Con esto se comprobó la repetibilidad del método. Los coeficientes de variación correspondientes a las muestras de control de calidad (baja= 4 $\mu\text{g/mL}$, media= 20 $\mu\text{g/mL}$ y alta= 40 $\mu\text{g/mL}$) fueron 1.17, 3.62 y 11.47%, respectivamente con lo que se cumple conforme lo establecido en la normatividad. Para la reproducibilidad las muestras de control de calidad fueron analizadas por triplicado en tres días diferentes. Los coeficientes de variación obtenidos para las muestras de control de calidad baja, media y alta fueron 2.45, 11.02 y 8.82% respectivamente.

La exactitud del método se evaluó con base en los resultados obtenidos en la repetibilidad y la reproducibilidad del método, obteniéndose el porcentaje recuperado en

cada una de las muestras de control de calidad, en función a su valor nominal. Los coeficientes de variación resultantes para las muestras de control de calidad baja, media y alta, fueron 4.63, 13.06 y 9.67% respectivamente. Con esto se cumple con lo establecido de $C.V. \leq 15\%$.

El recobro de la casiopeína IIgly fue determinado comparando la relación de áreas de picos en plasma de la casiopeína entre el estándar interno en cada nivel de concentración (2.5, 5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) empleando el método de extracción, contra la relación de áreas de picos de la misma serie en fase móvil. Cada muestra fue analizada por triplicado; el recobro promedio para todas las concentraciones analizadas fue de 80.98%, con un coeficiente de variación de 13.26%.

El límite de cuantificación se definió como la concentración más baja en el intervalo de concentraciones de linealidad del método, realizando el análisis por quintuplicado de este nivel de concentración (2.5 $\mu\text{g/mL}$) con un coeficiente de variación de 1.95%. El límite de detección se obtuvo a partir de la fórmula que relaciona 3.3 veces el intercepto entre el promedio de las pendientes en las curvas de calibración para la linealidad del método, resultando éste en un valor de 0.52 $\mu\text{g/mL}$.

La estabilidad de la casiopeína IIgly se evaluó en ciclos de congelación-descongelación a -20°C , mediante el análisis a diferentes intervalos de tiempo (24, 48, 72 horas; 7, 14 y 30 días) y se encontró que a los 30 días la casiopeína estuvo presente en un 95.6% con lo cual las muestras plasmáticas cargadas con Casiopeína IIgly pueden mantenerse en congelación a -20°C hasta los 30 días.

6.2. FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA.

No se encontraron interferencias de compuestos endógenos de plasma así como de los posibles metabolitos de la casiopeína Ilgly en la cuantificación del fármaco, esto se demostró mediante la selectividad del método analítico, con esto se verificó que no intervinieran posibles metabolitos en el perfil de concentración plasmática contra tiempo después de la administración de la dosis de 8 mg/kg y así poder realizar el ajuste de los datos obtenidos al modelo correspondiente.

Los valores de concentración plasmática vs tiempo se muestran en la tabla 20, en donde se tiene que la variabilidad para concentración en cada intervalo de tiempo es muy alta, además en algunos tiempos se observa que se trabajó con 4, 3, 2 y 1 muestras, presentándose el valor promedio en la tabla mencionada. Se observó que todos los niveles de concentración plasmática resultantes del estudio caen dentro del rango de la linealidad del método (2.5 – 50 $\mu\text{g/mL}$), a excepción de la muestra correspondiente a los 360 minutos cuyo valor encontrado fue de 1.91 $\mu\text{g/mL}$ por lo que no se consideró en el estudio por estar debajo del límite de cuantificación (2.5 $\mu\text{g/mL}$) obtenido durante la validación del método.

Del análisis de los datos anteriores, con el uso de dos diferentes softwares farmacocinéticos (Win-Nonlin y PK Analyst) se encontró que el mejor modelo al cual se ajustaron los valores obtenidos, fue el modelo abierto de dos compartimentos para una administración por bolo intravenoso, sin tiempo lag y considerando a las microconstantes de velocidad (MADC, figuras 10 y 11) cubriendo con los criterios de aceptación para cada uno de los programas. Además se observó que la farmacocinética de la casiopeína Ilgly presentó el mismo ajuste al modelo bicompartimental comparando contra el cis-platino, cuando éste se administró a ratas y perros en condiciones similares y diferentes.

Los parámetros farmacocinéticos resultantes se muestran en las tablas 21 (Win Nonlin) y 22 (PK Analyst), tomando en cuenta a los parámetros farmacocinéticos independientes: depuración o aclaramiento ($\text{Cl} = 1.114 \text{ mL/min}$) y volumen de distribución ($\text{Vd} = 0.065 \text{ litros}$), así como a los parámetros dependientes: vida media de eliminación ($T_{1/2} = 228.18 \text{ minutos}$), constante de eliminación ($\beta = 0.003 \text{ min}^{-1}$), constante de

Análisis de Resultados

distribución ($\alpha = 0.068 \text{ min}^{-1}$), así como parámetros independientes ($\text{TMR} = 262.15 \text{ min}$) indican que la fase de distribución es más rápida que la fase de eliminación ($\alpha \geq \beta$). Con los demás parámetros: concentración plasmática al tiempo cero ($C_0 = 33.79 \text{ } \mu\text{g/mL}$), microconstantes de velocidad ($K_{10} = 0.065 \text{ min}^{-1}$, $K_{12} = 0.042 \text{ min}^{-1}$, $K_{21} = 0.012 \text{ min}^{-1}$), se establece que el estado estacionario se alcanza después de los 120 minutos.

CAPÍTULO VII.

CONCLUSIONES.

7.1. CONCLUSIONES.

El método desarrollado resultó confiable para la determinación de casiopeína II gly en plasma de rata, en forma rápida y simple. El método validado en el intervalo de concentraciones de 2.5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, tiene buena precisión y exactitud, así como límites de detección y cuantificación bajos. El recobro de casiopeína II gly es bueno, es reproducible y constante en el rango de la curva de calibración.

Este método fue suficientemente sensible para realizar un estudio farmacocinético preclínico preliminar, y con los datos obtenidos del estudio se concluye que el perfil farmacocinético se ajustó al MADC por bolo i.v., y con los parámetros obtenidos se ayudará a la conformación del escalamiento en otras especies animales, en estudios posteriores.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Ruiz -Azuara L. PROCES TO OBTAIN NEW MIXED COPPER AMINOACIDATE COMPLEXES FROM PHENYLATEPHENANTROLINE TO BE USED AS ANTICANCERIGENIC AGENT. U.S. Patent application serial No. 07/628,843, Ap21 (1992) Number 5, 107, 005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18, 1997.
2. Ruiz-Azuara L. PROCES TO OBTAIN NEW MIXED COPPER AMINOACIDATE FROM METHYL PHENANTROLINE COMPLEXES TO BE USED AS ANTICANCERIGENIC AGENTS. U.S. Patent applications serial No. 07/628,628., (1992), Pat. No. A5,576,326. Nov. 19, 1996.
3. ©Mark Tittle: CASIOPEINA. Reg 407543 SECOFI, 1992.
4. Ruiz Ramírez L., De la Rosa M.E., Gracia Mora I., Mendoza A., Pérez G., Ferrer-Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutiérrez P., Cruces Martínez M.P., Pimentel E. and Natarajan A.T. CASIOPEINAS, METAL-BASED DRUGS A NEW CLASS OF ANTINEOPLASTIC AND GENOTOXIC COMPOUNDS. *Journal of Inorganic Biochemistry* **59**, 207, 1995.
5. Ruiz Ramírez L., Gracia Mora I., De la Rosa M.E., Sumano H., Gomez C., Arenas F., Gomez E., Pimentel E., and Cruces M. CYTOSTATIC, MUTAGENIC, ANTINEOPLASTIC ACTIVITIES AND PRELIMINAR TOXICITY OF COPPER (II) NEW DRUGS: CASIOPEINAS I, II, III. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **51**, 406, 1993.
6. Ruiz Ramírez L., Gracia Mora I., Moreno Esparza R., Diaz D., Gasque L., Huerta L., Mayet L., Ortiz V. and Lomeli C. THE ANTITUMOR ACTIVITY OF SEVERAL TRANSITION METAL COMPLEXES. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **43**, 615, 1991.
7. Yacobi A., Skelly J.P., Shah V.P. and Benet L.Z. INTEGRATION OF PHARMACODYNAMICS, PHARMACOKINETICS AND TOXICOKINETICS IN RATIONAL DRUG DEVELOPMENT. Plenum Press, New York, pp 23-68, 115-158, 1993.
8. Chamberlain. J. ANALYSIS OF DRUGS IN BIOLOGICAL FLUIDS. Ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data, USA, 1987.
9. Hammer Charles E. DRUG DEVELOPMENT., 2a. Edición., CRC Press INC., Florida, USA, 1990.

10. 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.
11. Pecice Karl E. BIOPHARMACEUTICAL STATISTICS FOR DRUG DEVELOPMENT. Edition Marcel Dekker, INC., New York, USA, 1998.
12. Harold N., Nair Mc. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN. Ed. OMS, Washington D.C. Monografía No. 10, 1980.
13. Fuentes-Noriega I., Ruiz-Ramirez L., Tovar-Tovar A., Rico-Morales H., and Gracia Mora I. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR CASIOPEINA III IN RAT PLASMA. *Journal of Chromatography B*. 2002 in press.
14. Sugii A., Nishimura K., Harada K., Nakayama M. and Masuda S. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF BOVINE SERUM ALBUMIN-DISDIAMINEDDICHLOROPALTINUM (II) COMPLEXES ON N-METHYLPYRIDINIUM POLYMER COLUMN. *Chemical Pharmacology Bulletin*, **39**, 408-410, 1991.
15. Digua K., Kauffmann J.M., Ghanem G. and Patriarche G.J. DETERMINATION OF CIS-PLATIN IN HUMAN PLASMA BY HPLC WITH GLASSY CARBON-BASED WALL-JET AMPEROMETRIC DETECTOR. *Journal of Liquid Chromatography*. **15**, 3295- 3313, 1992.
16. Barefoot R.R. and Van Loon J.C. DETERMINATION OF PLATIMUN AND GOLD IN ANTICANCER AND ANTIARTHRITIC DRUGS AND METABOLITES. *Analytica Chimica Acta*. **334**, 5-14, 1996.
17. Mudasir, Arai M., Yoshioka N. and Inove H. REVERSED PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF IRON (II) AND COPPER (II) CHELATES WITH 4,7-DIPHENYL-1,10-PHENANTROLINE DISULFONATE. *Journal of Chromatography A*. **799**, 171-176, 1998.
18. Susukit., Tsunada K., Kawamoto H. and Akaiwa H. UTILIZATION OF ADDUCT FORMATION AND MASKING EFFECT FOR SEPARATION OF SOME METALS, 4-(2-THIENYL)-4-THIOXO-1,1,1-TRIFLUORO-2-BUTANONATES AND 4,4,4-TRIFLUORO-1-(2-THIENYL)-1,3-BUTANEDIONATES BY REVERSED PHASE HPLC. *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **66**, 766-773, 1993

19. Mathias C.J., Bergmann S.R. and Green M.A. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SOLVENT EXTRACTION FOR DETERMINATION OF Cu-PTSM IN BLOOD. *Nuclear Medicine and Biology*, **20**, 343-349, 1993.
20. Butterworth B.E. et al. CHEMICALLY INDUCED CELL PROLIFERATION: IMPLICATIONS FOR RISK ASSESSMENT. New York: Wiley-Liss, 1991.
21. www.merck.com/pubs/mmanual.htm.
22. Capizz Robert L. QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER. BASES FARMACOLÓGICAS. Editorial Médica Panamericana., México, 196-197.
23. Franks L.M. INTRODUCTION TO THE CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY OF CANCER. Oxford Univ. Press. 1996.
24. Klaassen C.D., Watkins J.B. CASSARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY: THE BASIC SCIENCE OF POISSONS. McGraw-Hill Companies, Inc. 1999.
25. Hellman S. and Vokes E.E. ADVANCING CURRENT TREATMENTS FOR CANCER IMPROVING CONVENTIONAL THERAPY. *Scientific American* (What you need to know about cancer) **275**, 84-89, 1996.
26. Ehrlich P. ÜBER DIE BEHANDLUNG DER SYPHILIS MIT DEM EHRlichSCHEN PRAPARAT 606. *Berl Klin Wochenschr* **43**, 1996-1999, 1910.
27. Hellman S. THE FIRST CENTURY OF CANCER CHEMOTHERAPY. *Journal of Clinical Oncology*. **16**, 2295-2296, 1998.
28. Gilman A. THE INITIAL CLINICAL TRIAL OF NITROGEN MUSTARD. *American Journal of Surgery*. **105**, 574-578, 1963.
29. Catalbesi P. and Parks R.E. ALKYLALTING AGENTS, ANTIMETABOLITES, HORMONES AND OTHER ANTIPROLIFERATIVE AGENTS. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Goodman L.S. and Gilman A. (Eds.) 5th. Edn. Pp 1254-1299, Mac Millan. New York, USA, 1975.
30. Rosenberg B., VanCamp L. and Krigas T. INHIBITION OF CELL DEVELOPMENT IN *Eschericia coli* BACTERIA BY ELECTROLYSIS FROM A PLATIMUN ELECTRODE. *Nature*, **205**, 698-699, 1965.
31. Rosenberg B., VanCamp L., Trosko J.E. and Monsour V.H. PLATINUM COMPOUNDS: A NEW CLASS OF POTENT ANTI-TUMOR AGENTS. *Nature*, **222**, 385-386, 1969.

32. Köpf-Maier P. COMPLEXES OF METALS OTHER THAN PLATINUM AS ANTITUMOR AGENTS. *European Journal of Clinical Pharmacology* **47**, 1-16, 1994.
33. Capizzi R.L. AMIFOSTINE REDUCES THE INCIDENCE OF CUMULATIVE NEPHROTOXICITY FROM CISPLATINUM: LABORATORY AND CLINICAL ASPECTS. *Seminars in Oncology* **26**, 72-81, 1999.
34. Kratz F. INTERACTIONS OF ANTITUMOR METAL COMPLEXES WITH SERUM PROTEINS: PERSPECTIVES FOR ANTICANCER DRUGS DEVELOPMENT. In: *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Keppler B.K. (Ed.) pp. 391-428. Verlagsgesellschaft, Weinheim. Heidelberg, Germany, 1993.
35. Stecca C. and Gerber G.B. ADAPTIVE RESPONSE TO DNA-DAMAGING AGENTS. *Biochemical Pharmacology* **55**, 941-951, 1998.
36. Tannock I.F. EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY. In: Tannock I.F. and Hill R.P. (Eds.) *The Basic Science of Oncology*, Second edn. pp. 338-359. Baskerville: McGraw-Hill. 1992.
37. Barret J. and Hill B.T. DNA REPAIR MECHANISMS ASSOCIATED WITH CELLULAR RESISTANCE TO ANTITUMOR DRUGS: POTENTIAL NOVEL TARGETS. *Anti-Cancer Drugs* **9**, 103-123, 1998.
38. Schmitt K.H., Cimoli G., Steyaert A. and Bertrand R. *Bcl-xL* MODULATES APOPTOSIS INDUCED BY ANTICANCER DRUGS AND DELAYS DEVDase AND DNA FRAGMENTATION-PROMOTING ACTIVITIES. *Experimental Cell Research* **240**, 107-121, 1998.
39. D'Alessandro N., Flugy A., Borsellino N. and Travali S. BIOLOGY VERSUS PHARMACOLOGY IN DRUG RESISTANCE. *Oncology Reports* **4**, 207-210, 1997.
40. O'Dwyer P.J., Johnson S.W. and Hamilton T.C. PHARMACOLOGY OF CANCER CHEMOTHERAPY: CISPLATIN AND ITS ANALOGUES. In: *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. De Vita Jr. V.T., Hellman S. and Rosenberg S.A. (Eds.) 5th edn. pp. 418-509. Lippincott-Raven. Philadelphia, USA. 1997.
41. Stewart D.J., Raaphorst G.P., Yau J. and Beaubien J. ACTIVE vs PASSIVE RESISTANCE. DOSE-RESPONSE RELATIONSHIPS, HIGH DOSE CHEMOTHERAPY, AND RESISTANCE MODULATION: AN HYPOTHESIS. *Investigational New Drugs* **14** 115-130, 1996.

42. Reed E. NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR AND ANTI-CANCER CHEMOTHERAPY. *Cytotechnology* **27**, 187-201, 1998.
43. Dantzer F. and de Murcia G. QUELLES SONT LES ADN POLIMERASES REQUISES POUR LA REPLICATION ET LA REPARATION DE L'ADN CHEZ LES EUCARYOTES? *MS-Medicine Sciences* **14**, 704-712, 1998.
44. Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I., Wiesmüller L., Grosse F. and Deppert W. THE DUAL ROLE MODEL FOR *p53* IN MAINTAINING GENOMIC INTEGRITY. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**, 12-27, 1999.
45. Weinberg R.A. HOW CANCER ARISES. *Scientific American (What you need to know about cancer)* **275**, 32-40, 1996.
46. Bellamy C.O.C., Malcomson R. and Wyllie A.H. THE ROLES OF *p53* IN APOPTOSIS AND CANCER. IN: *Apoptosis and Cancer*. Martin S.J. (Ed.), pp. 116-140 Basel: Karger Landes Systems, Basel, Switzerland. 1997.
47. Gallagher W.M., Cairney M., Schott B., Roninson I.B. and Brown R. IDENTIFICATION OF *p53* GENETIC SUPPRESSOR ELEMENTS WHICH CONFERS RESISTANCE TO CISPLATIN. *Oncogene* **14**, 185-193, 1997.
48. Kelley S.L., Basu A., Teicher B.A., Hacker M.P., Hamer D.H. and Lazo J.S. OVEREXPRESSION OF METALLOTHIONEIN CONFER RESISTANCE TO ANTICANCER DRUGS. *Science* **241**, 1813-1815, 1988.
49. Yamada-Okabe T., Yamada-Okabe H., Kashima Y. and Doi R. EFFECTS OF ONCOGENES ON THE RESISTANCE TO CIS-DIAMINMINE-DICHLOROPLATINUM (II) AND METALLOTHIONEIN GENE EXPRESION. *Toxicology and Applied Pharmacology* **133**, 233-238, 1995.
50. Duckett D.R., Drummond J.T., Murchie A.I.H., Reardon J.T., Sancar A., Lilley D.M. and Modrich P.J.N. HUMAN MUTS ALPHA RECOGNIZED DAMAGED DNA BASE PAIRS CONTAINING O-6-METHYLGUANINE, O-4-METHYLTHYMINE, OR CISPLATIN-D-(GDG) ADDUCT. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 6443-6447, 1996.
51. Mu D., Tursun M., Duckett D.R., Drummond J.T., Modrich P. and Sancar A. RECOGNITION AND REPAIR OF COMPOUND DNA LESIONS (BASE DAMAGE AND

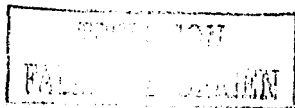
- MISMATCH) BY HUMAN MISMATCH REPAIR AND EXCISION REPAIR SYSTEMS. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 760-769, 1997.
52. Perez R.P. CELLULAR AND MOLECULAR DETERMINANTS OF CISPLATIN RESISTANCE. *European Journal of Cancer* **34**, 1535-1542, 1998.
53. Hickinsh T. PRINCIPLES OF MEDICAL ONCOLOGY. In: *A Multidisciplinary Textbook*, Horwich A. (Ed.), pp. 135-146. Chapman and Hall, London U.K. 1995.
54. Patterson J.S., Battersley L.A. and Edwards D.G. REVIEW OF THE CLINICAL AND INTERNATIONAL EXPERIENCE WITH TAMOXIFEN IN ADVANCED BREAST CANCER. *Endocrine Treatment Reviews* **9**, 563-582, 1981.
55. DeGeorge J.J., Ahn C., Andrews P.A., Brower M.E., Giorgio D.W., Goheer M.A., Lee-Han D.Y., McGuinn W.D., Schmitd W., Sun J.C. and Tripathi S.C. REGULATORY CONSIDERATIONS FOR PRECLINICAL DEVELOPMENT OF ANTICANCER DRUGS. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **41**, 173-185, 1998.
56. Burger H. CLEAVE OF NUCLEIC ACIDS BY BLEOMYCIN. *Chemicals Reviews* **98**, 1153-1169, 1998.
57. Huang H., Woo J., Alley S.C. and Hopkins P.B. DNA-DNA INTERSTRAND CROSS-LINKING BY CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM (II): N7(dG)-to-N7(dG) CROSS-LINKING AT 5'd(GC) IN SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **3**, 659-669, 1995.
58. Delmastro D.A., Li J., Abisman A., Solle M. and Chaney S.G. DAMAGE INDUCIBLE-GENE EXPRESSION FOLLOWING PLATINUM TREATMENT IN HUMAN OVARIAN CARCINOMA CELL LINES. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **39**, 245,253, 1997.
59. Rosen M., Figliomeni M. and Simpkins H. THE INTERACTION OF PLATINUM ANTITUMOR DRUGS WITH MOUSE LIVER MITOCHONDRIA. *International Journal of Experimental Pathology* **73**, 61-74, 1992.
60. Wang K., Lu J. and Li R. THE EVENTS THAT OCCUR WHEN CISPLATIN ENCOUNTERS CELLS. *Coordination Chemistry Reviews* **151**, 53-88, 1996.
61. Reedijk J. HEAVY METALS AS USEFUL DRUGS. *Chimia* **51**, 21-23, 1997.
62. Sadler P.J. INORGANIC CHEMISTRY AND DRUG DESIGN. *Advanced Inorganic Chemistry* **36**, 1-48, 1991.

63. Kratz F. and Schütte M.T. ANTICANCER METAL COMPLEXES AND TUMOR TARGETING STRATEGIES. *Cancer Journal* **11**, 176-182.
64. Nobel C.S.I., Kimland M., Lind B., Orreius S. and Slater A.F.G. DITHIOCARBAMATES INDUCE APOPTOSIS IN THYMOCYTES BY RAISING THE INTRACELLULAR LEVEL OF REDOX-ACTIVE COPPER. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26202-26208, 1995.
65. Kelland L.R. PLATINUM ANTICANCER DRUGS. In: *Metal Compounds in Cancer Therapy*. Fricker S.P. (Ed.) 1st edn, pp. 32-45. London: Chapman and Hall. London U.K, 1994.
66. Fricker S.P. METAL COMPOUNDS IN CANCER THERAPY. 1st edn. Chapman and Hall. London U.K. 1994.
67. Hnatowich D.J. THE *IN VIVO* AND *IN VITRO* USE OF METALLIC RADIOISOTOPES IN CANCER THERAPY. In: *Metal Compounds in Cancer Therapy*. Fricker S.P. (Ed.), pp. 215-247. Chapman and Hall, London, U.K. 1994.
68. Bakhtiar R. and Ochiai E. PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF INORGANIC COMPLEXES. *General Pharmacology* **32**, 525-540, 1999.
69. Jacquet L., Davies R.J.H., Kirsch-De Mesmaeker, A. and Kelly J.M. PHOTOADDITION OF $Ru(tap)_2(bpy)^{2+}$ TO DNA: A NOVEL MODEL OF COVALENT ATTACHMENT OF METAL COMPLEXES TO DUPLEX DNA. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 11763-11768, 1997.
70. Keppler B.K. METAL COMPLEXES IN CANCER CHEMOTHERAPY. First edn. Weinheim: VCH. Germany, 1993.
71. Holler E. MECHANISM OF ACTION OF TUMOUR-INHIBITING METAL COMPLEXES. In: *Metal Complexes in Cancer Therapy*. Keppler B.K. (Ed.) First edn. Weinheim: VCH. Germany, 1993.
72. Jordan W. and Carmo-Fonseca M. CISPLATIN INHIBITS SYNTHESIS OF RIBOSOMAL RNA *IN VIVO*. *Nucleic Acids Research* **26**, 2831-2836, 1998.
73. Goudie J., Chandra M., Lawrence G.D. and Williams P. ASSESSMENT OF THE POSSIBLE ROLE OF IRON AND COPPER IN CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN THE RAT. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **83**, 33-49, 1994.

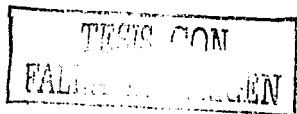
74. Ulsu R. and Bonavida B. FREE RADICALS DEPENDENT AND INDEPENDENT PATHWAYS OF CDDP-MEDIATED CYTOTOXICITY AND APOPTOSIS IN OVARIAN TUMOR CELL LINES. *International Journal of Oncology* **6**, 1003-1009, 1995.
75. Kopke R.D., Liu W., Gabaizadeh R., Jacono A., Feghali J., Spray D., Garcia P., Steinman H., Malgrange B., Ruben R. Rybak L. and Van De Water T.R. USE OF ORGANOTYPIC CULTURES OF CORTI'S ORGAN TO STUDY THE PROTECTIVE EFFECTS OF ANTIOXIDANT MOLECULES ON CISPLATIN-INDUCED DAMAGE OF AUDITORY HAIR CELLS. *American Journal of Otolaryngology* **18**, 559-571, 1997.
76. Baliga R., Zhang Z., Baliga M., Ueda N. and Tucker A. *IN VITRO* AND *IN VIVO* EVIDENCE SUGGESTING A ROLE FOR IRON IN CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY. *Kidney International* **53**, 394-401, 1998.
77. Perry M.C. and Yabro J.W. TOXICITY OF CHEMOTHERAPY. Grune and Stratton. Orlando, Florida, USA. 1984.
78. Cline M.J., and Haskell M.C. INTRODUCTION TO CHEMOTHERAPY. In: *Cancer Chemotherapy*, First edn. pp 1-12. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA. 1980.
79. Turner P.R., and Denny W.A. THE MUTAGENIC PROPERTIES OF DNA MINOR-GROOVE BINDING LIGANDS. *Mutation Research* **355**, 141-169, 1996.
80. Shackelford R.E., Kaufmann W.K., and Paules R.S. CELL CYCLE CONTROL, CHECKPOINT MECHANISM, AND GENOTOXICITY STRESS. *Environmental Health Perspectives* **107**, 5-23, 1999.
81. Templeton D.M. TRACE ELEMENTS SPECIATION IN TOXICOLOGY AND CLINICAL SCIENCES. *Analysis Magazine* **26**, M68-M71, 1998.
82. Ballatori. MECHANISMS OF METAL TRANSPORT ACROSS LIVER CELL PLASMA MEMBRANE. *Drug Metabolism Reviews* **23**, 85-132, 1991.
83. Goyer R.A. TOXIC EFFECTS OF METALS. In: *Cassarett and Doull's Toxicology*. Amdur M.O., Doull J., and Klaassen C.D. (Eds.) Fourth edn. pp. 623-680. McMillian Publishing Co. New York, USA. 1991.
84. Berners-Price S.J., and Sadler P.J. COORDINATION CHEMISTRY OF METALLODRUGS: INSIGHTS INTO BIOLOGICAL SPECIATION FROM NMR SPECTROSCOPY. *Coordination Chemistry Reviews* **151**, 1-40, 1996.

85. Azenha M., Vasconcelos T., and Cabral J.P.S. ORGANIC LIGANDS REDUCE COPPER TOXICITY IN *Pseudomonas syringae*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 369-373, 1998.
86. Das A.K., Chakraborty R., Cervera M.L., and de la Guardia M. METAL SPECIATION IN BIOLOGICAL FLUIDS-A REVIEW. *Mikrochimica Acta* **122**, 209-246, 1996.
87. Stohs S.J., and Bagchi D. OXIDATIVE MECHANISMS IN THE TOXICITY OF METAL IONS. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 321-336, 1995.
88. Solomon E.I., Lowery M.D., Root D.E., and Hemming B.L. ELECTRONIC STRUCTURES OF ACTIVE SITES IN COPPER PROTEINS AND THEIR CONTRIBUTIONS TO REACTIVITY. *Advances in Chemical Series* **246**, 121-164, 1995.
89. Okada S. IRON-INDUCED TISSUE DAMAGE AND CANCER: THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES-FREE RADICALS. *Pathology International* **46**, 311-322, 1996.
90. Halliwell B., and Gutteridge J.M.C. FREE RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE, Third edn. Oxford University Press, Oxford, U.K. 1998.
91. Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., and Dizdaroglu M. COPPER-ION-DEPENDENT DAMAGE TO THE BASES IN DNA IN THE PRESENCE OF HYDROGEN PEROXIDE. *Biochemical Journal* **273**, 601-604, 1991.
92. Shi X., Mao Y., Knapton A.D., Ding M., Rojanasakul Y., Grannett P.M., Datal N., and Liu K. REACTION OF Cr (VI) WITH ASCORBATE AND HYDROGEN PEROXIDE GENERATES HYDROXYL RADICALS AND CAUSES DNA DAMAGE: ROLE OF A Cr(IV)-MEDIATED FENTON-LIKE REACTION. *Carcinogenesis* **15**, 2475-2478, 1994.
93. Dreher D., and Junod A.F. ROLE OF OXYGEN FREE RADICALS IN CANCER DEVELOPMENT. *European Journal of Cancer* **32A**, 30-38, 1996.
94. Barja G. OXYGEN RADICALS, A FAILURE OR A SUCCESS OF EVOLUTION? *Free Radical Research Communications* **18**, 63-70, 1993.
95. Shigenaga M.K., Hagen T.M., and Ames B.N. OXIDATIVE DAMAGE AND MITOCHONDRIAL DECAY IN AGEING. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91** 10771-10778, 1994.

96. Facchinetti F., Dawson V.L., and Dawson T.M. FREE RADICALS AS MEDIATORS OF NEURONAL INJURY. *Cellular and Molecular Neurobiology* **78**, 297-395, 1998.
97. Gracia I., Ruiz-Ramirez L., Romero L., Márquez A., Gómez-Ruiz C., Tinoco M., Bravo M.E. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. *IN VITRO EVALUATION. Metal Based Drugs* **8**, 19-28, 2001.
98. Gracia I., Ruiz-Ramirez L., Huerta M.L., Mayet M.L., Tinoco M. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. *IN VIVO EVALUATION I. Metal Based Drugs*, 2002.
99. Bravo M.E., Ruiz-Ramirez L., Tinoco M. KNIGHT'S MOVE IN THE PERIODIC TABLE, FROM PLATINUM TO COPPER, NEW ANTICANCER COMPOUNDS, CASIOPEINAS. *IN VIVO EVALUATION II. Metal Based Drugs*, 2002.
100. De Vizcaya-Ruiz A.M.G DISTRIBUTION, TOXICITY AND MODE OF ACTION OF THE NOVEL COPPER-BASED COMPOUND: CASIOPEINA IIGLY. PhD Thesis, School of Biological Sciences, University of Surrey, U.K. 1999.
101. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G.E.N., Kelland L.R., Orr R.M. and Dobrota M. L1210 AND CH1 CELLS TREATED WITH NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER COMPOUND-CASIOPEINA II DIE BY APOPTOSIS. *Anticancer Research* **18**, 48-53, 1998
102. Rivero-Müller A., Plant N., Ruiz-Ramirez L., De Vizcaya-Ruiz A. and Dobrota M. COPPER COMPLEXES WITH ANTICANCER ACTIVITY RAPIDLY DEGRADE DNA. *Anticancer Research* **18**, 4936, 1998.
103. Rivero-Müller A., Plant N., Ruiz-Ramirez L., De Vizcaya-Ruiz A. and Dobrota M. DEGRADATION OF DNA BY THE COPPER-BASED ANTICANCER AGENT CASIOPEINA II *Human and Experimental Toxicology* **17**, 531, 1998.
104. De Vizcaya-Ruiz A., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Kass G.E.N., Kelland L.R. Orr R.M. and Dobrota M. INDUCTION OF APOPTOSIS BY NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER COMPOUND-CASIOPEINA II IN L1210 AND CH1 CELLS. *Toxicology in Vitro* **14**, 1-5, 2000.



105. Luza S.C. and Speisky, H.C. LIVER COPPER STORAGE AND TRANSPORT DURING DEVELOPMENT: IMPLICATIONS FOR CITOTOXICITY. *American Journal of Clinical Nutrition* **63**, 812S-820S, 1996.
106. Ruiz-Ramírez L., Gracia I., De la Rosa M.E., Sumano H., Gómez C., Arenas F., Gómez E., Pimentel E. and Cruces M. CYTOSTATIC, MUTAGENIC, ANTINEOPLASTIC ACTIVITIES AND PRELIMINAR TOXICITY OF COPPER (II) NEW DRUGS: CASIOPEINAS I, II, AND III. *J. of Inorganic Biochemistry* **51**, 1-2, 406, 1993.
107. Klotz L.O., Müller J., Fausel M., Gebhardt R. and Weser U. REACTIVITY OF LIPOPHILIC DISCHIFF-BASE COORDINATED COPPER IN RAT HEPATOCITES. *Biochemical Pharmacology* **51**, 919-929, 1996.
108. Rivero-Müller A. SPECIATION AND REACTIVITY OF THE ANTINEOPLASTIC COPPER-BASED COMPOUND: CASIOPEINA IIGLY. PhD Thesis, School of Biological Sciences, University of Surrey, U.K. 1999.
109. De Vizcaya-Ruiz A.M.G., Rivero-Müller A., Ruiz-Ramirez L., Dobrota M. HEMATOLOGICAL EFFECT OF CASIOPEINA IIGLY A NOVEL COPPER-BASED ANTICANCER AGENT. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **39**, 328. New Orleans, LA, USA. 1998.
110. Miller Y.I. Felikman Y. and Shaklai N. HEMOGLOBIN INDUCED APOLIPOPROTEIN B CROSSLINKING IN LOW-DENSITY LIPOPROTEIN PEROXIDATION. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236**, 252-260, 1996.
111. McKay J. CASIOPEINA IIGLY: MUTAGENICITY AND INFLUENCE ON THE CYTOCHROME P450 SYSTEM. Master of Science dissertation. SBS, University of Surrey, U.K. 1999
112. Majno G. and Joris I. APOPTOSIS, ONCOSIS AND NECROSIS: A OVERVIEW OF CELL DEATH. *American Journal of Pathology* **146**, 3-15, 1995.
113. Choi K., Lee E.H., Choi J., and Joo C. REACTIVE OXYGEN SPECIES-INDUCED APOPTOSIS AND NECROSIS IN BOVINE CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences* **40**, 911-919, 1999.



Bibliografía

114. Bredssolle Francoise, Bromet-Petit Maguy, Pudran Michel. VALIDATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHIC AND GAS CHROMATOGRAPHIC METHODS APLICATIONS TO PHARMACOKINETICS. *J. Chromatography. B.* **686**, 3-10, 1996.
115. Karnes T., Shiu G. VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHODS. *Pharmaceutical Research* **4**, 421-426, 1991.
116. Karnes T., Clark M. PRECISION, ACCURACY AND DATA ACCEPTANCE CRITERIO IN BIOPHARMACEUTICAL ANALYSIS. *Pharmaceutical Research* **10**, 1410-1426, 1993.
117. Secretaria de Salud (SSA) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
118. [FDA] Food and Drug Administration: ICH Harmonized Tripartite Guideline: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: DEFINITIONS AND TERMINOLOGY, ICH Topic Q2A. Federal Register 60 (40) 11200-11262, 1995.
118. [FDA] Food and Drug Administration: ICH Harmonized Tripartite Guideline: VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY, ICH Topic Q2B. Federal Register 62 (96) 27464-27467, 1997.
119. [CDER-FDA] Food and Drug Administration: Guidance for Industry: BIOANALYTICAL METHODS VALIDATIONS FOR HUMAN STUDIES. 1998.
120. Shah V.P., Midha K.K., Findlay J.W.A., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., McKay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T., and Yacobi A. BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION –A REVISIT WITH A DECADE OF PROGRESS-. *Pharmaceutical Research* **17**, **12**, 1551-1557, 2000.
121. J.R. Lang and S. Bolton. *J. Pharmaceutical Biomed. Anal.* **9**, **5**, 357-361, 1991.
122. J.R. Lang and S. Bolton. *J. Pharmaceutical Biomed. Anal.* **9**, **6**, 435-442, 1991.
123. United States Pharmacopeia XXIII, The United States Pharmacopeia Convention, Rockville, Md., 1929, 1994.

