

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**FARMACOCINÉTICA PRECLÍNICA DE CASIOPEÍNA III<sub>ia</sub> Y SU UNIÓN A PROTEÍNAS  
PLASMÁTICAS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

PRESENTA

INÉS FUENTES NORIEGA



TUTOR: DRA. LENA RUIZ AZUARA AÑO: 2005.

H: 350212



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.

Jurado:

Presidente:	Dra. Rosario Muñoz Clares
Primer Vocal:	Dr. Gilberto Castañeda Hernández
Segundo Vocal:	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Tercer Vocal:	Dra. Erika Martín Arrieta
Secretario:	Dr. Héctor Ponce Monter
Primer Suplente:	Dr. Enrique García Hernández
Segundo Suplente:	Dra. Helgi Jung Cook

Lugar donde se desarrollo el tema:

Lab 210 Edificio B

Lab. 112 Conjunto E

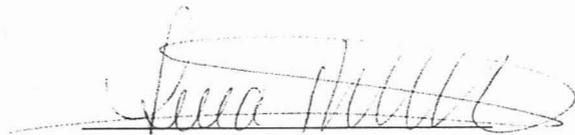
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear,

Departamento de Farmacia

Facultad de Química

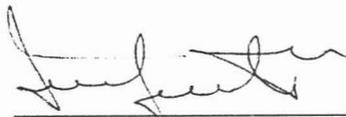
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del Tema



Dra. Lena Ruiz Azuara

Sustentante



M. en C. Inés Fuentes Noriega

A mi familia, Carlos, Fabiola, Tatiana y Carlos "chico", que supieron siempre comprender y apoyar la dedicación a este proyecto.

A los nietos, como un ejemplo para su futuro.

A los compañeros y amigos de Biofarmacia que siempre estuvieron en el momento oportuno.

A la gran "familia" de Casiopeínas.

Un profundo agradecimiento a mi tutor Dra. Lena Ruiz Azuara por el apoyo siempre demostrado.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ines Fuentes Noriega

FECHA: 21 Octubre 2005

FIRMA: [Firma]

Agradecimientos por el apoyo económico para la realización del proyecto doctoral:

FACULTAD DE QUÍMICA (6390-05)

CONACYT G35012N

PAPIIT IN223598

PADEP 205325

CONACYT SECTORIAL SALUD 2002-C01-7677

<b>ÍNDICE</b>	<b>Páginas</b>
Resumen	14
Abstract	16
I. Introducción.	17
Objetivos	
II. Generalidades	20
2.1. Cáncer	20
2.1.1. Clasificación	
2.1.2. Metástasis	
2.1.3. Factores que originan el cáncer	
2.1.4. Epidemiología del cáncer en México	
2.1.5. Tratamientos para el cáncer	
2.2. Unión a proteínas.	31
2.2.1. Proteínas de unión	
2.2.2. Métodos para la determinación de la unión fármaco-proteína	
2.2.2.1. Diálisis al equilibrio	
2.2.2.2. Ultrafiltración	
2.2.2.3. Ultracentrifugación	
2.2.2.4. Microdiálisis	
2.3. Farmacocinética	39
2.3.1. Estudios farmacológicos	
2.3.1.1. Farmacodinamia	
2.3.1.2. Farmacocinética preclínica	42
2.3.1.2.1. Farmacocinética compartimental	44
2.3.1.2.2. Infusión intravenosa	52
2.3.1.2.3. Farmacocinética no compartimental	56
2.3.2. Estudios de toxicidad	60
2.4. Validación de métodos analíticos	60
2.5. Casiopeínas	61

2.5.1. Casiopeína III-Ia [Cu(4-4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetionato)] NO <sub>3</sub> , (Cas III-ia)	64
2.6. Cisplatino.	66
2.6.1. Panorama preclínico	
2.6.2. Mecanismo de acción	
2.6.3. Farmacología	
2.6.4. Actividad antitumoral	
2.6.5. Toxicidad	
2.6.6. Análogos del cisplatino	
III. Hipótesis	70
IV. Parte Experimental	71
4.1. Reactivos	
4.2. Material biológico	
4.3. Equipo	
4.4. Soluciones	72
4.5. Métodos	
4.5.1. Determinación de solubilidad de Cas III-ia	73
4.5.2. Método analítico para la cuantificación de Cas III-ia en plasma	74
4.5.2.1. Condiciones cromatográficas	
4.5.2.2. Preparación de la curva de calibración de Cas III-ia en plasma de rata.	
4.5.2.3 Extracción de Cas III-ia en plasma y cuantificación por CLAR.	
4.5.3. Método analítico para la cuantificación de Cas III-ia en sangre	75
4.5.3.1. Condiciones cromatográficas	
4.5.3.2 Preparación de la curva patrón en sangre de rata	
4.5.3.3 Procedimiento para cuantificar Cas III-ia en sangre de rata	
4.5.4. Método analítico para determinar Cas III-ia en orina de rata	76

4.5.4.1 Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Cas III-ia en orina de rata	
4.5.4.2 Preparación de la curva de calibración de Cas III-ia en orina de rata	
4.5.4.3 Procedimiento para cuantificar Cas III-ia en orina de rata.	
4.5.5. Determinación de unión a proteínas de Cas III-ia por el método de diálisis al equilibrio	77
4.5.5.1 Preparación de la curva de calibración de Cas III-ia en solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4	
4.5.5.2. Preparación de la curva de calibración de Cas III-ia en presencia de albúmina.	
4.5.5.3. Preparación de la curva de calibración de Cas III-ia en plasma de humano	
4.5.5.4. Determinación del tiempo de equilibrio y unión a la membrana en plasma de rata, de humano y albúmina humana.	
4.5.6 Validación de métodos analíticos para la cuantificación de Cas III-ia en sangre, plasma y orina.	78
4.5.6.1 Especificidad	
4.5.6.2. Linealidad del sistema	
4.5.6.3. Linealidad del método	
4.5.6.4. Precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad)	
4.5.6.5. Recobro	
4.5.6.6. Límite de detección y cuantificación.	
4.5.6.7 Estabilidad	
4.6 Determinación del tiempo de equilibrio y unión a la membrana en plasma de rata, plasma de humano y albúmina humana.	81
4.7. Estudios <i>in vitro</i> de cinética de distribución en sangre total.	82
4.8. Estudio preclínico para determinar los parámetros farmacocinéticos de Cas III-ia en rata.	82
4.8.1. Procedimiento empleado en la administración de Cas III-ia en ratas Wistar.	

4.8.2. Estudio preclínico con obtención de muestras urinarias.	83
4.9. Estudio preclínico para determinar los parámetros farmacocinéticos de Cas IIIa en perro.	84
4.9.1. Procedimiento empleado en la administración de Cas IIIa en perro beagle.	
4.10. Determinación de parámetros farmacocinéticos.	84
5. Resultados y discusión	
5.1 Solubilidad Cas IIIa	86
5.2 Validación del sistema	87
5.2.1. Linealidad	
5.2.2. Precisión	
5.3. Validación de los métodos en plasma, sangre y orina.	88
5.3.1. En plasma de rata	89
5.3.2. En plasma humano	90
5.3.2.1. Especificidad	
5.3.2.2. Linealidad	
5.3.2.3. Precisión intradía	
5.3.2.4. Precisión interdía	
5.3.2.5. Recobro	
5.3.2.6. Límite de detección y cuantificación	
5.3.2.7. Estabilidad	
5.3.3. En solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4	94
5.3.3.1. Especificidad	
5.3.3.2. Linealidad del método	
5.3.3.3. Precisión intradía	
5.3.3.4. Precisión interdía	
5.3.3.5. Exactitud.	
5.3.3.6. Límite de detección y cuantificación	
5.3.3.7. Estabilidad	
5.3.4. En sangre de rata.	97

5.3.4.1. Especificidad	
5.3.4.2. Linealidad del método	
5.3.4.3. Precisión intradía	
5.3.4.4. Precisión interdía	
5.3.4.5. Exactitud.	
5.3.4.6. Límite de detección y cuantificación	
5.3.4.7. Estabilidad	
5.3.5. En orina de rata	101
5.3.5.1. Especificidad	
5.3.5.2. Linealidad del método	
5.3.5.3. Precisión intradía	
5.3.5.4. Precisión interdía	
5.3.5.5. Exactitud.	
5.3.5.6. Límite de detección y cuantificación	
5.3.5.7. Estabilidad	
5.4 Estudios de unión a proteínas por diálisis al equilibrio en plasma humano y albúmina humana.	110
5.5 Estudios de cinética de distribución <i>in vitro</i> de Cas III-ia en sangre.	114
5.6 Estudios de farmacocinética realizados en rata Wistar con cuantificación de Cas III-ia en sangre	119
5.7 Estudios de farmacocinética realizados en rata Wistar con cuantificación de Cas III-ia en orina.	121
5.8 Estudio preliminar de farmacocinética de Cas III-ia en perros beagle.	125
VI. Conclusiones	129
VII. Lista de abreviaturas	130
VIII Bibliografía	132

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Clasificación de los tumores	22
Tabla 2 Condiciones asociadas a concentraciones alteradas de proteínas en plasma.	33
Tabla 3 Dosis letal media (DL50) de Casiopeína IIIia en ratón NIH y rata Wistar, vía ip. .	46
Tabla 4 Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Casiopeína IIIia en plasma	53
Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Casiopeína IIIia en sangre de rata.	55
Tabla 6. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Cas-IIIia en orina de rata.	56
Tabla 7. Condiciones cromatográficas de los diferentes fluidos biológicos para la cuantificación de Cas-IIIia por CLAR.	83
Tabla 8. Linealidad del método en plasma humano con resultados de relación de áreas.	86
Tabla 9. Precisión intradía del método en plasma humano	87
Tabla 10. Precisión interdía de la solución de Cas-IIIia en plasma humano considerando relación de áreas, R, promedio.	87
Tabla 11. Precisión interdía de la solución de Cas-IIIia en plasma humano, considerando el porcentaje del coeficiente de variación en los días 1 y 2.	88
Tabla 12. Recuperación del método de Cas-IIIia en plasma humano.	88
Tabla 13. Concentraciones obtenidas en el estudio de estabilidad	89
Tabla 14. Porcentaje obtenido para cada una de las condiciones	89
Tabla 15. Precisión intradía del método de Cas-IIIia en solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4, día 1.	92
Tabla 16. Precisión intradía y exactitud del método de Cas-IIIia en sangre de rata considerando el día 1.	94
Tabla 17. Precisión interdía de Cas-IIIia en sangre considerando el %CV	95

y la desviación estándar absoluta de los puntos control.

Tabla 18. Recuperación del método de Cas-IIIa en sangre de rata, con puntos control 7, 12 y 27 $\mu\text{g/mL}$ .	95
Tabla 19. % de desviación absoluta en la estabilidad de Cas-IIIa en sangre durante 12 h,	96
Tabla 20. Porcentaje de recuperación promedio en los puntos control, 4, 8 y 12 $\mu\text{g/mL}$	99
Tabla 21. Precisión intradía y exactitud del método de Cas-IIIa en orina con puntos control de 4, 8 y 12 $\mu\text{g/mL}$	100
Tabla 22. Estabilidad de Cas-IIIa en orina a 0 h	101
Tabla 23. Estabilidad de Cas-IIIa en orina a 12 h	101
Tabla 24. Estabilidad de Cas-IIIa en orina a 24 h	102
Tabla 25. Puntos control de Cas-IIIa en orina al tiempo cero (mismo día de preparación). Ecuación: $y = 1.0213x - 0.0967$ con una $r = 0.9989$ .	102
Tabla 26. Puntos control de Cas-IIIa en orina con dos ciclos de congelación-descongelación	103
Tabla 27. Sol. de Cas-IIIa en orina (puntos control), en las condiciones cromatográficas mencionadas en el párrafo 4.5.3.1 de la parte experimental, con una columna hypersil-keystone C18.	103
Tabla 28. Solución de Cas-IIIa en orina (puntos control), en las condiciones cromatográficas mencionadas en 4.5.3.1, con columna hypersil elite C18	104
Tabla 29. Parámetros estadísticos en la validación del método de Cas-IIIa por CLAR.	104
Tabla 30. Unión a la membrana para el estudio de unión a proteínas plasmáticas por el método de diálisis al equilibrio.	107
Tabla 31. Resultados promedio de la unión (%) a proteínas plasmáticas de Cas-IIIa en las diferentes matrices biológicas. (ND, no detectado)	107
Tabla 32. Concentraciones sanguíneas observadas y predichas de una administración de Cas-IIIa en ratas Wistar con una dosis bolo de 10 mg/Kg.	114

Tabla 33. Parámetros farmacocinéticos obtenidos de la administración de 10 mg/Kg de Cas-IIIa a ratas Wistar.	115
Tabla 34. Datos del estudio en ratas Wistar con obtención de datos urinarios según el programa WINNONLIN y analizado por el método de trapezoides lineal	118
Tabla 35. Parámetros farmacocinéticos obtenidos en las diferentes especies estudiadas.	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Disposición de un fármaco en plasma con modelo de un compartimento	46
Figura 2. Concentración de un fármaco en plasma con los diferentes cambios en los distintos tejidos.	47
Figura 3. Disposición de un fármaco con modelo de dos compartimentos.	48
Figura 4. Curva de niveles plasmáticos contra tiempo con infusión intravenosa constante.	50
Figura 5. Estructura del compuesto de Casiopeína IIIa, No. CAS 223930-33-4	51
Figura 6. Espectro de Casiopeína III-ia en solución acuosa, arriba antes de refrigeración y abajo después de refrigeración por 15 días.	86
Figura 7. Linealidad del sistema. Gráfica promedio de una curva de calibración con dos repeticiones de Cas IIIa en metanol-agua.	87
Figura 8. Cromatograma de una muestra de plasma de humano sin solución de Cas IIIa, (blanco).	90
Figura 9. Cromatograma de Cas IIIa en plasma de humano, 25 ug/mL. Tiempo de retención 5.4 minutos.	91
Figura 10. Cromatograma blanco de solución amortiguadora 64 mM pH = 7.4.	95
Figura 11. Cromatograma de Cas IIIa, 10 ug/mL en solución amortiguadora 64 mM pH = 7.4.	95
Figura 12. Linealidad de solución de Cas IIIa en solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4 en el intervalo de 5 – 100 µg/mL.	96
Figura 13. Cas IIIa en sangre de rata, 50 ug/mL, Tiempo de retención (Tr) 5.95 minutos, Heparina Tr 10.8 minutos y Ranitidina Tr 7.8 minutos	98
Figura 14. Cromatograma blanco de sangre	98
Figura 15. Linealidad promedio de Cas IIIa en sangre de rata 5 – 50 µg/mL, utilizando relación de áreas con estándar interno de ranitidina (2.5 µg/mL).	99
Figura 16. Cromatograma de blanco de orina	102

Figura 17. Cromatograma de Cas IIIi en orina, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	102
Figura 18. Cromatograma de un pool de orina con el producto Cu-4,4'dimetil el cual no se observa en el tiempo de análisis de 13 minutos	103
Figura 19. Cromatograma del producto Cu-acetilacetato en orina, Tr de 6.5 minutos	103
Figura 20. Linealidad promedio del método de Cas IIIia en orina con relación de áreas utilizando estándar interno de clorhidrato de ranitidina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).	104
Figura 21. Determinación del tiempo de equilibrio de Cas IIIia en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM pH 7.4.	111
Figura 22. Influencia de la concentración de fármaco en la fracción unida para una concentración de proteína constante. (29).	114
Figura 23. Cinética de distribución <i>in vitro</i> en sangre de rata, concentración 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cas IIIia	115
Figura 24. a) Arriba. Cinética de distribución <i>in vitro</i> de Cas IIIia en plasma y sangre de rata, concentración inicial 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cas IIIia. b) Abajo. Comportamiento de la cinética de distribución de Cas IIIia analizado en muestras plasmáticas por el programa WINNONLIN.	115
Figura 25. a) Arriba. Cinética de distribución <i>in vitro</i> de Cas IIIia en sangre de rata, concentración 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ b) Parte media. Ajuste de los datos de la cinética analizada en sangre con el programa WINNONLIN. c) Abajo. Ajuste de los datos de la cinética analizada en plasma, con el mismo programa.	116
Figura 26. Representación esquemática de de distribución cinética del fármaco considerando a los eritrocitos de la sangre.	118
Figura 27. Gráfica de los datos analizados de Cas IIIia en sangre de rata de acuerdo al modelo propuesto de dos compartimentos. Dosis bolo intravenosa de 10 $\text{mg}/\text{kg}$ .	119
Fig 28. Estudio de Cas IIIia en ratas Wistar con obtención de datos urinarios, dosis bolo intravenosa 9 $\text{mg}/\text{kg}$ .	123
Figura 29. Estudio de Cas IIIia en ratas Wistar, método de cantidad remanente (sigma menos). Dosis bolo intravenosa 9 $\text{mg}/\text{kg}$	124
Figura 30. Administración de Cas IIIia en el perro por infusión intravenosa con una dosis de 3 $\text{mg}/\text{kg}$	126

Fig. 31. Administración de Cas IIIa por infusión intravenosa al perro beagle, dosis 9 mg/kg.

127

## Resumen.

Las Casiopeínas®, compuestos con potencial antineoplásico, se sintetizaron por la Dra Lena Ruiz Azuara y su grupo en la Facultad de Química, UNAM. Algunos de ellas han demostrado tener actividad citotóxica y citostática, tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se decidió continuar su estudio con la fase preclínica de acuerdo a lo recomendado por el National Cancer Institute (NCI) para el desarrollo y selección de posibles fármacos anticancerosos.

Uno de estos compuestos es la Casiopeína IIIa que ha sido evaluada *in vitro* en líneas tumorales humanas (cérvico uterino, CaLo, CaSki, C33, SiHa y HeLa) mostrando actividad antineoplásica. Este compuesto se encuentra en estos momentos en la fase preclínica de desarrollo, en este trabajo se llevó a cabo la validación de la metodología analítica en plasma, orina y sangre para iniciar los estudios de unión a proteínas plasmáticas y de farmacocinética en ratas y perros. A la fecha, se conocen algunos parámetros biofarmacéuticos y farmacocinéticos: Es soluble en agua, metanol y soluciones fisiológicas a pH 7.4, su unión a proteínas plasmáticas es de  $48.3 \pm 7.6\%$  -  $57.7 \pm 9.6\%$  en plasma de rata y en humano de  $76.3 \pm 0.17\%$  -  $89.1 \pm 1.9\%$ . Su cociente de distribución ( $C_{\text{sangre}}/C_{\text{plasma}}$ ) es mayor a 1. Los parámetros farmacocinéticos determinados en el estudio con muestreo de sangre total de rata Wistar son: una vida media de 12.46 h, un volumen de distribución de 0.118 L y una depuración de 0.115 mL/min con una dosis bolo intravenosa de 9 mg/kg. En estudios con muestreo de orina de rata Wistar mostraron un porcentaje de 29.54% excretado de fármaco total en orina. Por otro lado, los estudios preliminares de farmacocinética en perros beagle, con dosis de 3 y 9 mg/kg, por infusión intravenosa, dieron pauta para encontrar la dosis y el intervalo de tiempo de muestreo más adecuados

para llevar a cabo el estudio formal y así obtener el modelo y los parámetros farmacocinéticos que ayuden a extrapolar el régimen terapéutico en humanos.

## Abstract

Casiopéinas®, compounds with antineoplastic activity have been synthesized by Lena Ruiz Ramirez and coworkers (Faculty of Chemistry, UNAM). Some of these compounds have demonstrated *in vitro* and *in vivo* cytotoxic and cytostatic activity, and were taken into the preclinical phase according to the guidelines of the National Cancer Institute (NCI) to develop a new antineoplastic drug.

One of these Casiopéina drugs, Casiopéina III-ia was found effective *in vitro* test against several human tumoral lines (cervical- uterine, , CaLo, CaSki, C33, SiHa y HeLa) and have shown *in vivo* antineoplastic activity, following recommended protocols by the Cancer Chemotherapy National Service Center (National Cancer Institute of United States of America). The drug is under preclinical phase investigation, in the present work, the analytical validation methodology in plasma, urine and total blood was investigated in order to start studies in plasmatic protein binding, rat and dog pharmacokinetics. Some biopharmaceutics parameters and preclinical pharmacokinetics were studied: solubility in water, methanol, and physiologic solutions at pH 7.4, plasmatic protein binding in rat ( $48.3 \pm 7.6\%$ –  $57.7 \pm 9.6\%$ ) and human ( $76.3 \pm 0.17\%$  –  $89.1 \pm 1.9\%$ ) and partitioning relation  $C_{\text{blood}}/C_{\text{plasma}}$  (greater than 1). Pharmacokinetics parameter in rat's total blood gave a half life of 12.46 h, a distribution volume of 0.118 L and a clearance of 0.115 mL/min for an intravenous bolus of 9 mg/kg. For urine rat the data observed was the excreted percentage of 29.54% of the dose. Pharmacokinetic parameters in beagle dogs, with an infusion bolus of 3 and 9 mg/kg will help us to carry the formal study with dose and dose interval suitable to obtain the model and pharmacokinetics parameters to help us to extrapolate the therapeutic regimen to humans.

### I. Introducción

El cáncer o neoplasia maligna constituye un grupo de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales y poco diferenciadas que no responden correctamente a las señales de control de las células normales del organismo. Este crecimiento incontrolado sin restricciones tales como la diferenciación, limitación del órgano, etc, permite que las células invadan tejidos adyacentes y, frecuentemente, sean capaces de inducir metástasis, lo cual provoca en la mayoría de los casos la muerte del paciente.

El cáncer es la tercera causa de muerte en México después de las enfermedades del corazón; es responsable del 10 por ciento de las defunciones por patologías. Entre 1985 y 1994 se registraron 405 mil 841 muertes con cáncer. Un análisis de las tendencias de este mal crónico degenerativo, con frecuencia incurable, reporta que la mayor incidencia se da en mujeres. Las neoplasias más comunes en México son cáncer cérvico uterino y de glándulas mamarias.

Dentro de los tratamientos que se utilizan para combatir el cáncer se encuentran la cirugía, la radioterapia ó la quimioterapia. Esta última es efectiva sólo en algunos casos, ya que se ha encontrado que muchos de los tumores son o se vuelven refractarios a los fármacos ya existentes, o bien, éstos son muy tóxicos al organismo, sin embargo, al ser un tratamiento sistémico permite distintos tratamientos generalizados a todo el cuerpo. Todo ello, hace indispensable la búsqueda de fármacos que actúen de manera selectiva sobre las células cancerosas y que, además, tengan un espectro de actividad más amplio. En México, se justifica aun más esta búsqueda debido a que la mayoría de los fármacos antineoplásicos son de origen extranjero, por lo que sus precios son elevados y, por lo tanto, son poco accesibles a la mayoría de la población; además, son muy pocos los fármacos introducidos

para combatir tumores sólidos. En el caso del cáncer cérvico-uterino, en sus estadios clínicos muy avanzados, no existe una terapia simple con fármacos que ataque el crecimiento del tumor totalmente (efectividad en su respuesta sólo de un 38%). Cuando se utiliza terapia combinada se llega a tener un 77% de respuesta utilizando cuatro fármacos (mitomicina, vincristina, bleomicina y cisplatino), lo cual implica mucho mayor toxicidad y menor calidad de vida del paciente. Debido a la alta toxicidad de los compuestos anticancerígenos empleados actualmente y a que se han presentado casos de resistencia cruzada al cisplatino, hay una búsqueda continua a nivel mundial de nuevos compuestos con potencial anticancerígeno que no presenten dichos problemas.

En la Facultad de Química de la UNAM, la Dra Lena Ruiz Azuara diseñó una familia de fármacos con potencial antineoplásico a los que se les ha denominado Casiopeínas® y bajo su dirección han sintetizado alrededor de 200 de estos compuestos (1 - 4). Algunos de ellos han demostrado tener actividad anticancerígena, tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo que se decidió continuar con la fase preclínica de acuerdo a lo recomendado por el National Cancer Institute (NCI) para el desarrollo y selección de posibles fármacos anticancerígenos. A partir de 1991 se empezó a estudiar *in vitro* la actividad mutagénica, citostática y citotóxica de los compuestos de Casiopeínas, en especial aquellas de las familias I, II y III (5,6). En 1995, se reportan las primeras estructuras cristalinas de estos compuestos con propiedades antineoplásicas (7-10). En 1997 se reportó una evaluación de la reactividad del peroxinitrito con casiopeínas, encontrándose que los complejos de cobre (II), con por lo menos un sitio de coordinación ocupado por agua y con ligandos de fenantrolina y aminoácidos, crean la posibilidad de muchas combinaciones y permiten la actividad ácida de Lewis del centro metálico y, por consiguiente, reaccionan muy rápido en reacciones de

sustitución de ligante (con una tasa de velocidad limitada por difusión). Las nitraciones de residuos aromáticos en proteínas, particularmente la que ocurre con tirosina en sistemas biológicos, se considera un ejemplo de la formación de peroxinitrito *in vivo*, donde existe una abstracción de H seguida por una unión covalente entre el radical tirosil y  $\bullet\text{NO}_2$ . La nitración por el radical libre  $\bullet\text{NO}_2$ , generada por el peroxinitrito, tiene gran importancia debido a que pueden causar muchas alteraciones en la estructura y función de las proteínas. Estas nitraciones son catalizadas por un gran número de ácidos de Lewis, incluyendo  $\text{CO}_2$ ,  $\text{Fe}(\text{EDTA})^+$ , Cu/Zn superóxido dismutasa y cobre (II), incluyendo también los complejos de este metal con casiopeínas (12). En 1998 se reportó que la casiopeína IIgly hidroliza enlaces fosfodiéster en plásmidos de DNA en presencia de agentes reductores (ácido ascórbico y  $\beta$ -mercaptoetanol) (13). En 2000 (15) se reportó que este compuesto mostraba inducción de apoptosis en células CH1 (carcinoma de ovario humano) y en células L1210 (leucemia murino). Uno de los compuestos sintetizados es la Casiopeína IIIia que ha sido evaluada *in vitro* en líneas tumorales humanas (de cáncer cérvico uterino y mamarios) y ha mostrado tener actividad antineoplásica *in vivo* en los ensayos exigidos dentro del panel de cenimiento sugeridos por el Cancer Chemotherapy National Service Center del National Cancer Institute de los Estados Unidos de América. También, se ha observado su actividad anticancerígena en casos de leucemia viral felina (LVF) y, actualmente, se está evaluando su efectividad en carcinoma mamario canino y de rata. Se ha reportado la determinación de su estructura y su reactividad con metionina (16). Se encuentra en estos momentos la Casiopeína III-ia en la fase preclínica dentro de la cual están comprendidos los siguientes objetivos:

- a) Determinación de parámetros fisicoquímicos como solubilidad y estabilidad del compuesto en soluciones fisiológicas, para ampliar el conocimiento biofarmacéutico de un nuevo compuesto.
- b) Desarrollo y validación de la metodología analítica para cuantificación de casiopeina IIIi en fluido biológico (plasma, sangre y orina).
- c) Determinación de su unión a proteínas plasmáticas en plasma de rata y humano.
- d) Determinación de la cinética de distribución *in vitro* en sangre de rata.
- e) Determinación de la farmacocinética preclínica en rata para obtener los parámetros farmacocinéticos.
- f) Estudio preliminar de la farmacocinética preclínica en perros beagle.

## II.Generalidades

### 2.1. CÁNCER.

El cáncer es un grupo de enfermedades que comparten ciertas características biológicas, como la tendencia de invadir y destruir los tejidos adyacentes, su resistencia al tratamiento y la capacidad de emitir metástasis lo que suele causar la muerte del paciente en la mayoría de los casos. Desde el punto de vista puramente celular, el cáncer es un trastorno genético en el sentido de que las células originalmente alteradas dan origen a células hijas que poseen y continúan transmitiendo las alteraciones en sus genes.

En cualquier parte del cuerpo pueden originarse grupos de células que proliferen de forma anormal. De ellos, los que no pueden invadir los tejidos vecinos y permanecen estrictamente localizados reciben el nombre de tumores benignos, los que se diseminan

desde el lugar de origen y pueden alcanzar el torrente sanguíneo y el sistema linfático (metástasis) reciben el nombre de tumores malignos o cáncer (17,18).

Las formaciones cancerosas poseen la propiedad de invadir los tejidos normales, a los que pueden destruir o reemplazar con su anárquico desarrollo. En su carrera desenfrenada pueden afectar a los nervios, produciendo dolor; a los vasos sanguíneos, que rompen produciendo hemorragias, y a otras estructuras como los tejidos pulmonares, arterias, riñones y vejiga. La acumulación de células en rápido crecimiento da lugar a la formación de tumores, proceso al que se conoce como carcinogénesis.

Este es un proceso complejo que transcurre a lo largo de por lo menos tres diferentes etapas:

*Iniciación:* es un daño permanente y transmisible en el ADN de una célula que, si no se repara, se fija como mutación, quedando la célula iniciada. Los agentes iniciadores son por definición compuestos genotóxicos, es decir, compuestos que pueden interactuar con el ADN y dañarlo, o bien que puede interferir con los procesos de manejo de la información genética, provocando errores a la síntesis de ADN.

*Promoción:* En esta etapa ocurre una expansión clonal (hiperplasia), que puede ser reversible, a partir de la célula que se inició. Se requiere de la presencia continua del nivel umbral del agente promotor, que es un compuesto químico, físico o biológico necesario para la formación de determinados tumores.

*Progresión:* Es la adquisición del carácter maligno por la neoplasia. Una de las células iniciadas y en promoción, espontáneamente o de manera inducida por otros sucesos, adquiere otras alteraciones genéticas que le hacen adoptar el fenotipo maligno (invasión, angiogénesis, metástasis, etc). Hay aparición secuencial de subpoblaciones cada vez más aberrantes genéticamente, lo que les confiere una diferenciación aberrante con la

característica de poder escapar, invadir y colonizar (entrar en fase de metastásis) órganos distantes (18). El fenómeno de la promoción parece ser el de la activación de los mecanismos de transducción de la señal proliferativa, es decir, a nivel de la estimulación de la división celular.

### 2.1.1 Clasificación del cáncer

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican principalmente atendiendo al órgano en que se han originado y a la clase de células afectadas (Tabla 1). Por ejemplo, los tumores que se originan de tejido mesenquimal son llamados sarcomas; las neoplasias originadas de músculo liso se denominan leiomiomas; los tumores malignos de músculo esquelético rhabdomiomas (20). Las neoplasias malignas originadas de células epiteliales y derivadas de cualquiera de las tres capas germinales se llaman carcinomas. Cuando tienen origen de glándulas se denominan adenocarcinomas. A los carcinomas originados de cualquier epitelio plano estratificado se les denomina carcinomas epidermoides. En resumen, se cuenta con una gran variedad de tipos de la enfermedad, lo que hace más difícil su control y tratamiento.

[Tabla 1 Clasificación de los tumores (20)]

TEJIDOS DE ORIGEN	BENIGNO	MALIGNO
1. EPITELIO		
De revestimiento	Papiloma	Carcinoma
Glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
Trofoblasto	Mola hidatídica	Coriocarcinoma
2. TEJIDO		

## INTRODUCCION Y GENERALIDADES

CONJUNTIVO		
Fibroso	Fibroma	Fibrosarcoma
Adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Muscular liso	Leiomioma	Leiomiomasarcoma
Muscular estriado	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma
Cartilaginoso	Condroma	Condrosarcoma
Óseo	Osteoma	Osteosarcoma
Linfático	Linfagioma	Linfangiosarcoma
Sanguíneo	Hemangioma	Hemangiosarcoma
Linfoideo		Linfoma
Mesotelio (peritoneo y pleura)	Mesotelioma	Mesotelioma maligno
Médula osea		Leucemias
Sinovial	Sinovioma	Sinovioma maligno
3. TEJIDO NERVIOSO		
Nervios	Neuroma	
Vaina nerviosa	Neurofibromas	
	Neurilemonas	Schawanoma maligno
Células simpáticas	Ganglioneuromas	Neuroblastomas
Glia	Glioma	Glioma
4. OTROS TEJIDOS		
Células pigmentadas	Nevo	Melanoma

Médula suprarrenal	Feocromacitoma	Feocromacitoma
Células comafines	Carcinoides	Carcinoide maligno
Células APUD	Apudoma	Apudomas malignos
Embriónicos	Quistes dermoides	
	Teratomas	Teratomas malignos
Timo	Timomas	Timoma maligno

### 2.1.2 Metástasis.

Cualquiera que sea la causa, el cáncer es básicamente una enfermedad de las células que se caracteriza por un cambio en los mecanismos de control que regulan su proliferación y diferenciación. Aquellas que han sufrido una transformación neoplásica suelen expresar antígenos de superficie celulares que parecen ser de tipo fetal normal y tienen otros signos de inmadurez aparente y, quizá, presenten anormalidades cromosómicas cualitativas o cuantitativas, incluyendo varias traslocaciones y la aparición de secuencias amplificadas de genes. Estas células proliferan de manera excesiva y forman tumores locales que tal vez compriman o invadan las estructuras normales adyacentes. Una subpoblación pequeña de células dentro del tumor pueden describirse como células madres tumorales. Mantienen la capacidad de experimentar ciclos repetidos de proliferación, así como de migrar a sitios distantes en el cuerpo para colonizar varios órganos en el proceso denominado metástasis. Estas células madre tumorales pueden expresar entonces capacidad clonogénica o formadora de colonias, con frecuencia tienen anormalidades cromosómicas que reflejan su inestabilidad genética, lo cual lleva a la selección progresiva de las subclonas que pueden

sobrevivir más fácilmente en el ambiente multicelular del huésped. El proceso de metástasis implica una cascada de pasos secuenciales ligados, en los cuales se llevan a cabo múltiples interacciones huésped-tumor. Esta progresión neoplásica se acompaña de anomalías genéticas en diversas vías metabólicas y componentes celulares. Los procesos invasivos y metastáticos, así como una serie de anomalías metabólicas que resultan del cáncer, producen enfermedades y la muerte del paciente a menos que se erradique la neoplasia con tratamiento.

No todos los tumores invasivos tienen rápido crecimiento, algunos crecen lentamente, a pesar de que se sabe que las células malignas suelen tener considerable motilidad. Los pacientes con cáncer diseminado (por ejemplo leucemia aguda) pueden tener  $10^{12}$  células tumorales en todo el cuerpo al momento del diagnóstico. Si la dosificación eficaz tolerable de un medicamento es capaz de eliminar 99.9% de las células tumorales clonogénicas, esto podría inducir una remisión clínica de la neoplasia relacionada con una mejoría sintomática. No obstante, aún podría haber  $10^9$  células tumorales que permanecen en el cuerpo, incluyendo algunas que podrían ser inherentemente resistentes al medicamento y otras que pudieran residir en el sistema nervioso central, donde difícilmente puede llegar el medicamento. El tratamiento oncológico puede dividirse en dos componentes: las medidas para el control local y la terapéutica de la enfermedad sistémica. A menudo es necesario combinar diversas modalidades terapéuticas para mejorar el control locorregional o el sistémico, o ambos. Esto es, el tratamiento oncológico actual tiene un carácter multidisciplinario.

El ciclo celular es un modelo diseñado para explicar etapas celulares, que terminan y reinician con división celular, que a su vez, se divide en distintas fases. El concepto de fase surgió cuando se descubrió que la división nuclear y la síntesis de ácido

desoxirribonucleico (DNA) ocurren en momentos precisos. El ciclo celular pudo entonces dividirse en la fase S, caracterizada por la síntesis de DNA, y la fase M que termina con la mitosis. Desde el punto de vista morfológico, la célula se halla en aparente reposo entre estas dos fases. Al periodo entre las fases M y S se le conoce como  $G_1$  y entre la fase S y M como  $G_2$ .

Después de la mitosis y antes de la replicación del DNA, las células bien diferenciadas entran con frecuencia en un estado de aparente reposo diferente denominado fase  $G_0$ . Durante el ciclo existen dos puntos importantes de revisión, uno antes de finalizar la fase  $G_1$  y el otro en la fase  $G_2$ , en estos puntos existen controles restrictivos, es decir en caso de encontrarse un defecto en el ADN, el inicio de la siguiente fase se bloquea y se interrumpe el del ciclo celular. El punto de restricción de  $G_1$  está regulado por una proteína codificada por el gen p53. Cuando ésta detecta un error antes de la síntesis, pueden observarse dos fenómenos; la apoptosis, que induce a la célula a autodestruirse, o el arresto celular, un fenómeno en el que la célula permanece viva, pero es incapaz de continuar hacia la siguiente fase del ciclo celular.

Hoy se sabe que muchos agentes quimioteráuticos provocan la muerte celular a través de la apoptosis. Aún no está claro cuales son las rutas bioquímicas que los diferentes fármacos quimioteráuticos utilizan para llegar a este punto final, ya que los diversos agentes tienen diferentes mecanismos de acción e incluso un efecto variable dependiente de varios factores:

- 1) Los inherentes al paciente, como sexo, edad, grado de actividad, estado nutricional y enfermedades concomitantes.
- 2) Los propios del tumor, como tipo histológico, cinética celular, presencia de moléculas de resistencia celular, distribución intratumoral del fármaco, etc.

3) Aquéllos inherentes al medicamento, como intensidad posológica , vía de administración (oral o intravenosa, en infusión continua o en carga rápida), especificidad de un tipo de medicamento sobre una neoplasia determinada, variación farmacocinética individual y efecto de tratamientos previos con fármacos antineoplásicos.

### 2.1.3 Factores que originan el cáncer

Los factores que originan el cáncer se dividen en dos grandes grupos: los factores exógenos, que constituyen 80-90% de los casos, y los factores endógenos, que forman el 10-20% restante.

Los factores exógenos se dividen en cuatro grupos de acuerdo a la naturaleza que lo origine: físico, químico, biológico y social. El factor puede ser genotóxico, es decir, que cause un daño al material genético de la célula (ADN) o no genotóxico, en el cual su actividad es a nivel de la estimulación de la proliferación celular. Al aumentar la capacidad proliferativa de las células también se aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones en el ADN que deriven en cambios en la proliferación y la diferenciación de la célula.

En el caso de los factores sociales se ha demostrado que son aquellos que causan inmunodepresión, lo que deriva en la falta de reconocimiento de las células malignas por el sistema inmunológico permitiendo así su proliferación y propagación.

Los factores endógenos pueden ser de dos tipos: por mutaciones espontáneas en el ADN, generalmente mutaciones puntuales, o bien por mutaciones heredadas (19). Las mutaciones puntuales espontáneas, pueden ocurrir por diferentes causas: infidelidad de la ADN polimerasa, depurinación espontánea, daño oxidativo causado por radicales libres generados por diferentes procesos biológicos. Entre las mutaciones heredadas, están la

inserción de elementos móviles (retrovirus endógenos presentes en el 5% de la población) y deaminación espontánea de la 5-metil citosina a timina (mutación poco reparable).

### 2.1.4 Epidemiología del cáncer en México

El cáncer constituye un problema de salud pública. En nuestro país constituyó la segunda causa de muerte en el año de 1995 con 48 222 decesos, el 11.2% del total de muertes. Durante ese año se reportaron 73 299 casos nuevos de cáncer en México con predominio en la población del sexo femenino (64.7%).

La distribución de muertes por cáncer de acuerdo a las edades en población masculina es: En primer lugar, de 75 años o más, con un 20%, seguido por el de 60-64 años con un 11.8% de muertes. En población femenina, con las mujeres de 75 años ó más se registró un 11.5% de muertes, menor al correspondiente para en el sexo masculino. Casi igual en porcentaje se encontró en el grupo de mujeres entre 45 a 49 años con un 11.2% y en edades de 40 a 44 años se encontró un 10%, observándose que en el sexo femenino se presentan el cáncer a menor edad. (19)

Los tipos de cánceres más frecuentes, según su topografía anatómica fueron: el del cuello del útero 21.5%, de la glándula mamaria 10.6%, de la glándula prostática 5%, del estómago 3.9% y del ganglio linfático 3.7% (20).

### 2.1.5 Tratamientos contra el cáncer

Actualmente, existen diversos tratamientos contra el cáncer, como quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia y terapia hormonal, entre otros. De ellos, la quimioterapia puede ser el único tratamiento de elección para ciertas afecciones malignas. Se puede emplear quimioterapia (tratamiento sistémico) cuando se considera que las

medidas iniciales utilizadas para tratar el cáncer en su asiento primario, como la cirugía y la radiación (tratamientos locales), no bastan para controlar la enfermedad. También, cuando la enfermedad ha iniciado el proceso de metástasis antes de ser diagnosticada, ya que ninguno de los otros tratamientos puede matar o eliminar eficazmente las metástasis no reconocidas. Estos focos tumorales metastásicos son el blanco adecuado para la quimioterapia.

Se entiende por quimioterapia el uso de fármacos citotóxicos que resultan ser más tóxicos para las células tumorales que para las normales y que, por lo tanto, se dice que exhiben una toxicidad selectiva. La quimioterapia inhibe el cáncer por medio de varios mecanismos de acción, los cuales pueden ser:

- Inducción de la muerte celular a través de medios específicos o no específicos (citotoxicidad).
- Supresión del desarrollo de las células cancerígenas por periodos variables de tiempo sin inducir la muerte celular (efecto citostático).
- En raras ocasiones puede inducir la diferenciación celular, luego de la cual, el cáncer ya no tiene relevancia porque se inhibe su diseminación.

La quimioterapia postquirúrgica puede aumentar las oportunidades de curación a largo plazo y los intervalos libres de enfermedad en los casos no curados, y se considera que es efectiva por las siguientes razones:

- La masa tumoral se reduce al aplicar cirugía, por lo tanto, resulta más factible que una mayor cantidad de células remanentes sea destruida.
- Una población reducida de células tumorales debe ser más sensible a los agentes quimioterapéuticos ya que las poblaciones más pequeñas se reproducen más activamente que las poblaciones más grandes y estáticas. Como la mayoría de los

fármacos actúan de manera selectiva sobre las células en ciclo celular activo, será de esperarse un mayor potencial de destrucción celular en los tumores más pequeños.

La quimioterapia tal como se emplea ahora, puede ser curativa de algunas neoplasias diseminadas que han sufrido engrosamiento o diseminación (angiogénesis) microscópica al momento del diagnóstico. Estas son cáncer testicular, linfoma de células alargadas difuso, enfermedad de Hodgkin, coriocarcinoma, leucemia linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt, entre otras. También la quimioterapia puede proporcionar un tratamiento paliativo para muchas otras manifestaciones de cáncer, pero generalmente se realiza un tratamiento combinado (combinaciones óptimas de tratamiento), de radioterapia, quimioterapia y cirugía (17).

Un problema importante en la quimioterapia es la resistencia de los tumores a los fármacos. Algunos tipos de tumores como los cánceres pulmonares y de colon, muestran resistencia primaria y no responden a los agentes estándares disponibles (antimetabolitos, antibióticos peptídicos, carboplatino, etc). Se puede presentar resistencia adquirida que se desarrolla en un tipo de tumores sensibles al fármaco. Ésta puede ser altamente específica a un solo medicamento y se basa en un cambio en la respuesta genética de las células tumorales con amplificación en la expresión de uno o más genes específicos. En otros casos, se presenta un fenotipo resistente a múltiples fármacos que se desarrolla después de la exposición a un solo agente.

Entre los agentes quimioterapéuticos más empleados se encuentra el cisplatino, descubierto por Rosenberg en 1965 al observar que se inhibía el crecimiento de un cultivo bacteriano cuando éste era sometido a una corriente eléctrica transmitida por electrodos de platino (21). Posteriormente, se demostró que el efecto inhibitor sobre la multiplicación de las

bacterias se debía a la formación de compuestos que contenían platino oxidado en presencia de iones amonio y cloruro. Se encontró que el cis-diclorodiamino platino II (cisplatino) era el compuesto con mayor actividad antitumoral en los sistemas experimentales (21).

Si bien el cisplatino ha sido un fármaco que revolucionó el tratamiento de tumores que hasta entonces eran refractarios a fármacos, presenta una alta toxicidad y su costo es alto. Se han desarrollado análogos menos tóxicos como oxiplatino, espiroplatino y carboplatino que son aun más costosos. Estos fármacos en quimioterapia son los únicos que contienen metales (21).

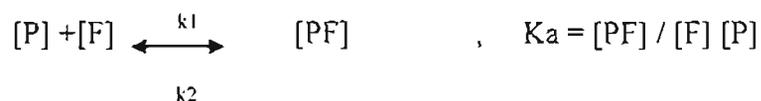
### 2.2 UNIÓN A PROTEÍNAS

El término unión puede definirse como una interacción reversible o irreversible entre dos moléculas. Se puede considerar que esta interacción es análoga a la que se da entre una enzima y un sustrato con la diferencia de que el complejo no se descompone para originar nuevos productos (22, 23).

Debido a la relativa facilidad de los experimentos, la unión de fármacos se mide *in vitro* principalmente en plasma o con proteínas plasmáticas purificadas, por lo cual se sabe que muchos fármacos se unen a las proteínas plasmáticas. Los fármacos ácidos lo hacen predominantemente con la albúmina y los alcalinos con la  $\alpha$ -1-glicoproteína. La unión con otras proteínas suele producirse en grado mucho menor. Por lo común, la unión es reversible y, a veces, se observa unión covalente de fármacos reactivos, como los agentes alquilantes.

Por otro lado, es bien sabido que la fracción no unida de un fármaco en plasma es un importante determinante de la farmacocinética y farmacodinamia de varios fármacos (23,24). Dado que solamente el fármaco libre puede atravesar las membranas biológicas, la concentración del fármaco libre ( $C_L$ ) tendrá mas influencia en el efecto farmacodinámico, que la concentración plasmática total ( $C_T$ ). De ahí, que desde el punto de vista terapéutico, tenga más interés la  $C_L$  que la concentración de fármaco unido ( $C_U$ ) y, por ello, será más importante determinar la fracción libre ( $f_L$ ) que la fracción unida ( $f_U$ ).

La unión reversible de los fármacos (F) a proteínas (P) es un proceso dinámico que se describe mediante la ley de acción de masas y cuya constante de equilibrio o de afinidad es:



[PF] representa el complejo fármaco-proteína, [F] y [P] son concentraciones molares de fármaco y proteína respectivamente.

Si  $f_L = C_L / C_T$ , lo que es lo mismo  $f_L = [F] / C_T$ . Considerando  $C_T$ , concentración total de fármaco

Despejando [F] se tiene  $[F] = f_L * C_T$ .

Si  $f_U = C_U / C_T$ , lo que es lo mismo  $f_U = [PF] / C_T$ .

Despejando [PF] se tiene  $[PF] = f_U * C_T$ .

Como  $f_U = 1 - f_L$ , entonces  $[PF] = (1 - f_L) C_T$ .

Sustituyendo [F] y [PF] en  $K_a$ :  $K_d = [PF] / [F] [P] = (1 - f_L) C_T / f_L * C_T [P]$ ,

despejando  $f_L$  queda:  $f_L = 1 / (1 + K_d * [P])$

Por lo tanto, la fracción libre de fármaco dependerá de la constante de afinidad,  $K_a$ , y de los sitios de unión no ocupados. Generalmente, un porcentaje pequeño de los sitios de unión

disponibles está ocupado, de modo que  $[P]$  es prácticamente igual a la concentración total de los sitios de unión ( $n[Pt]$ ), por lo tanto, la ecuación de la fracción libre,  $f_L$ , queda:

$f_L = 1 / (1 + K_d n[P])$  De esta expresión se puede concluir que la unión del fármaco a proteínas será prácticamente constante e independiente de la concentración del fármaco. En el caso de que las concentraciones terapéuticas sean suficientemente altas como para ocupar la mayoría de los sitios de unión,  $f_L$  será dependiente de la concentración de fármaco.

Por consiguiente, los señalamientos de que un fármaco en particular se une en un grado determinado son válidos sólo dentro de un intervalo limitado de concentración. Cabe señalar que el grado de unión también está influenciado por estados fisiológicos y patológicos, de tal manera que disminuye en el nacimiento, embarazo y vejez (29, 30, 32).

Usualmente se considera a la unión del fármaco a proteínas como un depósito, que se vuelve significativo si la unión es muy alta, de tal forma que reduce la disponibilidad del fármaco hacia los tejidos. Es decir, la unión de un fármaco a proteínas plasmáticas limita su concentración en los tejidos y en su sitio de acción celular, porque sólo el fármaco libre está en equilibrio entre uno y otro lado de las membranas. La unión también limita la filtración glomerular del fármaco, dado que esta filtración no cambia de manera inmediata la concentración de la fracción libre en el plasma en el reservorio de la cantidad de fármaco unida al plasma. Sin embargo, la unión a proteínas plasmáticas no suele limitar la secreción tubular renal ni la biotransformación, porque tales procesos disminuyen la concentración del fármaco libre, lo cual va seguido inmediatamente de la disociación del complejo fármaco-proteína. Si un fármaco se metaboliza o se transporta rápidamente y su velocidad de eliminación o depuración calculada con base en la cantidad de fármaco libre excede al flujo del plasma por el órgano, la unión a proteínas puede considerarse un mecanismo de

transporte que aumenta la eliminación al llevar el fármaco a los sitios en que se elimina (29, 30)

Es así como la importancia de la unión a proteínas radica en varios aspectos:

- a) La excreción del fármaco puede retardarse por limitación de la filtración glomerular.
- b) La distribución en tejidos se modifica de manera importante.
- c) El grado de unión, a su vez, se modifica por diversos factores, fisiológicos (especie, edad, embarazo, grupo étnico, género, obesidad, estado nutricional), patológicos (daño renal, hepático, diabetes, quemaduras, fibrosis quística, enfermedad de tiroides), farmacológicos (desplazamiento por otro fármaco) y dispositivos *in vitro* (dispositivos para recibir la sangre, tapones para catéter).

### 2.2.1 Proteínas de unión (33-36).

El plasma humano contiene más de 60 proteínas, tres de las cuales están consideradas de importancia en la unión de fármacos, albúmina,  $\alpha$ -1-glicoproteína y lipoproteínas (33).

La albúmina con un peso molecular de 66 300 es una proteína de unión importante presente en plasma y fluido intersticial. Se une principalmente a fármacos ácidos (aniónicos) pero también a fármacos catiónicos. La concentración normal sérica es de 38-48 g/L y se sintetiza en el hígado. Para la albúmina humana se han descrito dos sitios de unión a fármacos que tienen alta afinidad. El sitio I, descrito inicialmente como sitio de unión de la warfarina, también es sitio de otros fármacos como las sulfonamidas, fenitoína, ácido valproico y fenil butazona. Al sitio de unión II se unen las penicilinas semisintéticas y el probenecid (35).

La  $\alpha$ -1- glicoproteína, (AAG, PM 41 000) se sintetiza y metaboliza en el hígado y tiene una vida media aproximada de 3 días. Es una glicoproteína ácida de fase aguda, ya que su concentración aumenta en situaciones de estrés, incluyendo enfermedades tales como el cáncer (36-38). Muchos de los fármacos básicos tales como propanolol y lidocaína, y varios fármacos neutros se unen significativamente a esta proteína y/o a lipoproteínas, además de la albúmina. Generalmente, un fármaco que se une a la albúmina y a la AAG, tiene una afinidad mas alta para la AAG que para la albúmina. Debido a que la concentración de AAG es menor que la de albúmina, se dice que la AAG es una proteína de baja capacidad y alta afinidad.

Las lipoproteínas son un grupo heterogéneo de proteínas que se clasifican en cinco grupos: quilomicrones de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL), de densidad intermedia (IDL) y de alta densidad (HDL). Los fármacos lipofílicos, neutros y básicos, se unen comúnmente a estas lipoproteínas, este tipo de unión es más una disolución de los fármacos en la fase lipídica de las lipoproteínas que una unión verdadera.

Las concentraciones de estas proteínas plasmáticas se ven alteradas por diversos factores, algunos de ellos se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2 Condiciones asociadas con concentraciones alteradas de proteínas en plasma (37).

	Disminuye	Aumenta
Albúmina	Edad (neonatos, vejez) Pacientes quemados Cirrosis, enteropatías, desnutrición, síndrome nefrótico, embarazo,	Tumores benignos, neurosis, paranoia, psicosis, esquizofrenia

	insuficiencia renal, cirugía	
$\alpha$ -1- glicoproteína (AAG)	Edad (neonatos), cirrosis severa, síndrome nefrótico, anticonceptivos orales, embarazo	Edad (vejez) cáncer, infecciones, estados inflamatorios, obesidad, insuficiencia renal, artritis reumatoide, estrés, cirugía
Lipoproteína	Hipertiroidismo, desnutrición	Alcoholismo, hipotiroidismo, enfermedades obstructivas del hígado.

2.2.2. Métodos para la determinación de la unión fármaco-proteína (35).

La unión de fármacos a proteínas plasmáticas generalmente se ha estudiado *in vitro* mediante técnicas como son la diálisis al equilibrio, la ultracentrifugación, la ultrafiltración y la microdiálisis.

2.2.2.1. Diálisis al equilibrio (35, 36)

Es uno de los métodos más empleados y consiste en una celda de diálisis, con dos compartimentos separados por una membrana de diálisis semipermeable, en cada compartimento se coloca en uno el plasma y en el otro una solución amortiguadora de pH 7.4. El sistema así dispuesto se incuba a 37° hasta que se alcanza el equilibrio. De tal forma que al equilibrio el compartimento que contiene el plasma contiene el fármaco unido (FP) además de fármaco libre (F), mientras que en el otro compartimento con la solución amortiguadora sólo contiene fármaco libre (F). La fracción no unida se determina por la relación de la concentración de fármaco del lado de la solución amortiguadora (F) dividida

por la concentración total de fármaco (F + FP) en el sitio que contiene el plasma con el fármaco:

$$\% \text{ Fármaco unido} = \left[ \frac{[F]}{[F] + [FP]} \right] * 100$$

En los resultados influyen las propiedades del fármaco (lipofílicos o hidrofílicos o si son ácidos, bases o neutros), proteínas (contenido y concentración), volumen de los compartimentos, concentración y pH de la solución amortiguadora y su composición iónica, así como también el espesor y características fisicoquímicas de la membrana.

Las ventajas de esta técnica son que la temperatura se puede controlar y que los distintos aparatos dializadores se encuentran disponibles, además de que algunos permiten evaluar hasta 20 muestras simultáneamente. Las desventajas incluyen la adsorción a la membrana o paredes de la celda; el requerimiento poco conveniente en algunos casos de tiempos largos para alcanzar el equilibrio y la inestabilidad de los fármacos.

### 2.2.2.2. Ultrafiltración (36)

Fue introducida al mismo tiempo que la diálisis al equilibrio, pero su aplicación rutinaria fue factible hasta hace poco debido al mejoramiento de las membranas y equipo. La separación de las proteínas y el fármaco unido en solución se lleva a cabo usando una membrana adecuada que retiene las proteínas con ayuda de centrifugación. La principal ventaja de la ultrafiltración es la rapidez (aproximadamente 15 minutos) que es un factor muy importante en cuestiones de monitoreo clínico y para fármacos inestables. Al igual que la diálisis al equilibrio, las propiedades de la membrana y el volumen con el que se trabaja son importantes. La adsorción de fármacos en la membrana es problemática a bajas concentraciones, especialmente para los fármacos lipofílicos. En la ultrafiltración, las moléculas pequeñas por lo regular pasan libremente a través de la membrana, por lo que su

concentración debe ser la misma en ambos lados de la membrana durante el proceso e igual que en la solución original. De esta manera, se producen cambios mínimos en el microambiente (pH, fuerza iónica) durante la filtración.

### 2.2.2.3. Ultracentrifugación (36)

Este método está basado en la sedimentación diferencial de solutos en base a su masa molecular. Se emplean altas velocidades (>100 000 rpm) durante periodos prolongados de tiempo (24 h). Al no existir membrana alguna, los problemas de adsorción de fármacos lipofílicos se evita, aunque se han observado casos de adsorción a los tubos de la centrifuga. La desventaja de esta técnica es el alto costo del equipo de centrifugación, los largos periodos de tiempo requeridos, la posibilidad de no alcanzar el equilibrio y la cosedimentación de fármaco libre y unido a proteínas (especialmente con fármacos de alto peso molecular).

### 2.2.2.4. Microdiálisis (36)

Este método permite la determinación *in vivo* de la concentración libre de fármaco en plasma, tejidos y otros fluidos biológicos, como el fluido cerebroespinal.

Mediante un procedimiento quirúrgico se implanta una sonda con una membrana de diálisis en un vaso, en un espacio tisular o en un espacio que contenga un fluido. A través de la sonda se bombea una solución amortiguadora a una velocidad de flujo baja y el fármaco no unido difundirá en la sonda, a través de la membrana, como consecuencia del gradiente de concentración. Las moléculas pequeñas en la muestra, tales como el fármaco libre, difunden a través de la fibra (membrana) y se transportan a los viales de colección para su análisis. Las moléculas grandes como las proteínas y los fármacos unidos son excluidos por

la membrana de diálisis. El dializado puede ser analizado por técnicas estándar. Para determinar la concentración de fármaco unido ( $F_u$ ) se recogen muestras de plasma que nos informarán sobre la concentración total ( $F_t$ ), con lo que podremos calcular  $F_u$  por diferencia de  $F_t$  y  $F_l$ . ( $F_u = F_t - F_l$ ).

La recuperación relativa es el valor promedio de la cuantificación de la concentración del fármaco antes y después del experimento y depende de la velocidad de flujo de la perfusión, de la característica de difusión del analito y de las propiedades y dimensiones de la membrana de diálisis. La técnica se puede usar para la determinación *in vitro* e *in vivo* de la unión a proteínas, debido a que se puede implantar intravenosamente bajo condiciones fisiológicas.

### 2.3 FARMACOCINÉTICA (40-43)

El descubrimiento de nuevos fármacos, la selección del mejor candidato y el desarrollo preclínico están sufriendo rápidos cambios, impulsadas en parte por los avances científicos en áreas como química combinatoria, biología celular y molecular y nuevas tecnologías “de punta”, pero también por las fuerzas económicas y de ruda competencia. Como resultado, la presión para acelerar el descubrimiento y desarrollo de los fármacos se ha incrementado, especialmente en la fase preclínica y durante las pruebas clínicas tempranas en humanos donde existe un claro cuello de botella. Muy a menudo, las decisiones del cambio en la estructura de los compuestos han sido más un proceso empírico que una búsqueda científica. Este proceso de decisiones en la actualidad está siendo más mecanístico y predictivo de lo que era antes, lo cual provee mejores agentes terapéuticos con menores riesgos.

En 1992, se publicó que los conceptos fundamentales que apuntalan la aplicación de los métodos clínicos farmacológicos en el proceso del desarrollo del fármaco son el resultado de la aplicación coordinada de farmacocinética y farmacodinamia que proveen de información racional, en forma eficiente. La secuencia general del proceso regulatorio y científico involucrado en el desarrollo del fármaco requiere de muchas etapas (Fase I, II, III y IV) en las cuales se involucra desde el desarrollo e investigación preclínica hasta que sale al mercado.

La *fase I* se refiere a la primera introducción de un medicamento en seres humanos. Generalmente se estudian individuos normales para determinar a qué niveles de uso del medicamento se observa toxicidad. A continuación, se realizan otros estudios de dosis-respuesta en pacientes, para determinar la seguridad del medicamento y, en algunos casos, indicios iniciales de su efecto. En el caso de enfermedades del cáncer en esta primera fase se aplica a pacientes con algún cáncer específico.

Los estudios *fase II* consisten en ensayos clínicos controlados diseñados para demostrar la eficacia y la seguridad relativa. Generalmente, se llevan a cabo en un número limitado de pacientes estrechamente vigilados.

Los ensayos *fase III* se realizan después de establecerse una probabilidad razonable de eficacia del medicamento y tienen como objetivo obtener información adicional de su eficacia para aplicaciones específicas y una definición más precisa de los efectos adversos asociados al medicamento. Esta fase incluye estudios controlados y no controlados.

Los ensayos de la *fase IV* se realizan después de que el organismo nacional de registro de medicamentos haya aprobado un medicamento para su distribución o comercialización.

Estos ensayos pueden incluir investigación destinada a explorar un efecto farmacológico específico, a establecer la frecuencia de reacciones adversas o a determinar los efectos de la administración a largo plazo de un medicamento. Los ensayos de la fase IV pueden también estar diseñados para evaluar un medicamento en una población que no se ha estudiado adecuadamente en las fases de precomercialización (como los niños o los ancianos) o para establecer una nueva indicación clínica para un medicamento. Este tipo de investigación debe distinguirse de la que se realiza con fines de comercialización, de los estudios para la promoción de las ventas y de la vigilancia epidemiológica rutinaria para detectar reacciones adversas a los medicamentos; la diferencia es que estas últimas categorías por regla general no necesitan ser evaluadas por comités de ética.

Las pruebas preclínicas se dividen en dos tipos de estudios: farmacológicas y toxicológicas, que al integrarlos proveen información sobre los efectos del fármaco en varias especies animales.

### 2.3.1 Estudios farmacológicos

En éstos se pueden observar efectos adversos, por lo que es posible influir en el desarrollo de los estudios de toxicidad (40,41).

Cernimiento farmacológico. Éste involucra estudios *in vivo* e *in vitro* para determinar y caracterizar al compuesto con actividad farmacológica

**Farmacodinamia.** Una vez conocida la estructura química del nuevo compuesto, se inicia un complicado y completo estudio cualitativo y cuantitativo del perfil farmacológico del fármaco. Estos estudios proveen información sobre la acción del fármaco sobre varios receptores o sistemas fisiológicos en animales. Estos estudios deben ser tan extensos para

determinar la relación dosis-respuesta, la duración del efecto y el mecanismo de acción del fármaco sobre diferentes sistemas fisiológicos, por ejemplo neurológico, cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, genitourinario, endocrino, antiinflamatorio, e inmunológico. Es función de la farmacodinamia investigar todos los efectos primarios y secundarios relacionados y no relacionados con el efecto terapéutico, la duración del efecto, la toxicidad con dosis altas de fármacos y los efectos relacionados con otros fármacos.

**Farmacocinéticas preclínica.** Generalmente, estos estudios se realizan en tres especies de animales y consisten en obtener concentraciones plasmáticas del fármaco en un intervalo de tiempo, para obtener parámetros como concentración plasmática máxima, área bajo la curva, vida media, volumen de distribución y depuración del fármaco. 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 velocidad de absorción, de distribución, de metabolismo y de excreción. La metodología analítica empleada para obtener estos datos generalmente incluye: absorción uv, fluorescencia, cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de gases, radioinmunoanálisis y análisis por espectroscopía de masas del fármaco inalterado y/o metabolitos en tejidos o fluidos biológicos.

- a) **Estudios de absorción.** En esta etapa se determina la concentración del fármaco en sangre u orina después de una administración oral, lo que indica la cantidad y velocidad de absorción del fármaco. Los parámetros farmacocinéticos que se

determinan incluyen el área bajo la curva (ABC), la concentración máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima ( $t_{max}$ ). **La biodisponibilidad**, fracción de fármaco que llega a la circulación sistémica, depende de la cantidad absorbida, pero también influyen en la biodisponibilidad otros factores como es la cantidad de fármaco metabolizado por el hígado antes de llegar a la circulación general.

- b) **Estudios de distribución.** Provee la 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 de fármaco y/o sus metabolitos en los tejidos seleccionados. **El volumen de distribución** representa otro parámetro farmacocinético importante en el conocimiento de la distribución del fármaco, es el que relaciona la cantidad total de fármaco en el cuerpo y la concentración plasmática de éste. Es un volumen imaginario que nos determina la fuerza de unión relativa del fármaco a los componentes tisulares comparada con las proteínas plasmáticas.
- c) **Estudios de metabolismo.** La estimación y cuantificación de la biotransformación del fármaco en un organismo vivo son esenciales para un completo conocimiento de la eficacia y toxicidad, puesto que diferentes especies de animales pueden sufrir mayor o menor toxicidad debido al metabolismo. **El aclaramiento o depuración (Cl)** representa la habilidad del organismo para eliminar el fármaco. El concepto permite cuantificar la capacidad de un órgano o conjunto de órganos para eliminar un fármaco y se define como el volumen de sangre o plasma que es depurado de una sustancia por unidad de tiempo mediante procesos de eliminación. El parámetro de

eliminación puede determinarse para órganos individuales y la suma de todos los parámetros de aclaración serán el aclaramiento total del sistema. En general una intoxicación potencial disminuye cuando se considera una excreción rápida y completa del fármaco.

### 2.3.1.2.1. Farmacocinética compartimental (42).

Diseño de estudios de farmacocinética y la interpretación de los datos.

La interpretación de los datos de farmacocinética se ve como un esfuerzo para deducir que le está pasando al fármaco en el organismo, después de una administración basada en el curso del tiempo y su exposición a fluidos biológicos como el plasma o la sangre. La disponibilidad de los datos obtenidos de los estudios farmacocinéticos *in vivo*, depende de la validez del diseño y ejecución del estudio, la colección de las muestras, su manejo y análisis. La selección del método de análisis de los datos es igual de importante para el entendimiento de las características farmacocinéticas de un fármaco.

Administración intravenosa del fármaco.

Los perfiles de exposición del fármaco al plasma después de una administración intravenosa proveen información importante de las propiedades farmacocinéticas

- a) Depuración sistémica (Cl) y volumen de distribución (Vd) al estado estacionario. Un estimado de la depuración sistémica de un fármaco y el volumen de distribución se obtienen a partir de los perfiles tiempo-concentración después de una inyección intravenosa, donde se obtiene una biodisponibilidad completa.
- b) Vida media de eliminación del fármaco ( $t_{1/2}$ ). Después de una inyección intravenosa la vida media está gobernada por el proceso de disposición (distribución y eliminación) del fármaco en el organismo. En la administración

oral la vida media está influenciada por el proceso de absorción (entrada) al organismo.

- c) Niveles de exposición de referencia para estimados de biodisponibilidad. El área bajo la curva de perfiles de concentración plasmática o sanguínea contra tiempo (ABC) después de una inyección intravenosa se usa generalmente como referencia de estimados de biodisponibilidad del fármaco.

### Consideraciones

- a) Inyección bolo, contra infusión corta. En general la inyección intravenosa (o intraarterial) de un fármaco es una administración bolo cuando se realiza en unos pocos segundos, a menos que se indique otra cosa. Si la inyección toma más de un minuto se considera infusión corta.
- b) Solución para dosificación. En general solución salina estéril isotónica a pH 6.8 es lo más recomendable como vehículo de inyección intravenosa. Aunque se prefiere un vehículo acuoso generalmente, debido a la limitada solubilidad en agua de algunos compuestos o su inestabilidad química en esta, puede ser conveniente el uso de varios cosolventes orgánicos. Vehículos como dimetil sulfóxido (DMSO), etanol, polietilenglicol (PEG) 400 y aceite vegetal o agentes solubilizantes como ciclodextrinas se usan normalmente con agua estéril para aumentar la solubilidad del compuesto en un vehículo dosificador, especialmente en el desarrollo del fármaco. En este caso, se deben considerar los efectos de los vehículos orgánicos o agentes solubilizantes en perfiles farmacocinéticos de un compuesto (tales como inhibición del metabolismo y hemólisis de la sangre) y en las respuestas farmacológicas y toxicológicas. En

general, la cantidad de cosolvente orgánico no debe exceder del 20% del volumen total de inyección. El pH del vehículo dosificante puede ser ligeramente ácido o básico para optimizar la solubilidad acuosa. Se deben tomar precauciones para ajustar el pH al aumentar la solubilidad acuosa de un compuesto debido a que puede afectar la inestabilidad química. La viscosidad del vehículo dosificante debe mantenerse de tal manera que permita una fácil inyección y fluidez óptima.

- c) Volumen dosificante. En el caso de una inyección bolo, es importante tener un volumen dosificante aceptable, si el volumen es demasiado grande puede tomarse mucho tiempo para inyectar, si es muy pequeño se puede tener problemas en la preparación y administración de la solución. Los volúmenes máximos para una inyección bolo son aproximadamente de 1 mL/kg en peso para animales de laboratorio, tales como conejos, monos y perros; para animales pequeños, como ratones y ratas, se pueden usar de 0.3 a 0.5 mL respectivamente.

### Interpretación de los datos

Básicamente existen dos diferentes aproximaciones, compartamental y no compartamental, para analizar los perfiles plasmáticos de concentración contra tiempo, y estimar los parámetros farmacocinéticos. La aproximación no compartamental es la que se usa comúnmente para interpretación sencilla de los datos.

### Aproximación compartamental

En este modelaje se ve al cuerpo como un ser compuesto de un número de compartimentos diferentes farmacocinéticamente. Cada compartimento se piensa que es un espacio

imaginario en el cuerpo representando una combinación de varios tejidos y órganos, entre los que las concentraciones de un fármaco llegan a un rápido equilibrio. La composición anatómica del compartimento se desconoce y en la mayoría de los casos casi no tiene valor. El número de compartimentos en un modelo se determina empíricamente dependiendo de los perfiles plasmáticos de concentración tiempo.

El modelo compartimental ayuda a:

- a) Proveer un entendimiento conceptual de la conducta de distribución de un fármaco entre el plasma (o sangre) y otros tejidos u órganos.
- b) Explicar empíricamente los cambios en procesos fisiológicos tales como, transporte de membrana o metabolismo sin realizar investigaciones mecanísticas.
- c) Estimar varios parámetros farmacocinéticos como constantes de velocidad, depuración y volúmenes aparentes de distribución.

La aproximación compartimental requiere de análisis matemáticos de datos, generalmente métodos de regresión no lineal, para estimar los parámetros en los modelos se ajusta el modelo al perfil de concentración-tiempo. Comercialmente están disponibles varios programas computacionales de regresión no lineal (Ejemplo WINNONLIN). El primer paso en la aproximación compartimental con el análisis de los datos es determinar el número de compartimentos requeridos para el modelo.

- 1) Modelo monocompartimental contra multicompartmental. Cuando se administran las moléculas de un fármaco, al principio el fármaco se localiza en el sitio de administración antes de la distribución en las diferentes regiones del cuerpo. Por ejemplo, en un inyección intravenosa la distribución de las

moléculas del fármaco a partir del sitio de inyección a sangre venosa ocurre instantáneamente y el cuerpo se comporta como un compartimento homogéneo farmacocinéticamente y presenta una declinación monofásica en una escala semilogarítmica y se puede describir como un modelo de un compartimento.

Cuando la distribución del fármaco en el plasma a ciertos tejidos u órganos es sustancialmente más lenta que el resto del cuerpo, puede tener modelo multicompartimental, por ejemplo, un compartimento central y uno o más compartimentos periféricos (ó tejidos). En general, se espera que la distribución de un fármaco del plasma a los órganos altamente perfundidos o tejidos tales como hígado, riñones, o bazo sea más rápida que a los órganos con suplemento sanguíneo limitado tales como grasa, músculo, piel o huesos. El compartimento central representa la circulación sistémica y aquellos órganos o tejidos altamente perfundidos. En un sistema multicompartimental el perfil concentración plasmática del fármaco contra tiempo exhibe una declinación multifásica en escala semilogarítmica. La distribución intercompartimental de un fármaco puede ser vista conceptualmente como una expresión farmacocinética del transporte del fármaco ocurriendo entre tejidos y órganos vía vasos sanguíneos y/o membranas, y se asume que generalmente sigue una cinética de primer orden.

Farmacocinética lineal ó de primer orden. Un proceso de primer orden es aquél en el que la velocidad de cambio de la concentración del fármaco en el fluido biológico es directamente proporcional a sus concentraciones. Por ejemplo, con condición de cinética de primer orden, la velocidad de cambio de la concentración del fármaco en el plasma se describe como una función de la concentración,  $C_p(t)$ , descrita por la ecuación siguiente:

$$dC_p(t) / dt = k \times C_p(t)$$

Donde  $k$  es una constante de velocidad de primer orden.

Modelo de un compartimento (42).

Es el modelo más simple. El cuerpo se observa como un compartimento homogéneo y sencillo cinéticamente. La descripción esquemática está descrita por una inyección intravenosa (bolo) y eliminación de primer orden:

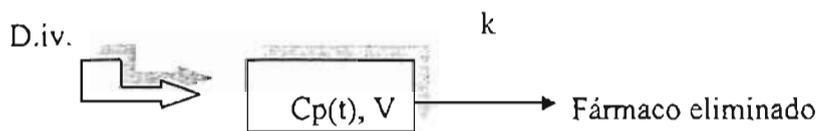


Figura 1. Disposición de un fármaco en plasma con modelo de un compartimento

La cantidad de fármaco (D) presente en el cuerpo a cualquier tiempo  $t$ ,  $A(t)$ , en este modelo está descrita por:

$A(t) = C_p(t) \times V$  donde  $C_p$  es concentración de fármaco en plasma y  $V$  es volumen de distribución aparente.

La ecuación que describe la concentración del fármaco en el plasma al tiempo  $t$  en una inyección intravenosa es

$$C_p(t) = \frac{D_{iv}}{V} \times e^{-kt}$$

$\Downarrow$   
 $C_p(0)$

$C_p(0)$ , concentración del fármaco imaginaria al tiempo cero.  
 $k$ , constante de velocidad de eliminación de 1er orden.

La ecuación anterior se puede ajustar para obtener datos de tiempo y concentración del fármaco en plasma para obtener estimados de  $V$  y  $k$ .

La depuración sistémica (Cl<sub>s</sub>) y vida media del fármaco ( $t_{1/2}$ ) se calculan por las siguientes ecuaciones:

$$Cl_s = k \times V$$

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

En el modelo abierto de un compartimento, las concentraciones del fármaco en diferentes tejidos u órganos están en equilibrio instantáneo con respecto a los que se encuentran en plasma en la circulación sistémica, estableciendo las constantes de velocidades de concentración entre el plasma y los diferentes tejidos. Cuando esto ocurre la velocidad de cambio de concentración en el plasma puede reflejar directamente el cambio de la concentración del fármaco en los tejidos con diferencias en concentraciones correspondientes a la acumulación entre plasma y tejidos, Figura 2.

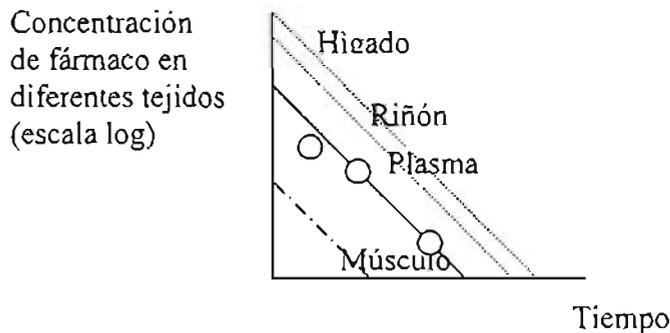


Figura 2. Concentración de un fármaco en plasma con los diferentes cambios en los distintos tejidos.

En la figura anterior se analizó la concentración de fármaco en plasma. Por lo tanto, en un modelo de un compartimento se tienen las relaciones de declinación monofásica del perfil de concentración-tiempo después de una inyección intravenosa en una escala semilogarítmica y una ecuación monoexponencial.

Modelo abierto de dos compartimentos (42).

El número de compartimentos requeridos para describir los perfiles de disposición del fármaco pueden variar, dependiendo de que tan seguido se colecten las muestras y en cuanto tiempo después de la administración el fármaco se distribuye en todo el cuerpo. Existen tres diferentes tipos de modelo de dos compartimentos y 7 modelos de tres compartimentos, dependiendo de que compartimento es responsable de la eliminación del fármaco. En ausencia de evidencia experimental se asume que el fármaco se elimina exclusivamente del compartimento central, esto se debe a que la mayoría de los fármacos se eliminan por el hígado (metabolismo y excreción biliar) y el riñón (excreción urinaria) ambos están bien perfundidos por la sangre y tienen acceso al fármaco en el plasma. El esquema para el modelo de dos compartimentos más usado es:

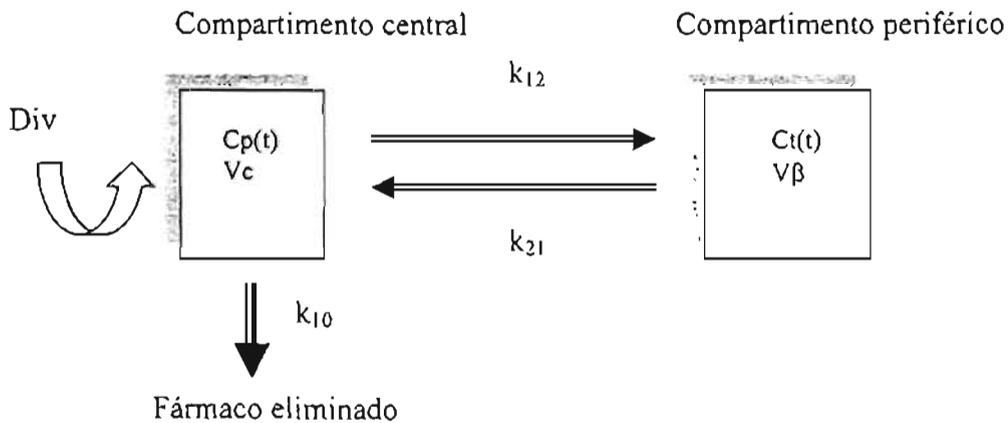


Figura 3. Disposición de un fármaco con modelo de dos compartimentos.

En el modelo de dos compartimentos el fármaco describe una curva bifásica en escala semilogarítmica.

$$C_p(t) = A \times e^{-\alpha t} + B \times e^{-\beta t}$$

Los estimados A, B, “ $\alpha$ ” y “ $\beta$ ” se pueden obtener de los interceptos y pendientes de la gráfica concentración-tiempo. Estos parámetros nos servirán para calcular:

$C_p(0) = A + B$ , concentración plasmática.

$V_c = Div / C_p(0) = Div / (A + B)$ , volumen de distribución del compartimento central.

$k_{21} = (A \times \beta + B \times \alpha) / (A + B)$ , microconstante del compartimento periférico al compartimento central.

$k_{10} = \alpha \times \beta / k_{21}$ , microconstante del compartimento central.

$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10}$ , microconstante del compartimento central al compartimento periférico.

$Cl = k_{10} \times V_c$ , depuración.       $V\beta = Cl / \beta$ , volumen de distribución del compartimento periférico.

$t_{1/2} = (0.693 \times V\beta) / Cl$ , vida media

Cuando la distribución del fármaco sigue un modelo de dos compartimentos, el perfil de concentración plasmática del fármaco-tiempo después de una inyección intravenosa mostrará una declinación bifásica en escala semilogarítmica. La primera fase es una declinación rápida y es la fase de distribución o fase “ $\alpha$ ”, y la segunda fase es la fase de eliminación o fase “ $\beta$ ”.

### 2.3.1.2.2. Infusión intravenosa (31).

Es un método directo bajo el cual el fármaco se administra sistemáticamente dentro del cuerpo. Las soluciones intravenosas de fármaco pueden darse como dosis bolo o infundirlas lentamente a una velocidad constante o de orden cero. La ventaja principal de administrarla como infusión intravenosa es el control preciso de las concentraciones plasmáticas o sanguíneas de fármaco a las necesidades individuales del paciente.

Para los fármacos con una ventana terapéutica angosta, la infusión intravenosa mantiene concentraciones plasmáticas de fármaco constantes, eliminando las fluctuaciones entre la concentración máxima y la mínima en la etapa de la meseta. Además la infusión intravenosa por ejemplo de antibióticos se puede administrar con fluidos intravenosos que contienen electrolitos y nutrientes y se puede mantener o suspender según las necesidades.

La curva de concentración plasmática contra tiempo que se obtiene después de una infusión intravenosa es la que se muestra en la figura siguiente:

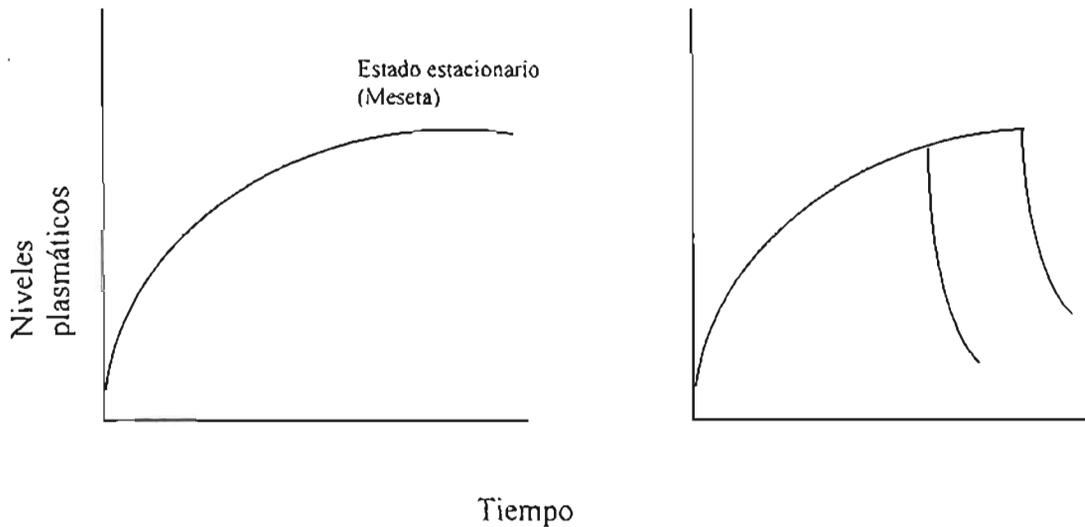


Figura 4. Curva de niveles plasmáticos contra tiempo con infusión intravenosa constante.

El fármaco no está presente al tiempo cero y conforme pasa el tiempo, gradualmente llega a una concentración constante (meseta o estado estacionario). En el estado estacionario, la velocidad con que abandona el cuerpo es igual a la velocidad con la que entra (velocidad de infusión), entonces la velocidad de cambio de las concentraciones del fármaco es:

$$dC_p/dt = 0 \quad y$$

Velocidad de entrada del fármaco = velocidad de salida del fármaco  
(velocidad de infusión) (velocidad de eliminación)

Basados en este balance de masa se origina la ecuación farmacocinética para la infusión intravenosa que dependerá del modelo que se trate, de uno o dos compartimentos.

En el modelo de un compartimento, la farmacocinética del fármaco será que entra con una cinética de cero orden y se elimina con cinética de primer orden, El cambio de la cantidad de fármaco en el cuerpo a cualquier tiempo durante la infusión será:

$$dD/dt = R - kD$$

D, cantidad de fármaco en el cuerpo

R, velocidad de infusión (orden cero)

k, constante de velocidad de eliminación (primer orden).

Integrando la ecuación anterior y sustituyendo  $D = C_p V_d$  se tiene:

$$C_p = (R/(V_d k)) (1 - e^{-kt})$$

$C_p$ , concentración de fármaco en plasma

$V_d$ , volumen de distribución.

Esta ecuación es la que se observa en la figura 4. La eliminación del fármaco puede suceder cuando ya alcanzó la meseta o antes de llegar a esta y sigue una cinética de primer orden, cuya pendiente será igual a  $-k/2.3$ .

Desde un punto de vista matemático todas las infusiones se detienen antes de llegar al verdadero estado estacionario, y este se alcanza únicamente después de un tiempo infinito.

Para aspectos clínicos, las concentraciones de fármaco en plasma antes de, pero cercanos al estado estacionario se considera ya del estado estacionario, ( $C_{ss}$ ).

En el tiempo infinito,  $t = \infty$  y  $e^{-kt}$  se aproxima a cero y se tiene la siguiente ecuación:

$$C_p = (R/(Vdk)) (1 - e^{-\infty})$$

$$C_{ss} = R/Vdk$$

$$C_{ss} = R/Vdk = RCl.$$

Cl, depuración del fármaco.

La ecuación anterior nos indica que las concentraciones en el estado estacionario son dependientes del volumen de distribución, de la constante de velocidad de eliminación y de la velocidad de infusión, pero inversamente proporcional a la depuración.

El tiempo para alcanzar el estado estacionario es dependiente de la constante de velocidad de eliminación del fármaco para un volumen constante de distribución y por consiguiente, de la vida media. Para un proceso de orden cero, si la velocidad de entrada es más grande que la velocidad de eliminación, las concentraciones de fármaco en plasma incrementarán en el estado estacionario.

Muchos fármacos al administrarlos siguen una cinética de dos compartimentos y, por lo tanto, se requiere una distribución y equilibrio del fármaco antes de alcanzar niveles sanguíneos estables. El tiempo para alcanzar los niveles en el estado estacionario dependerá solamente de la vida media al igual que en el modelo de un compartimento. La ecuación que describe la concentración de fármaco plasmática en función del tiempo es:

$$C_p = R/Vdk [1 - \{(k - b)/(a - b)\}e^{-at} - \{(a - k)/(a - b)\}e^{-bt}]$$

a y b son constantes de velocidad híbridas

$R$ , velocidad de infusión

Al estado estacionario ( $t = \infty$ ), la ecuación nos queda:

$$C_{ss} = R/Vdk$$

Rearreglando esta ecuación se puede calcular la velocidad de infusión que se requiere para alcanzar concentraciones del fármaco en el estado estacionario:

$$R = C_{ss}Vdk.$$

### 2.3.1.2.3. Farmacocinética no compartimental (31)

El tratamiento compartimental de los datos experimentales es inherente al estudio cinético de los fármacos, sin embargo en los últimos años, este estudio se lleva a cabo con mucha frecuencia, mediante un tratamiento no compartimental, también conocido como modelo-independiente.

Este tipo de estudios se realiza debido a lo complicado que resulta el tratamiento compartimental, al reducir la representación del organismo a unos pocos compartimentos, lo que conlleva en muchos casos que las microconstantes de los mismos sólo sean meros artefactos matemáticos. La razón principal reside en que en farmacocinética clínica no es posible, en la mayoría de los casos, disponer de un número suficiente de puntos experimentales para poder realizar un estudio farmacocinética compartimental correcto y, por otro lado, el principal objetivo es establecer un régimen de dosificación adecuado, lo que se consigue conociendo un número relativamente limitado de parámetros farmacocinéticos, cuya obtención es factible con el tratamiento no compartimental.

La farmacocinética no compartimental puede definirse como el tratamiento de los datos experimentales que permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de

ajustarlos a un modelo determinado. Se basa simplemente en la disposición del fármaco en la fase terminal de la curva de niveles plasmáticos, sin necesidad de establecer ningún tipo de interrelación entre el fármaco y el sustrato biológico sobre el que se encuentra. Las tomas de muestra en esta fase deben prolongarse mas allá de un período de tiempo equivalente a tres vidas medias del fármaco, lo que obliga a disponer de esta información previa acerca de éste parámetro. A pesar de que el proceso de eliminación de los fármacos generalmente es de primer orden deberá comprobarse esta aseveración, mediante regresión lineal simple de los logaritmos de los niveles plasmáticos frente a tiempo, en la fase terminal de la curva de niveles plasmáticos.

Parámetros farmacocinéticos.

Tras la administración intravenosa de un fármaco los parámetros farmacocinéticos que pueden estimarse son:

$k_{el}$  o  $\beta$ , constante de velocidad de eliminación.  $ABC_{0-\infty}$ , área bajo la curva de cero a infinito.  $CL_p$ , depuración plasmática. TMR, tiempo medio de residencia y  $V_d$ , volumen de distribución.

La eliminación del fármaco en la mayoría de los casos es un proceso cinético de primer orden, por consiguiente, mediante regresión lineal simple de los logaritmos de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo en la fase de eliminación, se supone que corresponde a un proceso monoexponencial, independientemente del modelo farmacocinética a que pudiera ajustarse el fármaco. La constante de eliminación del fármaco está dada por la siguiente expresión:

$$\ln C = -k_{el} \times t + \ln C_0 \quad \text{ó} \quad \ln C = -\beta \times t + \ln C_0.$$

La vida media biológica,  $t_{1/2}$ , estará dada por la expresión:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{el} \quad \text{ó} \quad t_{1/2} = \ln 2 / \beta.$$

El área bajo la curva (ABC) por el método trapezoidal en una administración intravenosa o extravasal está dada por las expresiones siguientes:

$$ABC_{0-t} = \sum_{0-t} (C_{n-1} + C_n) / 2 (t_n - t_{n-1})$$

$$ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + C_t / k_{el}.$$

El método de los trapezoides para estimar el área es un procedimiento, donde se considera el área bajo la curva del intervalo correspondiente a dos tomas de muestra consecutivas como la de un trapecio (producto de la semisuma de la base por la altura). El área total de la curva desde tiempo cero a tiempo t, equivaldrá a la suma de las áreas de todos los trapecios considerados en este periodo de tiempo:

$$ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + ABC_{t-\infty}$$

Tiempo Medio de Residencia (TMR)

Es el tiempo, que en promedio, permanece en forma inalterada una molécula de fármaco en el organismo durante su tránsito por él.

Este concepto se basa en la aplicación de momentos estadísticos a la farmacocinética. Esta teoría asume que el movimiento individual de las moléculas del fármaco a través del organismo viene gobernada por el azar, de forma que la probabilidad, es muy pequeña para un tiempo de residencia prácticamente cero, así como para un tiempo de residencia muy prolongado, siendo los tiempos de permanencia intermedios entre estos dos valores extremos mucho más probables. Se considera que el curso de la concentración plasmática de un fármaco en el organismo puede expresarse mediante una curva de distribución

normal. Así, el tiempo de residencia de un fármaco en el organismo puede concebirse como una distribución de frecuencias con una media (TMR) y una varianza (TVR).

Tras la administración intravenosa de una determinada dosis de un fármaco, un gran número de sus moléculas se distribuye a través del organismo. Unas moléculas residen en el organismo durante un corto tiempo, mientras que otras permanecen en él más tiempo, lo que ocurra uno u otro caso depende del azar. Por ello, si se considera la eliminación de un fármaco desde este punto de vista, dicho proceso será estocástico. El término tiempo medio de residencia (TMR) corresponde al tiempo que en promedio, residen en el organismo las moléculas del fármaco (o tardan en abandonar el organismo). Puede considerarse como tiempo medio de tránsito o de permanencia, es un parámetro independiente del modelo cinético al que puede ajustarse el fármaco.

El tiempo medio de residencia de las moléculas de un fármaco será la suma de los tiempos de permanencia de cada molécula dividida entre la dosis D:

$$TMR = \sum_{i=1}^m t_i \times f_i / \sum_{i=1}^m f_i$$

$t_i$ , valores de tiempo de permanencia y  $f_i$ , el número de moléculas correspondientes a cada uno de ellos (frecuencia).

Considerando los miligramos de fármaco y la expresión en términos de velocidad se tiene:

$$TMR = \int_0^{\infty} t \times C \times dt / \int_0^{\infty} C \times dt$$

Donde el valor  $\int_0^{\infty} t \times C \times dt$  se conoce con las siglas de  $ABCM_{0-\infty}$  y  $\int_0^{\infty} C \times dt$  es el  $ABC_{0-\infty}$ , por ello la ecuación anterior se puede escribir como:

$$TMR = ABCM_{0-\infty} / ABC_{0-\infty}$$

Para la determinación del valor de TMR se asume un modelo estocástico cuyas principales premisas son:

- a) Una vez administrado el fármaco, el tiempo medio de residencia de las moléculas en el organismo se basa en una distribución estadística de frecuencias.
- b) La eliminación del fármaco se realiza de acuerdo a un proceso de primer orden.

Se definen dos momentos estadísticas en farmacocinética:

A) Momento de orden cero. Equivale al valor del área bajo la curva de niveles plasmáticos frente al tiempo:

$$ABC_{0-\infty} = \int_0^{\infty} C \times dt$$

B) Momento de orden uno (ABCM), cuya expresión matemática es:

$$ABCM_{0-\infty} = \int_0^{\infty} t \times C \times dt.$$

### 2.3.2 ESTUDIOS DE TOXICIDAD.

Dependiendo de la naturaleza del fármaco, su uso y los resultados de los estudios farmacológicos, se determina el programa de estudios toxicológicos que pueden incluir todos o algunos de los siguientes conceptos:

- De toxicidad aguda
- De toxicidad subaguda o subcrónica
- De toxicidad crónica
- De carcinogénica
- De toxicidad especial
- De toxicidad reproductiva
- De genotoxicidad
- De toxicocinética

### 2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de capacidad del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Los métodos analíticos que presentan más dificultad para validarse son los que van a ser aplicados en fluidos biológicos, debido principalmente a que las variables son más difíciles de controlar ya que las concentraciones en que se encuentran los fármacos son muy pequeñas (del orden de  $\mu\text{g/mL}$  y  $\text{ng/mL}$ ). Los parámetros a determinar para la validación son: linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, especificidad, concentración mínima cuantificable, concentración mínima detectable y estabilidad (43, 44, 45)

### 2.5 CASIOPEÍNAS

La introducción a la clínica oncológica de compuestos inorgánicos como el cis-platino ( $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ , complejo con platino hidrosoluble, inorgánico y divalente) cuya capacidad anticancerígena ha sido demostrada en pacientes con cáncer de vejiga, cabeza y cuello, cáncer ovárico avanzado y de endometrio, ha abierto un amplio campo de investigación dentro del diseño de moléculas bioinorgánicas con núcleos metálicos. Se empezaron a investigar moléculas que compartían aquellas características químico-estructurales a las que se les atribuye la actividad biológica parecida a la del cisplatino sobre las células cancerosas, pero que no producían la toxicidad renal, auditiva y sobre sistema nervioso central que acompaña la terapia con este fármaco.

La búsqueda de compuestos que demuestren mayor eficacia y seguridad en su aplicación terapéutica ha conducido al diseño, síntesis y posterior evaluación de una familia de compuestos de coordinación llamada Casiopeínas<sup>®</sup>, cuyo núcleo metálico es el cobre. (1-5). Se han establecido convenios de colaboración técnico-científica y de intercambio con el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de la Secretaría de Salud, para en un futuro llevar a cabo su aplicación clínica.

Durante el desarrollo de estas moléculas se tomaron en cuenta tres aspectos fundamentales: 1) la inclusión de un metal esencial en vez del platino, lo que disminuye su toxicidad, su estado de oxidación y su número de coordinación; 2) la formación de quelatos que favorecen la orientación "cis" alrededor del ión metálico y 3) la asociación de moléculas con capacidad quelante que le confiere diferentes niveles de hidrofobicidad, con sustituyentes periféricos que pueden modificar las propiedades de los compuestos. Estas características se reflejan en las propiedades de los complejos en términos de su solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de estos compuestos con el ácido desoxirribonucleico, propuesta como su mecanismo de acción (6,7).

Las casiopeínas sometidas al proceso de obtención de patente contienen cobre (II) como núcleo metálico, cuya principal ventaja con respecto al platino es su participación como cofactor enzimático en muchos procesos bioquímicos normales del organismo. Este metal forma quelatos con diiminas (bipiridinas o fenantrolinas sustituidas) y con aminoácidos o bien con donadores de oxígeno (acetilacetato o salicilaldehidato).

La fórmula general de las casiopeínas es  $[Cu (N-N)(N-O)H_2O] NO_3$ , ó  $[Cu (N-N) (O-O) H_2O] NO_3$ ; donde N-N es una diimina (ligante neutro) como la 1,10-fenantrolina o la 2,2'-

bipiridina, sustituidas por radicales fenilo, metilo o grupos nitro en diferentes posiciones - 4,7; -5,6; o -3,4,7,5, en el caso de las 1,10-fenantrolinas, o bien en las posiciones 4,4' en el caso de las bipiridinas; en tanto que el donador N-O puede ser cualquier aminoácido esencial y el donador O-O es un acetilacetato (acac) o un salicilaldehidato (salal), como ligantes aniónicos. Las diversas combinaciones entre los sustituyentes de las casiopeínas ha originado la síntesis y caracterización de alrededor de 100 compuestos.

### 2.5.1 Casiopeína III-ia (No. CAS 223930-33-4, $C_{17}H_{19}Cu N_2O_2 \cdot NO_3$ ).

La casiopeína III-ia, de fórmula química  $([Cu(4-4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)] NO_3)$ , y la casiopeína IIgly, de fórmula química  $[Cu(4,7-dimetil, 1, 10-fenantrolina)(glicina)H_2O]NO_3$ , se han sometido en una primera etapa a todos aquellos estudios químicos (electroquímicos, fisicoquímicos, cristalográficos, etc) (8,9) que definen las características y propiedades estructurales de las moléculas (10,11,16). Ambos compuestos han sido probados en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (4, 5, 6) mostrando poseer una importante actividad anticancerígena. De manera paralela, se estudió su mecanismo de acción que al parecer consiste en la inducción de apoptosis en las células cancerosas (15).

En una siguiente etapa dentro de la investigación, y tomando en cuenta que su diseño fue orientado hacia una futura aplicación dentro de la terapéutica oncológica, se iniciaron una serie de ensayos preclínicos empleando una batería de modelos experimentales en animales a fin de determinar su probable actividad biológica y, de ser el caso, determinar su eficacia y toxicidad (14, 15).

Siguiendo el protocolo de cernimiento y pruebas de evaluación de actividad anticancerígena, establecido por el Cancer Chemotherapeutic National Service Center,

perteneciente al National Cancer Institute (NCI), Bethesda, Maryland, E.U.A., se logró identificar a la Casiopeína IIIia y Casiopeína IIgly como agentes de interés potencial, cuyos estudios de su actividad biológica en los diferentes modelos establecidos para tal fin confirmaron su desarrollo a la fase preclínica.

La casiopeína IIIia, cuya estructura se muestra en la figura 2, presenta un ligante bidentado donador de oxígenos y un ligante bidentado donador de nitrógenos, con geometría cuadrado plano.

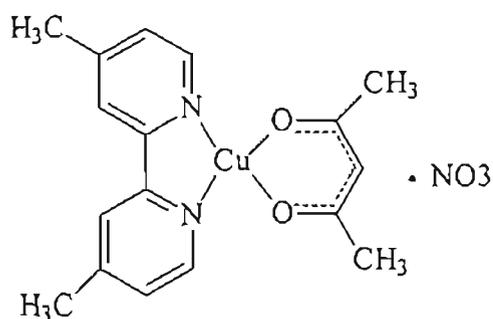


Figura 5. Estructura del compuesto de Casiopeína IIIia, No. CAS 223930-33-4

Este compuesto demostró actividad anticancerígena en modelos *in vitro*, al evaluar la inhibición del crecimiento de un cultivo celular empleando líneas tumorales humanas y murinas. En líneas humanas se evidenció la necesidad de utilizar concentraciones 500 veces menores que las necesarias para el cisplatino para inhibir el 50% del crecimiento celular en líneas de carcinoma cérvico-uterino humano (HeLa) y alrededor de 150 veces menos en células SiHa. Cuando se emplearon líneas murinas de carcinoma de pulmón de Lewis, línea celular altamente metastásica, no se encontró ninguna actividad, ni del cisplatino (4).

La evaluación *in vivo*, en líneas tumorales murinas transplantadas en cepas singénicas, mostró actividad anticancerígena sobre melanoma (B<sub>16</sub>), leucemia linfoide (L<sub>1210</sub>), sarcoma (S<sub>180</sub>) y carcinoma de pulmón de Lewis (LL), determinada en función del porcentaje de sobrevivida (%ILS, índice de sobrevivida). Los hallazgos mostraron, dependiendo de la dosis, la vía de administración y el esquema de tratamiento, remisiones totales y sobrevividas de hasta un 98% (6). En experimentos recientes, realizados sobre líneas tumorales humanas de cáncer de colon, de mama y cérvico-uterino, así como en una línea celular murina de leucemia linfoide (L<sub>1210</sub>) xenotransplantada en ratones desnudos, se ha observado un encapsulamiento del tumor en aquellos animales tratados con casiopeína IIIa, en tanto que el tumor se encuentra diseminado en los animales tratados con cisplatino, empleado éste como fármaco de referencia.

Los valores de dosis letal 50 de la Casiopeína IIIa, administrada por vía intraperitoneal, se determinaron en ratón cepa NIH, tanto en machos como hembras y en ratas Wistar, tanto en macho como hembras. Estos estudios están aún en proceso y los resultados hasta el momento se reportan en la Tabla 3. Para el cisplatino se conoce que la LD<sub>50</sub> en actividad antitumoral en ratones con plasmacitoma murino ADJ/PC6, por vía intraperitoneal, es de 11.6 mg/kg.

En rata Wistar (hembra en proceso de reproducción) se realizó un tratamiento de tumor mamario espontáneo determinando el tamaño y la localización del tumor por la técnica PET (Tomografía de Emisión de Positrones), con marcador para diagnóstico de <sup>18</sup>F-glucosa, que se asocia a tumores glicolíticos. De esta manera se diagnostica el tumor o tumores y se determina su volumen total. Se indicó tratamiento con Casiopeína IIIa, 3 dosis de 6 mg/kg por vía intravenosa y se observó una remisión total del tumor en un mes.

Tabla 3 Dosis letal media (DL50) de Casiopeína IIIa en ratón NIH y rata Wistar, vía intraperitoneal.

	DL <sub>50</sub> (mg/kg)
Ratón macho NIH	24.68
Ratón hembra NIH	32.33
Rata Wistar macho	14.36
Rata Wistar hembra	19.99

## 2.6 CISPLATINO

### 2.6.1 Panorama preclínico

El cisplatino (cis-diaminodichloroplatinol) es un complejo de coordinación propuesto por Rosenberg y col. (53) que posee actividad antibiótica. Sus estudios demostraron que el compuesto inhibía el crecimiento de *E. Coli* y destruía y transformaba a la bacteria en estructuras filamentosas muy largas, en vez de la forma normal de bastón. Estudios subsecuentes (21) establecieron su actividad antitumoral en animales experimentales (ratones ICR) con tumor tipo sarcoma 180. En 1972, el NCI (National Cancer Institute) empezó los estudios de cisplatino en la clínica. Hasta ahora es el compuesto de elección en la quimioterapia de varios cánceres humanos.

### 2.6.2. Mecanismo de acción

El cisplatino es un complejo de coordinación cuadrado plano que contiene como átomo central al platino rodeado de 2 átomos de cloro y 2 moléculas de amonio. La actividad antitumoral de este complejo es más alta cuando el cloro y el ión amonio tienen posición *cis*

comparada con la posición *trans*. La inhibición del crecimiento del tumor por el cisplatino parece ser debida a la inhibición de la síntesis del DNA, y la configuración *cis* del cisplatino favorece la formación de cadenas cruzadas internas en el DNA (54-58). Estudios recientes sugirieron que estas cadenas cruzadas pueden formarse a través de la posición N-7 de las bases de guanina adyacente, resultando una desnaturalización local de la doble hélice del ADN (59). Sin embargo, este entrecruzamiento se presenta en las dos posiciones *cis* y *trans*, por lo que resulta una propuesta cuestionable, ya que la posición *trans* no tiene actividad antitumoral.

### 2.6.3. Farmacología

Estudios iniciales de farmacocinética del cisplatino en animales indicaron que se elimina del organismo de una manera bifásica (61,62). La vida media de distribución (constante de eliminación alfa) es menos de 1 h y la vida media de eliminación (beta) fue de 4-5 días en perros y de dos días en ratas (61). La administración de diuréticos y fluidos intravenosos después del cisplatino no alteraron significativamente la farmacocinética del fármaco, pero si disminuyeron drásticamente la concentración de platino en la orina (63, 64). Este método de administración redujo en alto grado la nefrotoxicidad en los pacientes (62). La vida media de eliminación plasmática (beta) en humanos fluctúa de 58 a 73 h (61, 62).

El cisplatino puede reaccionar con moléculas de agua en el plasma para formar especies monoacu y diacu que pueden reaccionar con varios nucleófilos. El análisis por espectrofotometría de absorción atómica fue inadecuado para describir la farmacología del cisplatino, analizando platino total. En 1977 se describió un método para medir niveles en plasma de platino como fármaco libre y unido a proteínas. Optimizaciones de este método han hecho posible medir las concentraciones en plasma del fármaco inalterado y otras

especies (metabolitos y productos de degradación) por cromatografía de líquidos (65-68). Los resultados de éste y otros estudios indicaron que después de una dosis bolo, los niveles en plasma del fármaco libre disminuyen de un modo bifásico con vida media de eliminación (constante de eliminación beta) de 32 – 53.5 min. Probablemente, la vida media de de distribución (alfa) del platino total plasmático observado en estudios recientes representa la depuración del plasma de platino libre. Después de 3 h de la administración de cisplatino, aproximadamente el 90% del platino en plasma es fármaco unido. Estudios *in vitro* de unión a proteínas plasmáticas de cisplatino demostraron que la cantidad de platino libre disminuye, durante las primeras 10-12 h de incubación.

La farmacología parece ser compleja. La disociación del cloruro de cisplatino en plasma permite que se formen un número de especies reactivas que forman complejos con moléculas pequeñas y nucleófilos. En suma, la unión a proteínas posiblemente vía unidades del ión amonio, complica más los análisis farmacocinéticos. Para clarificar estos resultados es necesario contar con métodos más sensibles para su detección.

#### 2.6.4. Actividad antitumoral

Se ha demostrado su actividad antitumoral en un buen número de sistemas experimentales incluyendo melanoma B-16, carcinosarcoma Walker 256 (69), sarcoma 180 y leucemia L1210(21) (57) y tumores mamarios inducidos- DMBA (carcinógeno dimetilbenceno antraceno) en ratas (70). En combinación con otros agentes quimioterapéuticos, metotrexate y daunomicina, el cisplatino demostró efectos terapéuticos aumentados en leucemia L1210 comparados a los obtenidos con la administración sola del compuesto y se demostró ausencia de resistencia cruzada en tumores resistentes a agentes alquilantes (71).

Tratamientos combinados con radioterapia sugieren un efecto sinérgico del cisplatino en la actividad antitumoral (72).

### 2.6.5. Toxicidad

La principal toxicidad del cisplatino se observó primero en perros, monos (73) así como en los estudios en pacientes en estudios clínicos de fase I. Los efectos tóxicos son: toxicidad renal que limita la dosis que puede darse, náusea, vómito, mielosupresión, ototoxicidad y disminución de electrolitos en suero sanguíneo.

### 2.6.6. Análogos del cisplatino

Se han sintetizado muchos análogos del cisplatino. Un gran número de ellos ha presentado actividad antitumoral en animales experimentales y muchos presentan menor nefrotoxicidad (74,75).

Una clase de análogos que contienen moléculas de 1,2-diaminociclohexilo mostró actividad sobre la línea celular L1210, que había desencadenado resistencia al cisplatino (57). Uno de estos compuestos, el malonato de 1,2 diaminociclohexilo platino II, demostró actividad antitumoral en tumores humanos (76, 77) algunos de los cuales presentan resistencia al cisplatino.

Otro grupo de análogos de platino con valencia 4+, (platino IV), puede tener una actividad adicional sobre el DNA que es diferente a la de los compuestos de platino II,

relacionándose con un efecto en la fosforilación de la proteína en el núcleo de las células tumorales y de las normales. (78).

## **II. Hipótesis**

La Casiopeína IIIa, compuesto de coordinación con cobre II en la parte central y con actividad antineoplásica demostrada *in vitro*, al administrarse intravenosamente presentará niveles plasmáticos distribuidos preferentemente en circulación sanguínea por ser un compuesto hidrofílico y por presentar forma iónica en soluciones acuosas puede presentar unión a glóbulos rojos en la sangre. El comportamiento de este compuesto en general, presentará una cinética de eliminación de primer orden en un modelo bicompartimental.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### IV. Parte experimental

##### 4.1 Reactivos

La casiopeína IIIia (Cas IIIia) fue sintetizada por el grupo de Dra. Lena Ruiz, en la Facultad de Química, UNAM, según las patentes (1,2)

Albúmina bovina, Sigma Chemical Co.

Prednisona, estándar secundario.

Metanol grado cromatográfico, Tecnolab

Heparina, Inhepar, PISA (Farmacéutica mexicana), 1000 U/mL.

Fosfato de sodio monobásico RA, J.T. Baker

Fosfato de sodio dibásico RA, J.T. Baker

Agua grado HPLC (destilada, desionizada y filtrada)

Hidróxido de sodio RA, J.T. Baker

##### 4.2 Material Biológico

Ratas Wistar, peso promedio entre 250 y 300 g , Harlam Fac. de Química

Perro beagle, peso entre 13.6 y 11.6 kg

##### 4.3 Equipo

Sonicador Cole-Palmer, modelo 8890

Equipo desionizador de agua, Millipore

Equipo para filtración de disolventes, Millipore

Balanza analítica Sartorius, modelo A210P

Centrífuga Sigma 2-15

Vortex Thermolyne, modelo M37615

Potenciómetro Orion Research, modelo 301

Equipo de diálisis, Spectrum, modelo 5 unidades.

Bomba de perfusión, Abbot Modelo 3000.

Cromatógrafo de líquidos Shimadzu, con bomba isocrática (Modelo LC10Avp), un detector uv de longitud de onda variable (Modelo SPD10Avp), inyector con loop de 50  $\mu$ L (Cotat CA, USA) y un integrador Shimadzu (Modelo C-R501).

Columna Symmetry C18, 5 $\mu$ , 4.6 x 250 mm

Precolumna security Guard Phenomenex C18

Congelador LAB-Line Instruments, INC.) Temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$

Equipo de diálisis Spectrum 5-celdas.

#### 4.4 Soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4.

Solución de hidróxido de sodio 1.0 M.

Solución al 4% de albúmina humana.

Solución de albúmina 0.1 g/dL en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M

Solución de alfa-glicoproteína ácida (AAG) 1 mg/mL, en solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M

Fase móvil: solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01M, pH  $6.2 \pm 0.5$ , Metanol grado CLAR (60:40)

Solución patrón de estándar interno de Naproxen, 10 mg/mL para el método de CLAR en orina.

Solución patrón de estándar interno de acetaminofén, 25  $\mu$ g/mL. Estándar interno para el método de CLAR en sangre total.

Solución estandar de casiopeína IIIia en metanol-agua (6:10), 500 µg/mL.

Solución de casiopeína IIIia (10 mg/mL) en metanol-solución salina (1:10).

Solución patrón de casiopeína IIIia, 500 µg/mL, en plasma

Solución al 10% de ZnSO<sub>4</sub>.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 6.7

Solución patrón de Cas IIIia en orina, concentración de 1000 µg/mL.

Solución de Cas IIIia en orina, concentración de 50 µg/mL

Solución patrón de clorhidrato de Ranitidina en metanol, concentración 500 µg/mL

Solución de clorhidrato de ranitidina en metanol, concentración 5 µg/mL para el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en orina.

Solución de hexansulfonato de sodio 5 mM en agua.

## 4.5 Métodos

### 4.5.1 Método para determinar la solubilidad de casiopeína III-ia

Se utilizó el método de Yalkowsky (79), caracterizando al compuesto por espectrofotometría ultravioleta. Se consideró su estructura como complejo de coordinación en forma de sal nitrato y la forma de dosificación que sería solución intravenosa.

La solubilidad se estudió en diferentes soluciones: agua, metanol, etanol, solución de fosfatos pH 7.4 y solución salina, ya que estos disolventes y soluciones se utilizarían en el método por CLAR y en la formulación de solución intravenosa. Se pesaron 5 mg del compuesto y se diluyeron en 5 mL del disolvente a estudiar (concentración 1 mg/mL), se agitó y se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 200 a 400 nm, observándose los diferentes máximos de absorbancia en las diferentes soluciones.

4.5.2 Método analítico para la cuantificación de Casiopeína IIIa en plasma

Este método se reportó en el artículo Fuentes-Noriega y col. *J. Chrom. B*, 772 (2002) 115-121. (14), las condiciones cromatográficas se muestran en la Tabla 4, y las condiciones bajo las cuales se obtuvieron los parámetros de validación se explican en los párrafos 4.5.2.2 y 4.5.2.3.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Casiopeína IIIa en plasma

	Condición
Columna	Symmetry® C <sub>18</sub> , 5μ, 4.6 x 250 mm
Precolumna	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>
Fase móvil	Metanol:Fosfatos pH 6.1, 0.01M (40:60)
Flujo	0.8 mL/min
Longitud de onda	262 nm
Volumen de inyección	100 μL, asa de 50 μL.
Estándar interno	Naproxen (10 μg/mL)

4.5.2.2. Curva de calibración de Casiopeína IIIa en plasma de rata

Se preparó una curva de calibración en plasma en el intervalo de 5 a 100 μg /mL partiendo de la solución patrón de 500 μg/mL

4.5.2.3. Extracción de Cas IIIa en plasma y su cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

A 1 mL de plasma (problema o solución de curva de calibración) se adiciona 1 mL de metanol CLAR, que contiene el estándar interno, Naproxen 10 μg/mL y se agita en vortex

por 20 segundos, tras lo cual se le adicionan 0.1 mL de ZnSO<sub>4</sub> al 10%, se agita en vortex por 20 segundos. Se centrifuga a 6988g por 10 minutos, se filtra el sobrenadante por un filtro Acrodisc (Gelman Sciences) de 0.2 μm y se coloca el sobrenadante en un vial para cuantificarlo por CLAR (14).

#### 4.5.3 Método analítico para la cuantificación de Casiopeína IIIa en sangre

Este método se basó en el reportado en la tesis de Antonio Jarquín Julia (Facultad de Química, posgrado de Ciencias Químicas (Farmacia) 2001 (52). Se optimizaron las condiciones para bajar las concentraciones hasta 5.0 μg/mL

Las condiciones cromatográficas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Casiopeína IIIa en sangre de rata.

	Condición
Columna	Symmetry® C <sub>18</sub> , 5μ, 4.6 x 250 mm
Precolumna	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>
Fase móvil	Metanol:Fosfatos pH 6.1, 0.01M (40:60)
Flujo	0.8 mL/min
Longitud de onda	262 nm
Volumen de inyección	100 μL, asa de 50 μL.
Estándar interno	Ranitidina (2.5 μg/mL)

##### 4.5.3.2 Preparación de la curva patrón en sangre de rata.

Se preparó una curva de calibración en el intervalo de 5 – 100 ug /mL a partir de la solución patrón de Casiopeína IIIa, 500 μg/mL en sangre de rata

4.5.3.3. Procedimiento para cuantificar Casiopeína IIIa en sangre de rata.

En un tubo de centrifuga heparinizado adicionar 600  $\mu\text{L}$  de metanol (grado CLAR) más 200  $\mu\text{L}$  de sangre adicionada de Casiopeína IIIa, agitar 30 seg. en vortex.

Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{ZnSO}_4$  al 10% más 150  $\mu\text{L}$  de estándar interno (Ranitidina, 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en fase móvil). Agitar 30 seg. en vortex.

Centrifugar a 6988g durante 5 min., separar el sobrenadante, filtrar por filtros nylon 0.2  $\mu\text{m}$  e inyectar 100  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo.

4.5.4. Método analítico para cuantificar Cas IIIa en orina de rata

4.5.4.1. Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de Cas IIIa en orina se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de Cas IIIa en orina de rata.

	Condición
Columna	Thermo hypersil-keystone C18, 250 X 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ .
Precolumna	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>
Fase móvil	Metanol:solución amortiguadora de fosfatos pH 6.7, 0.01M : hexansulfonato de sodio 5 mM (30:65:5) v/v.
Flujo	0.8 mL/min
Longitud de onda	274 nm
Volumen de inyección	50 $\mu\text{L}$ , asa de 50 $\mu\text{L}$ .
Estándar interno	Clorhidrato de ranitidina (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Tiempo de corrida	13 minutos

#### 4.5.4.2. Preparación de la curva patrón en orina de rata

Se preparó una curva de calibración considerando las soluciones de Cas IIIa en orina de 1000 µg/mL y de 500 µg/mL, en el intervalo de concentraciones de 6 – 30 µg/mL

#### 4.5.4.3 Procedimiento para cuantificar casiopeína IIIa en orina de rata.

Se sigue el mismo método especificado en el párrafo 4.5.2.3 mencionado para el método de extracción de Cas IIIa en plasma. Los cambios efectuados en la técnica fueron el del estándar interno naproxeno por el clorhidrato de ranitidina con una concentración de 5 µg/mL y la centrifugación se realizó a 25155g por 10 minutos en tubos eppendorf.

#### 4.5.5. Determinación de unión a proteínas de Cas IIIa por el método de diálisis al equilibrio. Se reportó el estudio preliminar en referencia (14).

##### 4.5.5.1. Preparación de la curva de calibración de Cas IIIa en solución amortiguadora 64 mM pH 7.4

Se utilizaron las mismas diluciones que para el método en plasma con la misma técnica, se llevaron al aforo con solución amortiguadora 64 mM pH 7.4, mencionado en el párrafo

4.5.3.2.

##### 4.5.5.2. Preparación de la curva de calibración de Cas IIIa en presencia de albúmina.

Se utilizaron las mismas diluciones que para el método en plasma de rata con la misma técnica, se llevó al aforo con solución de albúmina al 0.1%. Párrafo 4.5.2.2.

##### 4.5.5.3. Preparación de la curva de calibración de Cas IIIa en presencia de plasma humano.

Se utilizaron las mismas diluciones que para el método en plasma de rata con la misma técnica, se llevó al aforo con plasma humano.

4.5.5.4. Determinación del grado de unión de Cas IIIia a la membrana. Se preparó una solución de Cas IIIia en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM a una concentración de 50 µg/mL y se dializó durante 5 h. Se tomaron muestras a las 2, 3,4 y 5 h, considerando una de las celdas como blanco.

4.5.6. Validación del método analítico para la cuantificación de Casiopeína III-ia en sangre, plasma u orina de rata.

4.5.6.1. Especificidad

La especificidad del método se determinó analizando que ninguno de los componentes endógenos de la sangre (plasma u orina) interfirieran con el tiempo de retención de la Casiopeína III-ia. Se analizaron cromatogramas del fluido biológico con y sin fármaco en una muestra del fluido.

4.5.6.2. Linealidad del sistema

Para determinar la linealidad del sistema se prepararon 3 curvas patrón de Casiopeína III-ia en metanol en el intervalo de concentración de 5 –50 µg/mL. Se graficó la relación de áreas obtenidas del área de Casiopeína III-ia / el área del estándar interno contra la concentración estudiada de Casiopeína III-ia, a fin de determinar si los datos se ajustan a un modelo lineal simple descrito por la ecuación

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

Donde

Y, relación de áreas de Casiopeína III-ia y el estándar interno

x, concentración de Casiopeína III-ia

Los estimados m y b se calcularon utilizando el método de mínimos cuadrados, así también el coeficiente de variación (cv) y el de determinación ( $r^2$ ).

4.5.6.3. Linealidad del método

La linealidad del método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Para su determinación se prepararon 3 curvas de Casiopeína IIIa en sangre de rata (plasma u orina), de acuerdo con el método descrito en la sección 4.5.3.2, 4.5.2.3 y 4.5.4.2, en el intervalo de concentraciones de 5 a 50 µg/mL. En el caso de plasma de humano el intervalo evaluado fue de 5 a 100 µg/mL. Para el caso del método en orina también se prepararon 3 curvas de Cas IIIa en orina según el párrafo 4.5.4.2.

Se graficó en el eje de las “y” la relación de áreas de la Casiopeína IIIa y el estándar interno contra el eje de “x”, la concentración del analito, a fin de determinar si los datos se ajustan a un modelo de regresión lineal. Se determinó la desviación estándar de regresión ( $S_{y/x}$ ), coeficiente de variación (cv) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

4.5.6.4. Precisión del método (Repetibilidad y Reproducibilidad)

La repetibilidad se evaluó en un solo día bajo condiciones idénticas de analista y equipo. Tres concentraciones (puntos control) dentro de la curva patrón pero diferentes a las de la curva, 7, 12, 27 µg/mL, se trabajaron por quintuplicado. Para el caso del método en orina los puntos control trabajados fueron 8, 16, y 24 µg/mL de Cas IIIa. Se determinó la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (cv).

La reproducibilidad se evaluó en dos días de trabajo, variando sólo el analista y conservando las condiciones de equipo y de laboratorio. Se prepararon los mismos puntos control trabajados en el primer día por quintuplicado.

El modelo que representa la relación entre la variable de respuesta y los factores bajo estudio (analista/ día) se representa en la ecuación 2:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)} \dots\dots\dots(2)$$

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Donde:

$Y_{ijk}$ , repetibilidad de la Cas IIIa de la k-ésima muestra, del j-ésimo día por i-ésimo analista.

$\mu$ , media general

$\alpha_i$ , efecto del analista (reproducibilidad interanalista),  $i=1, \dots, a$  (en este caso  $a=2$ ).

$\delta_{j(i)}$ , efecto del día anidado en el analista (reproducibilidad intra-analista o interdía o interanálisis),  $j=1, \dots, d$  (en este caso  $d=2$ )

$\epsilon_{k(ij)}$ , error experimental o error asignable al método (repetibilidad),  $k = 1, \dots, r$  ( en este caso  $r=3$ ).

Para determinar si los factores de variación afectan a la variable de respuesta se realizó un análisis de la varianza.

#### 4.5.6.5. Recuperación

La exactitud del método, también conocida como error sistemático, se determinó preparando 3 curvas patrón de Casiopeína IIIa en sangre en el intervalo de concentración de 5 – 50 ug/mL. Al mismo tiempo se prepararon 3 curvas estándar en metanol a las mismas concentraciones y se determinó el rendimiento en la extracción (recuperación) a cada concentración. Se calculó la media aritmética (Y), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

#### 4.5.6.6. Límite de detección y cuantificación.

El valor de límite de detección se determinó considerando 2 veces el nivel del ruido que presenta la línea base del equipo en las condiciones cromatográficas especificadas. El límite de cuantificación se consideró 10 veces el mismo ruido.

#### 4.5.6.7. Estabilidad

Una muestra de sangre de rata adicionada con Cas IIIa a una concentración de 80 µg /mL se mantuvo en condiciones de congelación (-20°C) y temperatura ambiente con luz y sin luz. Se analizó la muestra a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después de la preparación.

Para el caso del método de cuantificación de Cas IIIa en orina se evaluó la estabilidad del compuesto al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida en el fluido biológico. Se prepararon por duplicado tres niveles de concentración (4, 8, 12 µg /mL) en orina, se sometió a dos ciclos de congelación-descongelación a -20°C antes de analizar las muestras. Para que los compuestos de interés se consideren estables su desviación absoluta deberá estar dentro del 15% del valor nominal de la concentración.

4.6 Determinación de tiempo de equilibrio y unión a la membrana en plasma de rata, plasma de humano y albúmina humana.

**Tiempo de equilibrio.** Se realizó en el dializador Spectrum 5-cell con las condiciones de 19 rpm y temperatura de 37°C. En cada una de las celdas de menor grosor se colocó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4. En cada celda de mayor grosor se colocó una muestra de 1 mL de Cas IIIa a la concentración de 50 µg/mL en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4. El equipo se dejó trabajar por 8 horas y se retiraron muestras de 0.5 mL de las dos celdas a los tiempos de 30, 60, 90, 180, 250, 320, 400 y 480 minutos, repitiéndose el experimento por lo menos 3 veces y se analizaron ambas celdas utilizando la metodología descrita en 4.5.1.3.

**Unión a proteínas plasmáticas en plasma de rata, plasma de humano y albúmina humana.** Esta diálisis se realizó en las mismas condiciones especificadas anteriormente, 19

---

rpm y 37°C. En cada una de las celdas de menor grosor se colocó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4. En las celdas de mayor grosor se colocó una muestra de 1 mL de Cas IIIa a las concentraciones de 12, 25 y 50 µg/mL preparadas en la matriz biológica correspondiente (plasma de rata, de humano o solución de albúmina al 4%). Las muestras se tomaron a las 5 horas. Las muestras de solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4, de plasma y de albúmina se obtuvieron y se analizaron por el método de CLAR descrito en 4.5.1. Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado.

#### 4.7. Estudios *in-vitro* de cinética de distribución en sangre total

Se prepararon de muestras sanguíneas de 1 mL de rata Wistar con Casiopeína IIIa a diferentes concentraciones 15, 25 y 150 µg/mL, por duplicado, y se incubaron en baño maría a 37°C. por 0, 15, 30, 60, 120 minutos, se tomaron 100 µL de sangre de estas muestras para seguir el procedimiento indicado en el proceso de extracción, apartado 4.5.2.3, al resto del contenido del tubo se centrifugo a 5000 rpm durante 5 minutos para obtener el plasma y seguir el procedimiento indicado en el apartado 4.5.1.3.

#### 4.8 Estudio preclínico para determinar los parámetros farmacocinéticos de la Casiopeína IIIa. en rata. Estudio preliminar reportado en Fuentes Noriega et al., (2002).

En el estudio formal se consideraron los resultados obtenidos en el estudio preliminar y se emplearon 3 ratas Wistar por punto con peso promedio entre 250-300 g. El análisis de la muestras se realizó en sangre, ya que en ésta se encontró que el método fue más sensible que el de plasma y porque los estudios de distribución de cinética *in vitro* mostraron una relación de  $C_{\text{sangre}}/C_{\text{plasma}} > 1$  (42).

#### 4.8.1 Procedimiento empleado en la administración de Cas IIIa a ratas Wistar

- a) Se pesó a cada una de las ratas y con base en el peso, se determinó el volumen a inyectar, para alcanzar una dosis de 9 mg/Kg a partir de la solución patrón de Cas IIIa (10 mg/mL) en solución salina isotónica
- b) Se localizó la vena de la cola de la rata y se colocó un catéter del número 25.
- c) Se administró solución salina fisiológica para verificar que no existiera filtración.
- d) Se administró el volumen (entre 0.2 y 0.5 mL) de solución salina de Casiopeína IIIa por vía intravenosa. Se tomaron muestras de sangre por la vena ocular de cada rata a los 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos. El volumen de muestra tomado fue de 0.5 mL.
- e) Las muestras se trataron según lo descrito en el apartado 4.5.2.3.

#### 4.8.2 Aplicación del método de orina en un estudio de Cas IIIa en ratas Wistar. Artículo enviado, Anexo 2.

Se emplearon 10 ratas Wistar macho, de peso entre 265-300 g. Las ratas permanecieron en ayuno 8 horas antes de la administración de Cas IIIa y agua *ad libitum*. A 6 ratas se les administró una dosis bolo de 9 mg/Kg de Cas IIIa por vía intravenosa, según la técnica utilizada en el párrafo 4.5.6.1. La solución de Cas IIIa fue de 7 mg/mL en solución salina. Cada rata se colocó en una jaula metabólica para recolectar las muestras de orina a los 30, 60, 120, 180, 240, 300, 420, 540, 660, 720 y 1380 minutos después de la administración de la solución de Cas IIIa.

A las cuatro ratas restantes (ratas control) se les administró agua inyectable y se recolectó su orina que se utilizó para preparar la curva de Cas IIIa, hasta terminado el experimento (23 horas). De cada muestra de orina recolectada se tomó 1 mL y se trabajó

como lo muestra el método de extracción de Cas IIIa en orina (apartado 4.5.3.3), se analizó una curva de Cas IIIa en orina de ratas control al momento del análisis de las muestras.

4.9 Estudio preclínico preliminar para determinar los tiempos de muestreo de la Casiopeína IIIa en perro.

4.9.1 Procedimiento empleado en la administración de Cas IIIa en el estudio preliminar a dos perros raza beagle, peso 11.6 y 13.6 kg.

- a) Se pesaron los perros para administrar una dosis de 3.5 mg/kg de Cas IIIa por infusión lenta por 20 minutos con ayuda de una bomba de perfusión.
- b) Se colocó un catéter (No 21) en la vena de la pata izquierda
- c) Se administró solución salina fisiológica para verificar que no existiera filtración.
- d) Se preparó una solución de Cas IIIa en solución salina con un volumen total de 100 mL (el volumen contiene la cantidad de Cas IIIa requerida según la dosis). Esta solución se conectó a la bomba de perfusión y se preparó para inyectar en 25 minutos
- e) Se tomaron muestras de sangre a los 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 y 1140 minutos, por la vena de la pata. El volumen que se tomó fue de 1.5 mL.
- f) Las muestras se trataron según lo descrito en apartado 4.5.2.3.

4.10. Determinación de parámetros farmacocinéticos

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos : Área bajo la curva de 0 a 360 minutos ( $ABC_{0-t}$ ), área bajo la curva de cero a infinito ( $ABC_{0-\infty}$ ), constante de eliminación ( $k_{el}$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), tiempo medio de residencia (TMR), volumen de distribución aparente ( $V_d$ ) y depuración (Cl). Éstos se determinaron empleando el paquete

V. RESULTADOS

5.1 Solubilidad Cas IIIa

La solubilidad de Casiopeína IIIa a temperatura ambiente (aproximadamente entre 19 - 22°C) en los diferentes disolventes fue buena, ya que en todos ellos se disolvió, presentando una disolución mayor en agua>metanol>etanol>solución salina al 9%>solución de fosfatos 64mM. El espectro obtenido en cada uno no presentó variaciones, las longitudes de onda con sus absorbancias máximas en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, 64 mM, fueron 297 con 1.62 y 217 con 2.52. Se observó la estabilidad también en esta solución a 37°C no observándose inestabilidad por 12 horas. En solución acuosa con refrigeración por 16 días solo tuvo un 3.8% de degradación. Figura 6.

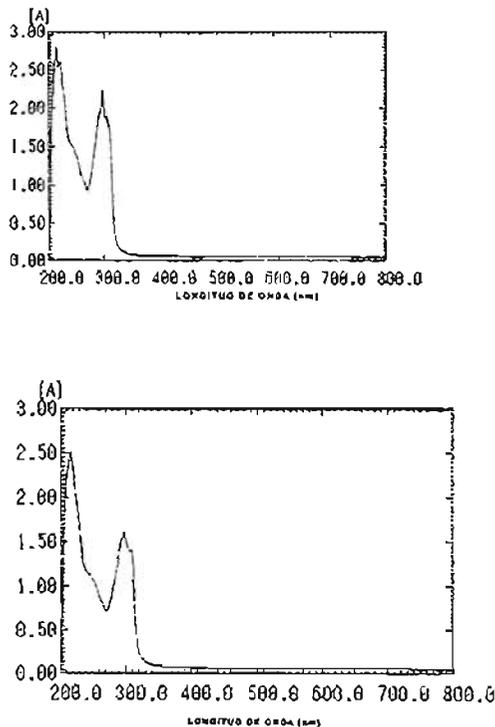


Figura 6. Espectro de Casiopeína IIIa en solución acuosa, arriba antes de refrigeración y abajo después de refrigeración por 15 días.

5.2. Validación del sistema.

De acuerdo a las normas de validación para fluidos biológicos se obtuvieron los resultados de linealidad y precisión del sistema, los que permiten asegurar que el equipo está funcionando adecuadamente.

5.2.1. Linealidad. Los resultados de la validación del sistema se muestran en la Figura 3 que indica la gráfica promedio de la curva de calibración, con dos repeticiones, en el intervalo de concentraciones de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , considerando la relación entre las áreas de Casiopeína IIIa y las del estándar interno como variable dependiente.

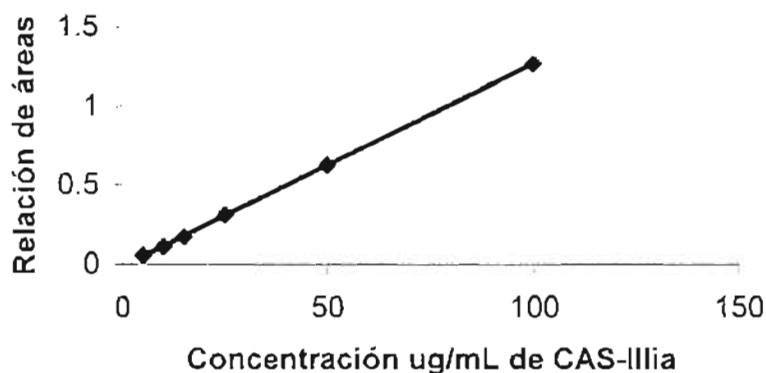


Figura 7. Linealidad del sistema. Gráfica promedio de una curva de calibración con dos repeticiones de Cas IIIa en metanol-agua.

5.2.2 Precisión

Los resultados obtenidos en la precisión del sistema se realizaron con 3 repeticiones de una concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$  en tres sitios diferentes del inyector. Se obtuvo una media de la respuesta R (relación de áreas Cas IIIa/estándar interno) de 0.2352 con una desviación estándar de  $1.48 \times 10^{-3}$  y un %CV de 0.6291

5.3 Validación de los métodos

En la validación de los métodos analíticos en cada fluido biológico, se obtuvieron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, cantidad mínima cuantificable, cantidad mínima detectable, % de recuperación, en algunos casos tolerancia y estabilidad en diferentes condiciones, los que aseguraban según la norma, que el método es confiable para el análisis usado. La cantidad mínima detectable se consideró al analizar el nivel del ruido en cada método, esto es, toda aquella perturbación en el detector que no está relacionada con el soluto eluido por analizar se considera el ruido del detector que se mide en mv y se mide como la respuesta en amplitud máxima, entre el nivel del ruido grande y el corto, en un periodo aproximado de 10 minutos.

Las condiciones del método por CLAR en cada uno de los fluidos utilizados se muestran en la tabla 7:

Tabla 8. Condiciones cromatográficas de los diferentes fluidos biológicos para la cuantificación de Cas IIIa por CLAR.

Condiciones cromatográficas	Plasma*	Orina	Sangre	Sol. amortiguadora de fosfatos*
Tr de casiopéina	5.0 minutos	6.73 minutos	5.9 minutos	5.9 minutos
Uso de filtros de 0.2 µm antes de la inyección al cromatógrafo	Si	No	Si	No
Precolumna C18,	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>	Security Guard Phenomenex C <sub>18</sub>
Columna	Symmetry® C <sub>18</sub> , 5µ, 4.6 x 250 mm	Thermo hypersil-keystone C18, 250 X 4.6 mm, 5µm.	Symmetry® C <sub>18</sub> , 5µ, 4.6 x 250 mm	Symmetry® C <sub>18</sub> , 5µ, 4.6 x 250 mm
Longitud de onda	262 nm	274 nm	262 nm	262 nm
Estandar interno	Naproxén (10 µg/mL)	Clorhidrato de ranitidina (5.0	Clorhidrato de ranitidina, (2.5	No

		$\mu\text{g/mL}$ . Tr 10.6 min.	$\mu\text{g/mL}$ ) Tr 7.8 min	
Fase móvil	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos pH 6.1, 0.01M (40:60)	Metanol:solución amortiguadora de fosfatos pH 6.7, 0.01M : hexansulfonato de sodio 5 mM (30:65:5) v/v.	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos pH 6.1, 0.01M (40:60)	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos pH 6.1, 0.01M (40:60)
Flujo	0.8 mL/min	0.8 mL/min	0.8 mL/min	0.8 mL/min
Volumen de inyección	50 $\mu\text{L}$ .	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$ .	1 50 $\mu\text{L}$ .

Como se puede observar, los métodos utilizados por CLAR no tienen mucha diferencia, para su desarrollo, sólo existen variaciones en el método de orina que resultó tener más elementos que pudieran interferir en la cuantificación de Casiopeína IIIa. El tiempo de retención (Tr) para el compuesto no es grande y el tiempo de análisis máximo es de 15 minutos, lo cual resulta adecuado en análisis de fluidos biológicos.

### 5.3.1. Linealidad, precisión, exactitud, selectividad, % de recuperación en plasma de rata.

Los resultados se reportaron en el artículo J. Chrom. B. (14). Los tiempos de retención para Cas IIIa y heparina, utilizada en la obtención de las muestras, fueron de 5.0 y 8.7 minutos respectivamente. La linealidad del método fue de 0.9978 en una curva de calibración de 5.0 a 100  $\mu\text{g/mL}$  en muestras preparadas con plasma de rata. La precisión intradía presentó un %C.V. de 1.7 – 9.1% y la precisión interdía presentó un %CV más alto de 10.6% en la concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ . El porcentaje de recuperación promedio de CAS IIIa en plasma fue de 87.2%. El límite de cuantificación considerando la mínima concentración en la curva validada fue de 5.0  $\mu\text{g/mL}$  y el límite de detección considerando tres veces el nivel del ruido fue de 150 ng/mL. La estabilidad de Cas IIIa en plasma de rata a 6°C por 48 h fue de

96%, en solución de fosfatos 64 mM, pH 7.4 a 37°C, se tuvo un 97% a las 24 h y en plasma de rata a 37°C, fue de 97.5% a las 24 h.

5.3.2. Validación del método en plasma humano.

5.3.2.1 Especificidad en plasma de humano. Se muestran los cromatogramas de miliabsorbancia (mabs) contra el tiempo en minutos. El tiempo de retención para la casiopeína IIIa fue de 5.4 minutos, en ese tiempo se observa que la muestra de plasma de humano no tiene interferencia de picos.

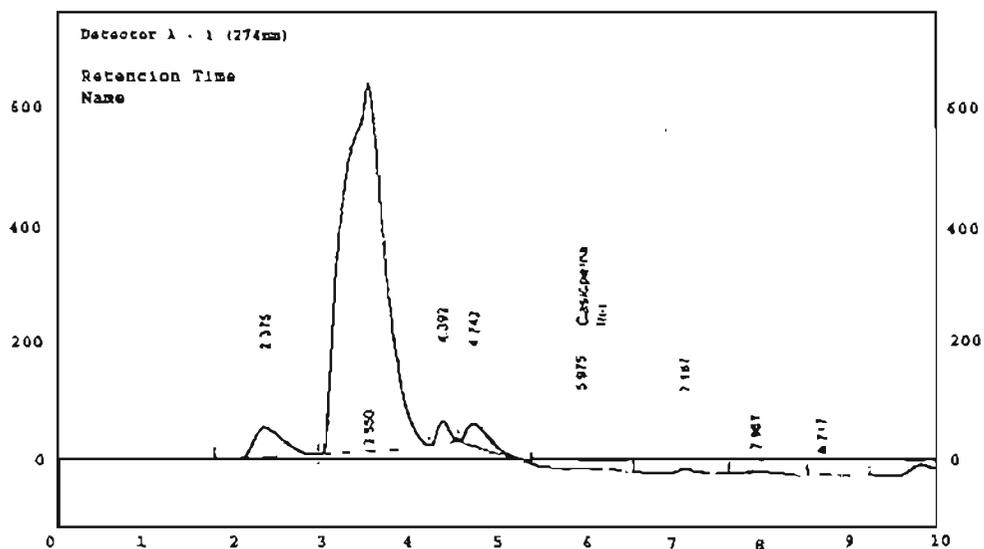


Figura 8. Cromatograma de una muestra de plasma de humano sin solución de Cas IIIa, (blanco).

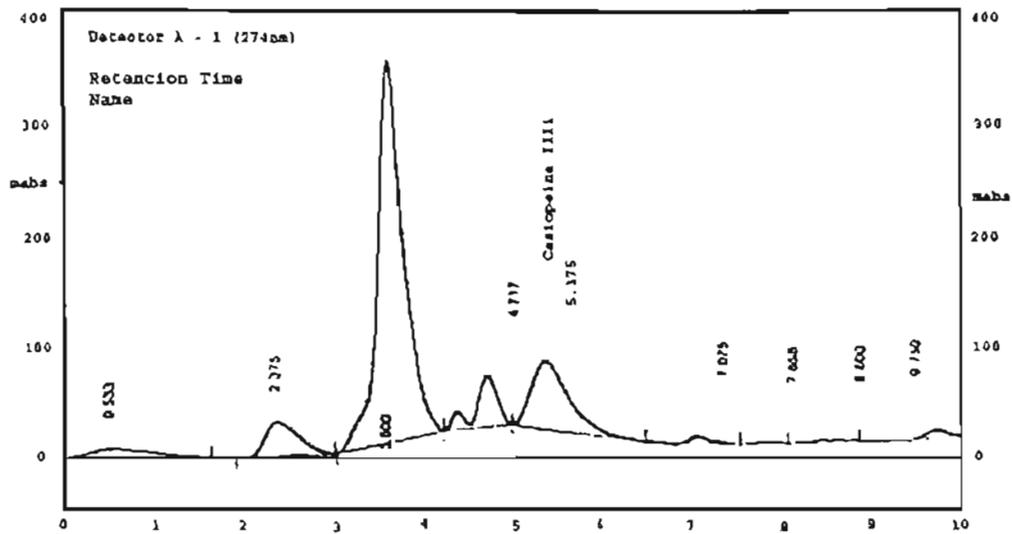


Figura 9. Cromatograma de Cas-IIIa 25  $\mu\text{g/mL}$  en plasma de humano. Tiempo de retención 5.4 minutos.

5.3.2.2 Linealidad del método en plasma humano.

Se consideró un intervalo de 5- 100  $\mu\text{g/mL}$  y se analizaron 3 curvas en el mismo día, al graficar las concentraciones de casiopeína IIIa contra la relación de áreas (R) se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a uno. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Linealidad del método en plasma humano con resultados de relación de áreas.

Concentración de Cas IIIa en plasma humano, $\mu\text{g/mL}$	Curva 1, R	Curva 2, R	Curva 3, R
5	0.0454	0.0469	0.0376
10	0.0916	0.0925	0.0976
25	0.2621	0.2417	0.2778
50	0.5382	0.6174	0.5886
100	1.1157	1.2086	1.2056
Coeficiente de correlación, r	0.9999	0.9987	0.9999

Coeficiente de correlación promedio = 0.9995

Porcentaje del coeficiente de variación (% C.V) = 0.07189  
 $r^2 = 0.9990$

5.3.2.3. Precisión intradía en plasma humano

Se prepararon diferentes concentraciones de casiopeína en plasma humano, estas concentraciones denominadas puntos control fueron de 7, 12 y 27 µg/ml, para cada concentración se obtuvo la relación de áreas de Cas IIIa y el estándar interno (R) y el % del coeficiente de variación (% C.V.). Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Precisión intradía del método en plasma humano

Concentración, µg/mL	R, promedio Día 1	Desviación estándar	% C.V.
7	0.0751	0.0059	7.89
12	0.1175	0.0086	7.34
27	0.2536	0.0109	4.32

5.3.2.4. Precisión interdía del método en plasma humano.

Se trabajaron los mismos puntos control en dos días diferentes, se muestran los porcentajes de los coeficientes de variación obtenidos en día 1 y día 2 en la tabla 10 y 11 respectivamente.

Tabla 10. Precisión interdía de la solución de Cas IIIa en plasma humano considerando relación de áreas, R, promedio.

Concentración, µg/mL	R promedio	Desviación estandar	% C.V.
7	0.0794	0.0069	8.66
12	0.1202	0.0117	9.74
27	0.2519	0.0184	7.32

Tabla 11. Precisión interdía de la solución de Cas IIIa en plasma humano, considerando el porcentaje del coeficiente de variación en los días 1 y 2.

Concentración, $\mu\text{g/mL}$	Día 1, % C.V.	Día 2, % C.V.
7	7.89	8.66
12	7.34	9.74
27	4.32	7.32

### 5.3.2.5 Recuperación

Se evaluó el porcentaje de recuperación que se muestra en la tabla 12, en el intervalo de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , el cual se obtuvo al relacionar la concentración experimental y la concentración teórica, considerando esta última como el 100%.

Tabla 12. Recuperación del método de Cas IIIa en plasma humano.

Concentración Teórica, $\mu\text{g/mL}$	Concentración experimental, $\mu\text{g/mL}$	% C.V.	% Recuperación
5	3.514	11.53	80.93
10	8.442	3.45	86.54
25	21.24	6.95	84.45
50	42.85	6.89	92.58
100	88.12	4.49	92.94
		Promedio	$87.49 \pm 5.21$

### 5.3.2.6 Límite de detección y de cuantificación

A partir de la línea base, en las condiciones cromatográficas, se consideró dos veces el nivel del ruido y se detectó que la concentración fue de 0.315  $\mu\text{g/mL}$ . Al considerar, 10 veces el nivel del ruido fue de 4.5  $\mu\text{g/mL}$ . El nivel del ruido se obtuvo de la amplitud máxima presentada en el análisis en base al nivel del ruido más grande y el mas corto.

5.3.2.7 Estabilidad

En este caso la muestra se trabajó en una concentración de 100 µg/mL preparada en plasma humano y se mantuvo en congelación a resguardo de la luz, analizándose las muestras a los 0, 2, 4, 5 y 7 días. Los resultados se muestran en la tabla 13. En todos los casos se calculó el porcentaje presente en la muestra, tabla 14.

Tabla 13. Concentraciones obtenidas en el estudio de estabilidad

Concentración inicial de Cas IIIa µg/mL	-4°C, 2 días	-4°C, 5 días	-4°C, 7 días
97.56	97.01	96.80	94.87
98.62	98.24	98.12	97.02
98.96	98.35	97.47	96.28

Tabla 14. Porcentaje obtenido para cada una de las condiciones

Condiciones	-4°C, 2 días	-4°C, 5 días	-4°C, 7 días
Porcentaje	99.44	99.78	98.00
	99.61	99.88	98.88
	99.38	99.10	98.78
Promedio	99.48	99.59	98.55

5.3.3. Validación del método en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4

5.3.3.1. Especificidad

En el estudio no se consideró un estándar interno para obtener las respuestas, ya que el Naproxén mostraba un tiempo de retención mayor a los 20 minutos. Se muestran los cromatogramas (mabs contra tiempo en minutos) de la solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, sin fármaco y con él. El tiempo de retención de casiopeína IIIa fue de 5.9 minutos, al cual se puede observar no presenta interferencias en esas condiciones.

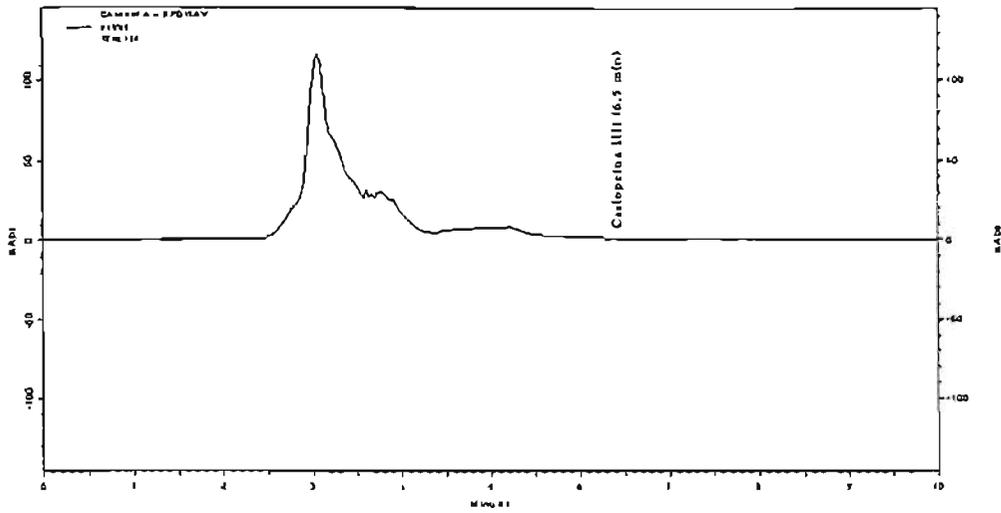


Figura 10. Cromatograma blanco de solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4.

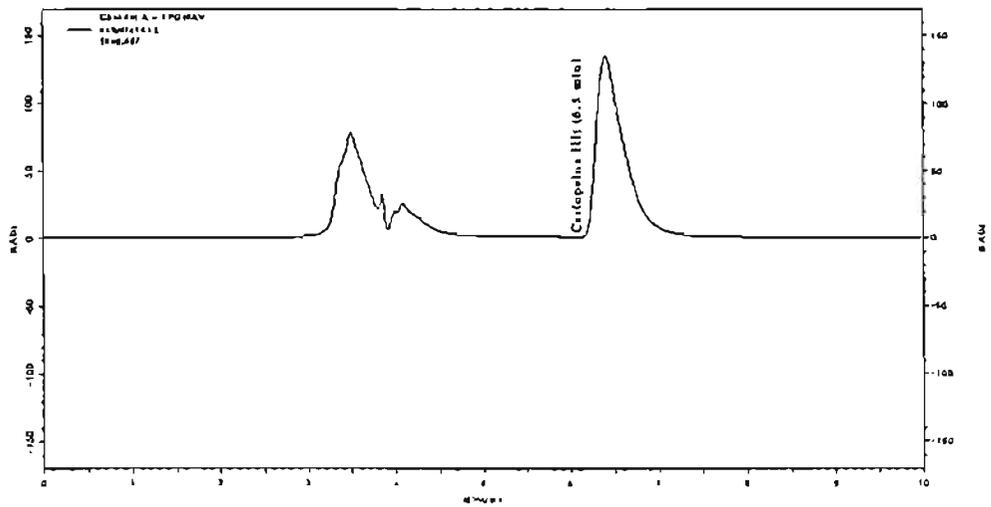


Figura 11. Cromatograma de Cas IIIa, 10 ug/mL en solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4.

5.3.3.2. Linealidad del método

Se estudió en el intervalo de 5 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y los resultados de las áreas de la solución de Cas IIIa (mabs) contra la concentración correspondiente presentaron una  $r = 0.9921$  promedio) y un intercepto de 127802.107. La figura 8 muestra la linealidad del método

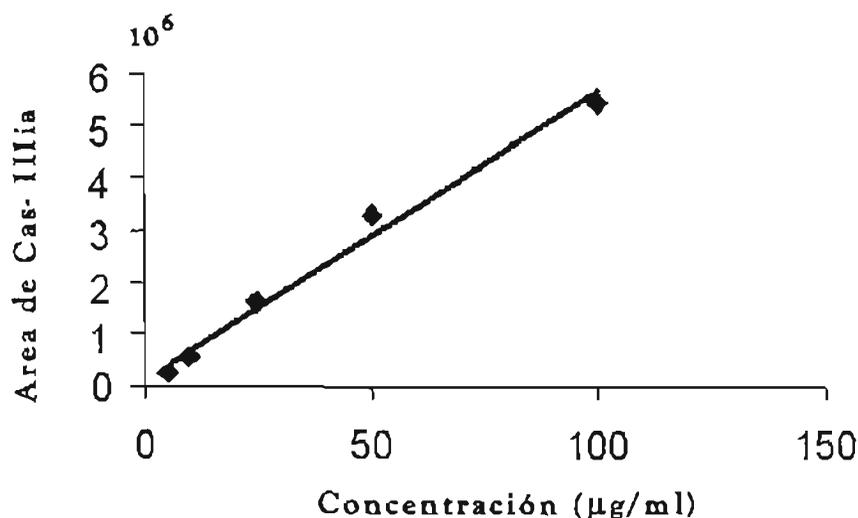


Figura 12. Linealidad de solución de Cas IIIa en solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4 en el intervalo de 5 – 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

5.3.3.2. Precisión

Se analizó con tres corridas de tres curvas patrón de solución de Cas IIIa en solución amortiguadora en un día. El intervalo de concentración trabajado fue de 5 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y los resultados muestran el promedio de las áreas de los picos con su respectivo % de coeficiente de variación.

Tabla 15. Precisión intradía del método de Cas IIIa en solución amortiguadora 64 mM, pH 7.4, día 1.

Concentración Cas IIIa, $\mu\text{g/mL}$	Promedio áreas	Desvest	%CV
5	237575.667	7432.29	3.1
10	546152.333	17085.84	3.1
25	1613859	52052.50	3.2
50	3315874.33	246232.03	7.4
100	5464366.33	50635.15	0.9

### 5.3.3.2. Precisión interdía

Para precisión interdía se realizaron otras tres curvas patrón en el mismo intervalo, y no presentaron un % CV mayor a 10%.

### 5.3.3.3. Recuperación

Se compararon los resultados de las áreas de la curva de Cas IIIa en solución amortiguadora con los resultados de los obtenidos con solución de Cas IIIa en metanol-agua, y se obtuvo un porcentaje de recuperación del 83.85 – 85.18 %.

### 5.3.4. Validación del método de cuantificación de Cas IIIa en sangre.

#### 5.3.4.1 Especificidad.

Se analizaron muestras de sangre total adicionadas de Cas IIIa en una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  y se obtuvieron los cromatogramas de miliabsorbancia contra tiempo, donde se observó el tiempo de retención de 5.9 minutos, el estándar interno, ranitidina tuvo un tiempo de retención de 7.8 minutos. Como se puede observar en esos tiempos no se obtuvieron interferencias de la sangre.

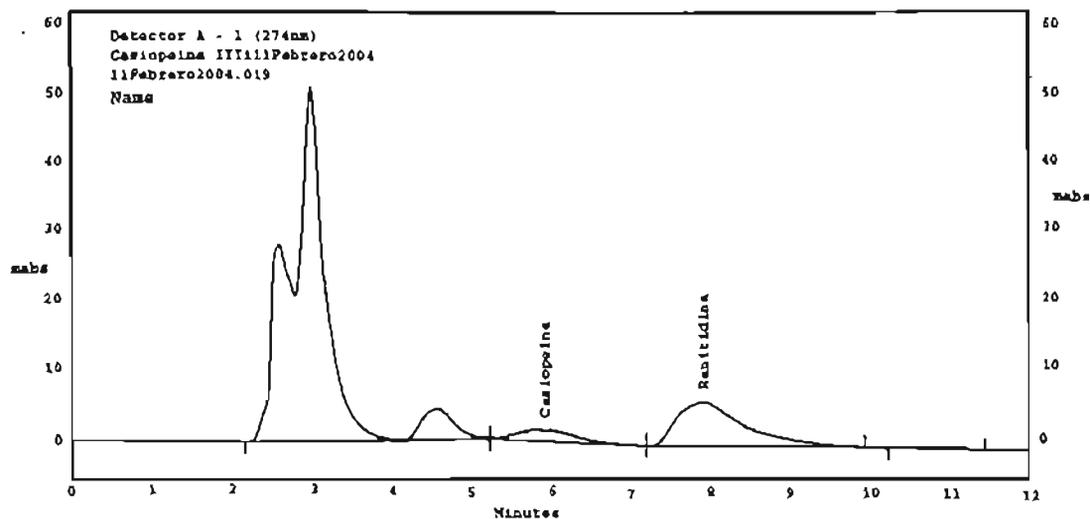


Figura 13. Cas IIIa en sangre de rata, 50 µg/mL, Tiempo de retención (Tr) 5.95 minutos y Ranitidina Tr 7.8 minutos

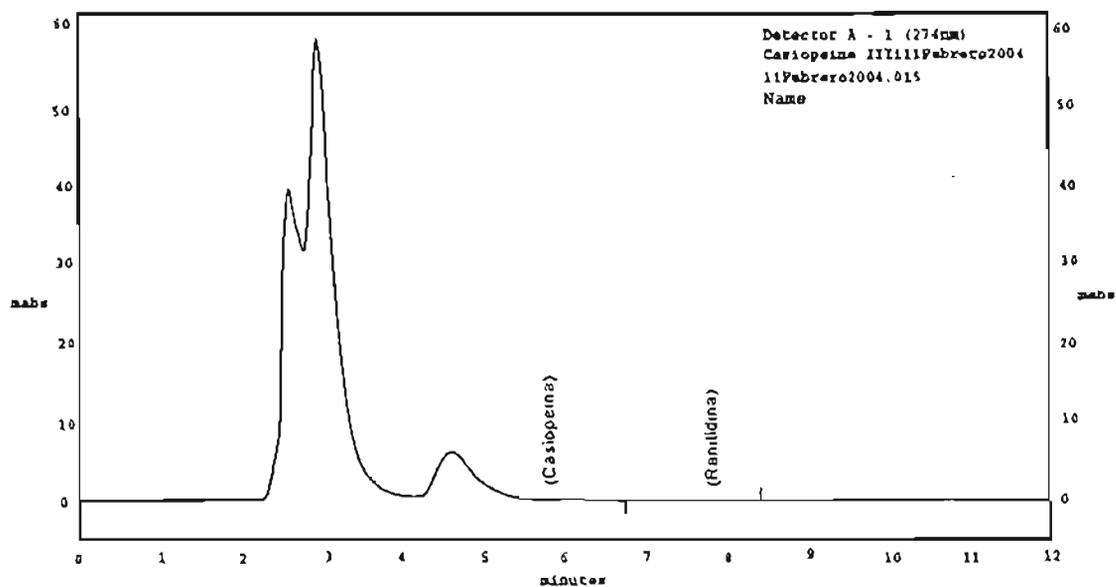


Figura 14. Cromatograma blanco de sangre

5.3.4.2 Linealidad del método

La linealidad del método para la cuantificación de Cas IIIa en sangre de rata utilizando la relación de áreas ( R ), área de Cas IIIa / estándar de clorhidrato de Ranitidina (2.5 µg/mL) se muestra en la figura 11.

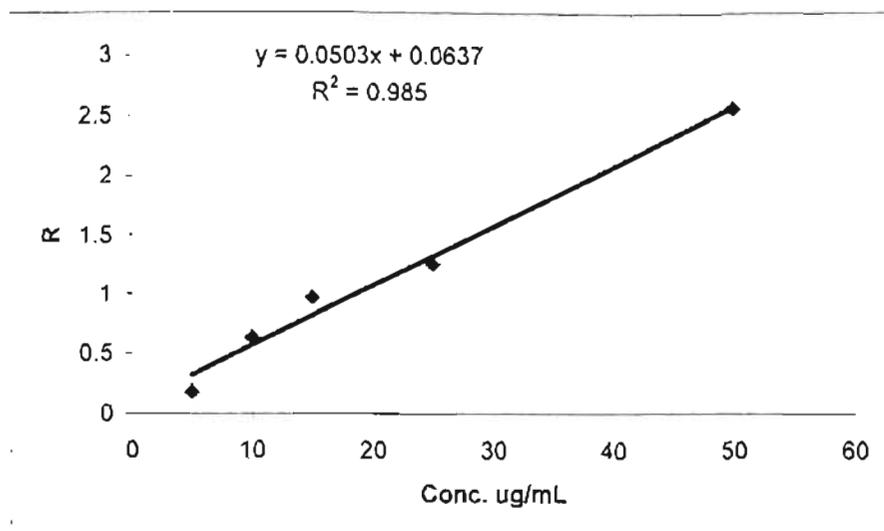


Figura 15. Linealidad promedio de Cas IIIa en sangre de rata 5 – 50  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando relación de áreas con estándar interno de ranitidina (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ).

5.3.4.3 Precisión intradía y exactitud del método.

La precisión intradía (mismo día) se determinó analizando puntos control de 7, 12 y 27  $\mu\text{g/mL}$  de Cas IIIa, al obtener la respuesta cromatográfica de relación de áreas con el estándar de ranitidina. La tabla siguiente muestra el %CV considerando el día 1 y la exactitud con el % de desviación absoluta.

Tabla 16. Precisión intradía y exactitud del método de Cas IIIa en sangre de rata considerando el día 1.

Réplica	7 $\mu\text{g/mL}$	12 $\mu\text{g/mL}$	27 $\mu\text{g/mL}$
Promedio	5.958	10.21	22.64
DE	0.180	0.263	1.065
%CV	3.03	2.584	4.71
% Desv. Absoluta	14.88	14.95	14.92

5.3.4.4. Precisión interdía

En la tabla siguiente se presentan los valores de %CV de las respuestas de Cas IIIa en diferentes días.

Tabla 17. Precisión interdía de Cas IIIa en sangre considerando el %CV y la desviación estándar absoluta de los puntos control.

Concentración, $\mu\text{g/mL}$	Día 1, % C.V. n = 5	% Desv. absoluta	Día 2, % C.V. n = 10	% Desv. absoluta
7	3.03	14.88	9.08	14.06
12	2.584	14.95	7.77	12.85
27	4.71	14.92	4.60	14.27
Promedio Día 1 y Día 2			5.29	14.32

#### 5.3.4.4 Recuperación

En la tabla 18 se muestra el porcentaje promedio de la recuperación para cada uno de los puntos control (alto, medio y bajo) analizados en la solución de Cas IIIa en sangre.

Tabla 18. Recuperación del método de Cas IIIa en sangre de rata, con puntos control 7, 12 y 27  $\mu\text{g/mL}$ .

Concentración de Cas IIIa ( $\mu\text{g/mL}$ )	R, relación de áreas Cas IIIa en solución	R, relación de áreas Cas IIIa en sangre	% Recuperación Promedio
Alto 27 $\mu\text{g/mL}$	1.604	1.365	
	1.615	1.442	
	1.656	1.320	
	1.549	1.243	
	1.631	1.385	
Promedio	1.611	1.351	83.85
Medio 12 $\mu\text{g/mL}$	0.767	0.673	
	0.912	0.742	
	0.759	0.650	
	0.850	0.727	
	0.787	0.667	
Promedio	0.815	0.692	85.00
Bajo 7 $\mu\text{g/mL}$	0.479	0.416	
	0.479	0.403	
	0.517	0.427	
	0.487	0.407	
	0.437	0.388	
Promedio	0.4798	0.408	85.18

5.3.4.5 Limite de cuantificación y de detección

El límite de cuantificación fue de 5 µg/ml que es el punto más bajo en la curva de calibración. El límite de detección fue de 4.16 µg/ml por el método de 10 veces el ruido de la línea base en las mismas condiciones del estudio.

5.3.4.6 Estabilidad

La Cas IIIa fue estable durante 12 horas en sangre de rata en un ciclo de congelación-descongelación a -4°C, observándose que a las 12 h el % de desviación absoluta ya es alto para ese tiempo, en las concentraciones estudiadas.

Tabla 19. % de desviación absoluta en la estabilidad de Cas IIIa en sangre durante 12 h,

Concentración µg/mL	Promedio. 0 h Concentración ( µg/mL )	Tiempo 0, (h), % C.V., n=3	% Desviación absoluta	Promedio. 12 h Concentración ( µg/mL )	Tiempo 12h, %C.V., n=3	% Desviación absoluta
7	5.88	1.36	0.08	6.29	10.65*	10.14*
12	11.105	1.67	0.185	10.605	1.46	10.83*
27	22.71	3.83	0.87	23.875	3.29	11.57*

5.3.5. Validación del método de cuantificación de Cas IIIa en orina.

5.3.5.1. Especificidad.

Se analizaron muestras de orina por separado, en un caso, adicionada de Cas IIIa con una concentración de 15 µg/mL y por otro los productos de síntesis, observándose

los tiempos de retención de cada uno, en los cuales no hubo interferencias del fluido analizado. Pero se observa que uno de los productos (Cu-acetilacetato) tiene el mismo tiempo de retención que la Cas IIIa de 6.0 minutos.

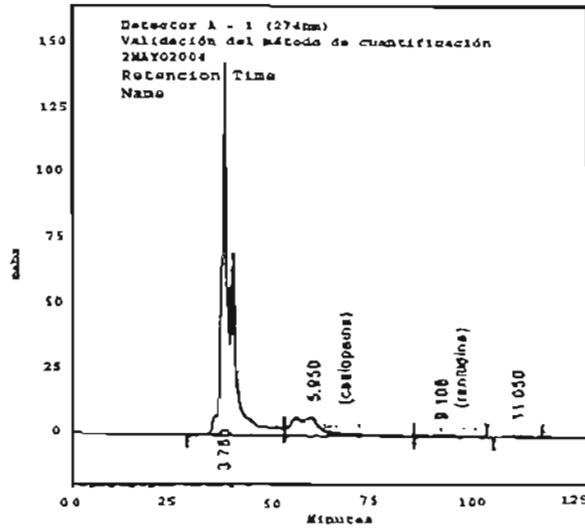


Figura 16. Cromatograma de blanco de orina

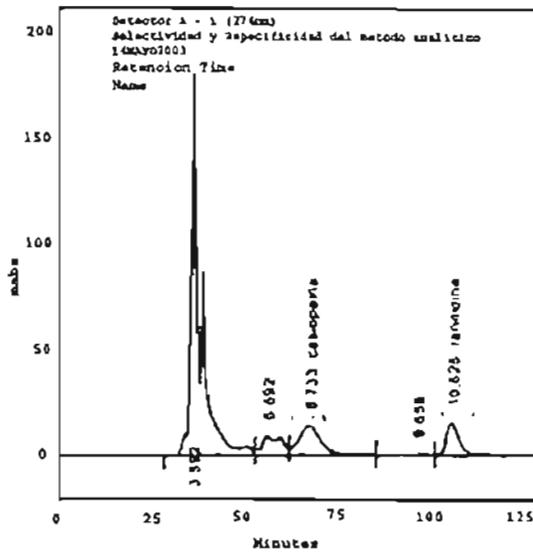


Figura 17. Cromatograma de Cas III 15 µg/mL en orina.

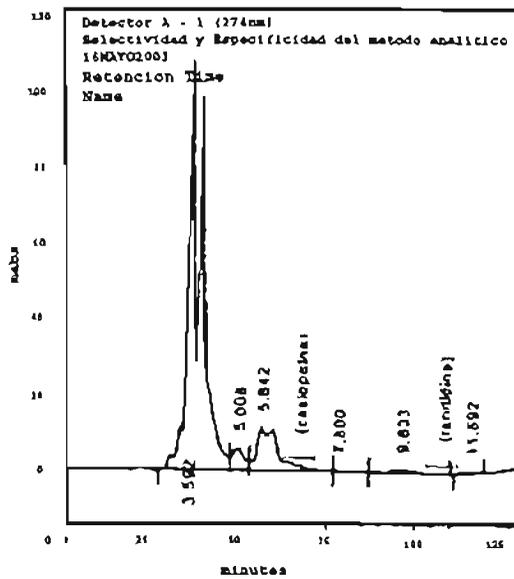


Figura 18. Cromatograma de muestra de orina con el producto Cu-4,4'dimetil el cual se observa que no salió en el transcurso de 13 minutos.

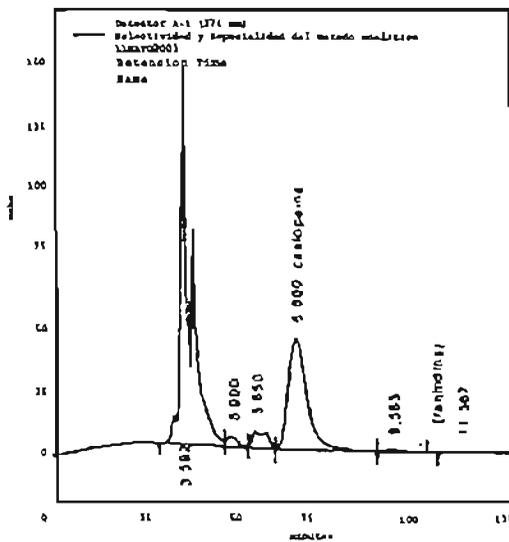


Figura 19. Cromatograma del producto Cu-acetilacetato en orina, Tr de 6.5 minutos

5.3.5.2. Linealidad del método

La figura 16 muestra los resultados de linealidad del método para la cuantificación de Cas IIIia en orina utilizando la relación de áreas ( R ), area de Cas III-ia / estándar de clorhidrato de ranitidina.

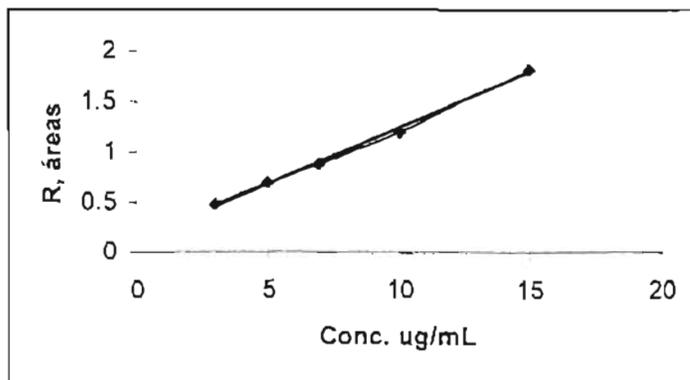


Figura 20. Linealidad promedio del método de Cas IIIia en orina con relación de áreas utilizando estándar interno de clorhidrato de ranitidina (5 µg/mL).

5.3.5.3 Recuperación

En la tabla 20 se muestra el porcentaje promedio de recuperación para cada uno de los puntos control (alto, medio y bajo) analizados en la solución de Cas IIIia en orina.

Tabla 20. Porcentaje de recuperación promedio en los puntos control, 4, 8 y 12 µg/mL

Concentración de Cas IIIia (µg/mL)	R, relación de áreas Cas IIIia en solución	R, relación de áreas Cas IIIia en orina	% Recuperación Promedio
Alto 12 µg/mL	1.091	1.111	
	1.065	1.140	
	1.050	1.122	
	1.072	1.118	
	1.069	1.108	
Promedio	1.069	1.120	101.83
Medio 8 µg/mL	0.909	0.827	
	0.811	0.830	
	0.915	0.846	

	0.920	0.802	
	0.853	0.826	
Promedio	0.882	0.826	93.93
Bajo 4 µg/mL	0.519	0.469	
	0.450	0.441	
	0.479	0.428	
	0.486	0.450	
	0.529	0.487	
Promedio	0.492	0.455	92.52

#### 5.3.5.4 Precisión y exactitud del método

Precisión intradía, en la tabla 21 se observan los resultados correspondientes a la repetibilidad del día 1 y exactitud del método, considerando los resultados cromatográficos de la relación de áreas entre Cas IIIa y ranitidina.

Tabla 21. Precisión intradía y exactitud del método de Cas IIIa en orina con puntos control de 4, 8 y 12 µg/mL

	Sol. de Cas IIIa en orina 4 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 8 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 12 µg/mL
Promedio	3.85	8.23	11.70
DE	0.27	0.19	0.15
%CV	7.03	2.26	1.28
% Desv. Absoluta	3.70	2.85	2.54

Para la precisión interdía promedio de Cas IIIa en orina, estudiada en dos días diferentes con una muestra de n=10, se obtuvo un %CV de 4.02 y una desviación absoluta de 5.7%.

5.3.5.5 Límite de cuantificación y de detección

El límite de cuantificación fue de 3 µg/ml que es el punto más bajo en la curva de calibración. El límite de detección fue de 2 µg/ml, ya que en esta concentración la señal de Cas IIIa es dos veces mayor que el nivel del ruido.

5.3.5.6 Estabilidad

5.3.5.6.1 Estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente

Para la estabilidad de las muestras en orina se prepararon muestras adicionadas de casiopeína en orina, considerando concentraciones especificadas como puntos control, 4, 8 y 12 µg/mL. En las tablas 22, 23 y 24 se muestran los resultados obtenidos para la estabilidad de la muestra procesada a 0, 12 y 24 h, con sus respectivos %CV y DE.

Tabla 22. Estabilidad de Cas IIIa en orina a 0 h

	Sol. de Cas IIIa en orina 4 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 8 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 12 µg/mL
Promedio	3.58	8.13	11.55
DE	0.14	0.11	0.0
%CV	3.82	1.34	0.04

Tabla 23. Estabilidad de Cas IIIa en orina a 12 h

	Sol. de Cas IIIa en orina 4 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 8 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 12 µg/mL
Promedio	3.76	9.01	11.78
DE	0.68	0.68	0.30
%CV	18.01	7.52	2.55
% Desv. absoluta	4.92	10.83	2.03

Tabla 24. Estabilidad de Cas IIIa en orina a 24 h

	Sol. de Cas IIIa en orina 4 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 8 µg/mL	Sol. de Cas IIIa en orina 12 µg/mL
Promedio	3.88	8.62	11.31
DE	0.14	0.82	0.08
%CV	3.54	9.48	0.75
% Desv. absoluta	8.41	6.07	2.11

5.3.5.6.2 Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación

En las tablas 25 y 26 se muestran los puntos control procesados al tiempo cero para la estabilidad en ciclos congelación-descongelación y los puntos control procesados después de dos ciclos de congelación-descongelación

Tabla 25. Puntos control de Cas IIIa en orina al tiempo cero (mismo día de preparación). Ecuación:  $y = 1.0213x - 0.0967$  con una  $r = 0.9989$ .

Concentración de Cas IIIa en orina (µg/mL)	Concentración interpolada de Cas IIIa en orina (µg/mL)
4	3.88
8	8.29
12	12.05

Tabla 26. Puntos control de Cas IIIa en orina con dos ciclos de congelación-descongelación

	Concentración de Cas IIIa en orina 4 µg/mL	Concentración de Cas IIIa en orina 8 µg/mL	Concentración de Cas IIIa en orina 12 µg/mL
Promedio	2.81	7.46	11.03
DE	0.14	0.02	0.10
%CV	5.07	0.27	0.94
% Desv. absoluta	29.69	6.81	8.11

### 5.3.5.7 Tolerancia

Se trabajaron diferentes columnas con las condiciones cromatográficas establecidas anteriormente: Fase móvil metanol: solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.7: hexansulfonato de sodio 5 mM 30:65:5, flujo 0.8 mL/min a una longitud de onda de 274 nm. Los resultados obtenidos en la columna Termo hypersil-keystone C18 se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Sol. de Cas IIIa en orina (puntos control), en las condiciones cromatográficas mencionadas en el párrafo 4.5.3.1 de la parte experimental, con una columna hypersil-keystone C18.

	Concentración de Cas IIIa en orina 4 µg/mL	Concentración de Cas IIIa en orina 8 µg/mL	Concentración de Cas IIIa en orina 12 µg/mL
Promedio	4.12	8.23	11.57
DE	0.15	0.01	0.02
%CV	3.57	0.15	0.18
% Desv. absoluta	2.97	2.91	3.55

Los resultados obtenidos en la columna Hypersil elite C18 se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 28. Solución de Cas IIIa en orina (puntos control), en las condiciones cromatográficas mencionadas en 4.5.3.1, con columna hypersil elite C18

	Concentración de 7 µg/mL	Concentración de 14 µg/mL	Concentración de 40 µg/mL
Promedio	6.90	13.99	11.57
DE	0.49	0.13	0.23
%CV	7.08	0.91	0.67
% Desv. absoluta	1.50	0.07	12.81

Los métodos se validaron en cuanto a las pautas de FDA para fluidos biológicos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Parámetros estadísticos en la validación del método de Cas IIIa por CLAR.

Parámetros de validación	Fluido biológico					
	Albúmina humana al 4%	Plasma de rata	Plasma de humano	orina	sangre	Sol. amortiguadora de fosfatos
Linealidad, r	0.9996*	0.9988*	0.9999*	0.998 (3 - 15 µg/mL)	0.994 (5 -50 µg/mL)	0.991*
Precisión	<12 %	<15 %	< 10 %	1.28-7.03 %	<15 %	0.9-7.4 %
% recuperación	>98 %	87.2 %	87.49 %	92.52-101.83%	83.85 – 85.18 %	>98%
Limite de cuantificación	5.0 ug/mL	5.0ug/mL	4.5 ug/mL	3.0 ug/mL	5.0 ug/mL	5.0 ug/mL
Limite de detección	350 ng/mL	150 ng/mL	315 ng/mL	2.0 ug/mL	4.18 ug/mL	75 ng/mL
Estabilidad a 6°C	95 % (1.09)** después de 24 h.	96%, después de 48 h.				
Estabilidad a 37°C	96% (2.2)** después de 24 h	97.5%, después de 24 h				98 % , después de 24 h.
Estabilidad a -4°C		98.55 %, después de 7 días		95 % después de 24 h	95%, después de 12 h	

\*intervalo trabajado de 5 – 100 ug/mL

\*\*CV% (porcentaje del coeficiente de variación)

La validación en fluidos biológicos se realizó considerando diferentes intervalos de concentración debido a las consideraciones del tipo de fluido biológico a evaluar. En orina se prefirió bajar el intervalo debido a que se esperaba encontrar menores concentraciones de fármaco inalterado. En sangre se trabajó en ese intervalo por encontrar una mejor linealidad.

Los compuestos de síntesis utilizados en la síntesis de Cas IIIa, que pueden presentar interferencias en el método, son Cu-4,4'-dimetil biperidina que no presentó ninguna señal de interferencia con Cas IIIa y tiene un  $T_r = 2.2$  min, pero no así la señal de Cu-acetilacetato ( $T_r$  de 6.5 – 6.8 min), la cual se observa junto al tiempo de retención de Cas IIIa, (11). El análisis de estos compuestos se fundamenta en la posibilidad de que se lleve a cabo una reacción de desproporción del complejo. El anticoagulante usado en todas las muestras fue la heparina y tampoco mostró interferencia en la señal.

En todos los casos se cumplieron los límites especificados para validación del método en fluido biológico, lo cual nos asegura que la presencia de componentes de la matriz biológica estudiada no nos afecta en la determinación de las concentraciones de Casiopeína IIIa.

5.4. Estudios de unión proteínas de Cas IIIa por diálisis al equilibrio en plasma humano y albúmina humana.

5.4.1. Tiempo de equilibrio. El tiempo de equilibrio se determinó siguiendo los lineamientos descritos en la sección 4.6 de la parte experimental, con los resultados se elaboraron las gráficas de % de concentración con respecto al tiempo. La figura 17 muestra

los resultados obtenidos, de los cuales se observa que el tiempo de equilibrio de Cas IIIa es de aproximadamente 4 h, por lo cual los experimentos de % de unión se realizaron a 5 h para asegurar el equilibrio, lo que resulta no conveniente para el estudio de estos compuestos por este método.

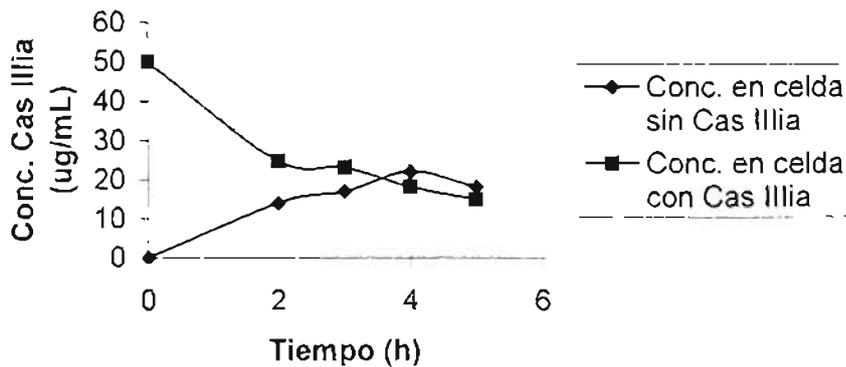


Figura 21. Determinación del tiempo de equilibrio de Cas IIIa en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM pH 7.4.

5.4.2 Unión a la membrana. El grado de unión a la membrana se determinó siguiendo los lineamientos especificados en la sección 4.5.3.4 y los resultados se muestran en la tabla 30, en ella se observa que no existe unión a la membrana después de una diálisis de 5 horas.

Tabla 30. Unión a la membrana para el estudio de unión a proteínas plasmáticas por el método de diálisis al equilibrio.

Tiempo (horas)	No de celda	Conc. en celda blanco Cas IIIa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. en celda muestra Cas IIIa ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. total	% Unión a la membrana
2	1	14.135	35.97	50.32	-
3	2	17.122	34.16	51.28	-
4	3	22.064	27.95	50.024	-
5	4	18.113	31.978	50.1	-
5 (celda blanco)	5	0	0	0	0

5.4.3 Unión a proteínas plasmáticas en plasma de rata, humano y albúmina humana.

El grado de unión a proteínas plasmáticas de Cas IIIa se determinó siguiendo los lineamientos de la sección 4.5.3.4 de la parte experimental. Los resultados promedio se muestran en la tabla 31, cada determinación se llevó a cabo con 5 repeticiones.

Tabla 31. Resultados promedio de la unión (%) a proteínas plasmáticas de Cas IIIa en las diferentes matrices biológicas. (ND, no detectado)

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de unión en plasma de rata (DE)	% de unión en plasma humano (DE)	% de unión en albúmina al 4% (DE)
12	ND	89.1 (1.9)	ND
25	48.3 ( $\pm 7.6$ )	76.3 ( $\pm 0.17$ )	30.5 ( $\pm 6.4$ )
50	57.7 ( $\pm 9.6$ )	76.4 ( $\pm 4.4$ )	37.9 ( $\pm 4.9$ )

En la Tabla 31 se observa que la unión a proteínas en plasma de rata es menor que la unión a proteínas en plasma de humano, lo cual puede deberse a que la rata contiene menor concentración de proteínas en el plasma (28) lo que ocasiona que exista un menor porcentaje de unión. En plasma de rata y en albúmina humana no fue posible detectar Cas IIIa a la concentración de 12  $\mu\text{g/mL}$ , debido a la baja sensibilidad del método analítico.

El grado de unión a proteínas en plasma de rata y de humano no es trascendente a las concentraciones de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , ya que es menor a 90%. Sin embargo, a la concentración de 12  $\mu\text{g/mL}$  se observa un aumento del porcentaje de unión (89.1%), lo cual sería crítico en la clínica ya que se encuentra cercano al 90%. Por ello, se sugiere optimizar el método analítico para tener uno más sensible y realizar las determinaciones a concentraciones menores a 12  $\mu\text{g/mL}$  por el método de diálisis al equilibrio, o utilizar el método de ultrafiltración, ya que en éste no se realizan diluciones de Cas IIIa.

El comportamiento de la unión a proteínas encontrado a diferentes concentraciones está de acuerdo con lo reportado por Shargel, L et al, (29) quienes observaron la influencia de la concentración del fármaco en la fracción unida para una concentración de proteína constante (Figura 22): A mayor concentración de fármaco la fracción unida es menor, como se observa en el porcentaje de unión en plasma de humano en la tabla 30, en las concentraciones de 12 a 25  $\mu\text{g/mL}$ , esto implica que existe un número limitado de sitios de unión que está disponible para fijar el fármaco. A concentraciones bajas la mayoría del fármaco podría fijarse a la proteína, mientras que a concentraciones altas, los sitios de unión pueden haberse saturado, con lo que se produciría un rápido incremento en la concentración libre de fármaco. Sin embargo, en el plasma humano se observa una unión casi constante entre la concentración de 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  debido a que probablemente en ese

intervalo de concentraciones estudiado nos encontremos ya con un proceso de saturación de sitios de unión.

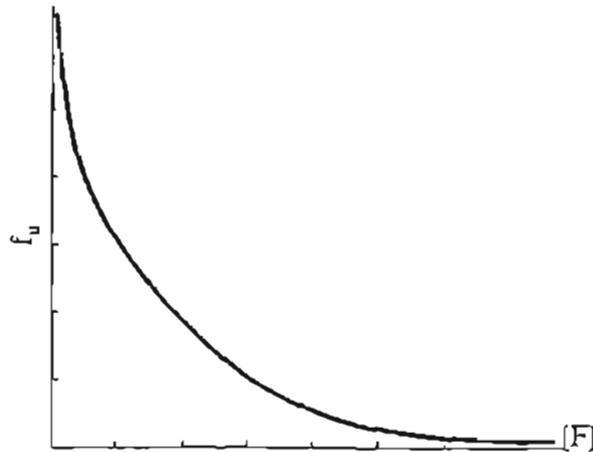


Figura 22. Influencia de la concentración de fármaco en la fracción unida para una concentración de proteína constante. (29).

### 5.5 Cinética de distribución de Cas IIIa *in vitro* en sangre de rata.

Los resultados de acuerdo al procedimiento mencionado en el párrafo 4.7, de la parte experimental, se muestran en las siguientes figuras, considerando las concentraciones analizadas de 15, 25, y 150  $\mu\text{g/mL}$  de Cas IIIa en sangre de rata.

En la cinética de distribución de Cas IIIa, en las muestras obtenidas en el plasma con la concentración 25  $\mu\text{g/mL}$ , se obtuvo una constante de primer orden de  $0.0231 \text{ min}^{-1}$ , en la figura 24 se observa este comportamiento, analizado mediante el programa WINNONLIN.

En la cinética de distribución correspondiente a la concentración de 150  $\mu\text{g/mL}$ , figuras 25, se observa que en los dos fluidos biológicos siguen una cinética de primer orden, con una constante de  $0.042 \text{ min}^{-1}$  para plasma y de  $0.0123 \text{ min}^{-1}$  para sangre.

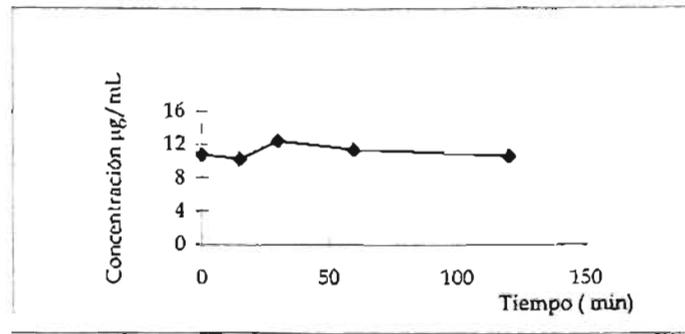


Figura 23. Cinética de distribución *in vitro* en sangre de rata, concentración 15 µg/mL de Cas IIIa.

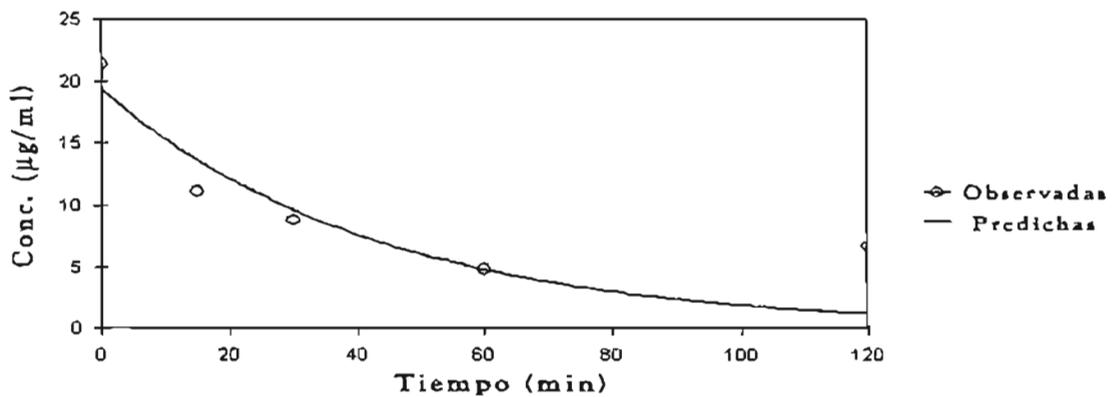
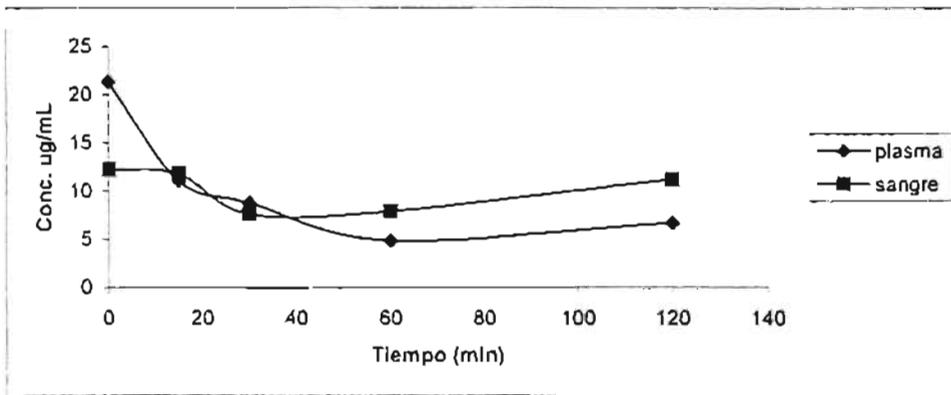


Figura 24. a) Arriba. Cinética de distribución *in vitro* de Cas IIIa en plasma y sangre de rata, concentración inicial 25 µg/mL de Cas IIIa. b) Abajo. Comportamiento de la cinética de distribución de Cas IIIa analizado en muestras plasmáticas por el programa WINNONLIN.

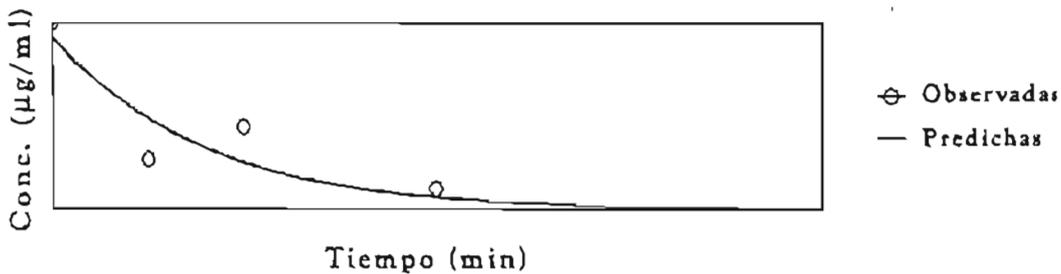
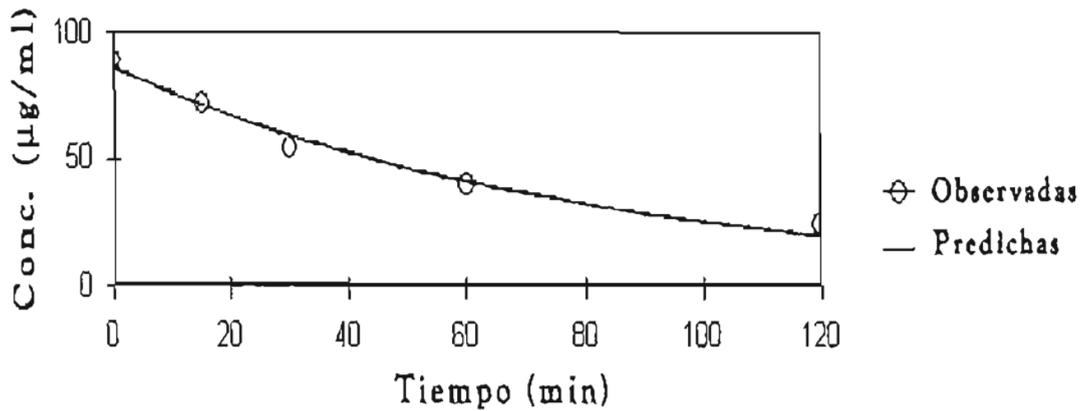
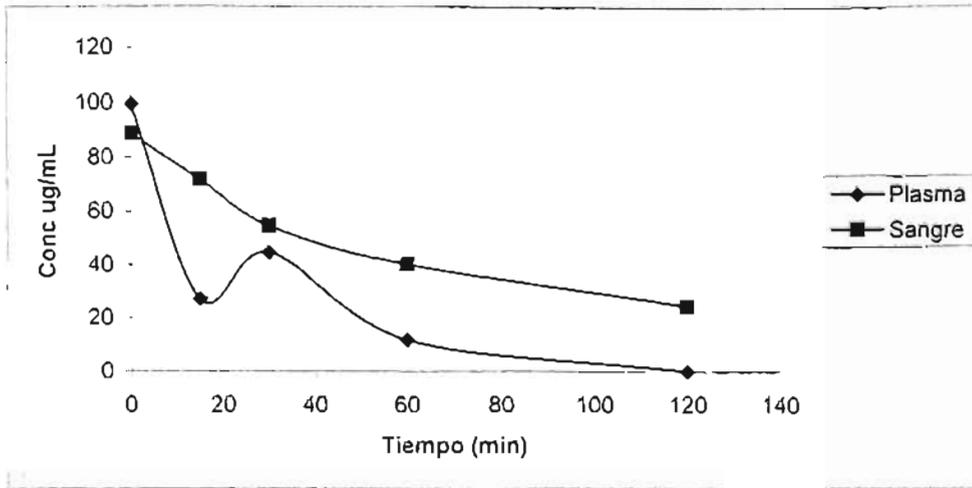


Figura 25. a) Arriba. Cinética de distribución *in vitro* de Cas IIIa en sangre de rata, concentración 150  $\mu\text{g/mL}$  b) Parte media. Ajuste de los datos de la cinética analizada en sangre con el programa WINNONLIN. c) Abajo. Ajuste de los datos de la cinética analizada en plasma, con el mismo programa.

Los resultados de los gráficos de las figuras 24, se puede observar que las soluciones de Cas IIIa en sangre alcanzan un cuasiequilibrio aproximadamente a los 30 minutos en la concentración de 25 ug/mL, pero siempre la concentración presente en sangre después del equilibrio es más alta que la del plasma, por lo cual se concluyó evaluar las concentraciones de Cas IIIa en sangre total, ya que el método presentó poca sensibilidad.

En la concentración alta (150 ug/mL) se puede observar una cinética de primer orden, pero se llega a un equilibrio después de los 100 minutos, observándose también que la concentración en sangre es mayor que la del plasma.

Para la solución de menor concentración de Cas IIIa (15  $\mu\text{g/mL}$ ) no fue posible analizar la parte del plasma ya que el método es poco sensible para estas concentraciones, sin embargo se logró evaluar las concentraciones en sangre total y estas se encontraron entre 10.41 – 12.43  $\mu\text{g/mL}$ , no presentando gran variación en las dos horas de análisis y se observa que alcanza un equilibrio desde los primeros tiempos.

La relación de  $C_{\text{sangre}}/C_{\text{plasma}}$  encontrada fue de  $7.76 \pm 0.39$  a los 60 minutos, lo que se debe considerar para los estudios preclínicos ya que el cociente es mayor que 1 y nos dice que el fármaco se encuentra en mayor concentración en sangre y puede estar unido a glóbulos rojos. De Vizcaya y col. (15) reportaron que la Casiopeína IIgly (dosis de 5mg/Kg) produce un daño a los eritrocitos de sangre periférica de rata Wistar, lo que se atribuyó a la generación de radicales libres y al daño oxidativo en la membrana y dentro de las células como resultado de la reducción de cobre (II) a cobre (I) y probablemente disociación de algún ligante del complejo. Este daño mostró una respuesta eritropoyética regenerativa con recuperación total a los 15 días. Los eritrocitos juegan un papel muy importante en el transporte y disposición cinética de los fármacos en la sangre, para los

compuestos que se acumulan en éstos en una extensión apreciable y, por ello, la información farmacocinética preclínica que puede obtenerse caracterizando el plasma y sangre total puede ser de gran ayuda. Según Lindskog y col. (48) la unión de metales a la anhidrasa carbónica presente en los eritrocitos se lleva a cabo en las isozimas CAI (baja afinidad) y la CAII (alta afinidad) especialmente, así también Malaz A. y col (49) reportaron un modelo físico que describe la disposición de un fármaco en sangre y plasma en donde recalcan la importancia de la unión cinética de los fármacos a eritrocitos y la cual se puede presentar lentamente en cuyo caso puede repercutir en las diferencias de la vida media en los diferentes fluidos, sangre y plasma.

De lo anterior se puede proponer una hipótesis de distribución cinética la cual involucra a los eritrocitos de la sangre con el modelo siguiente:

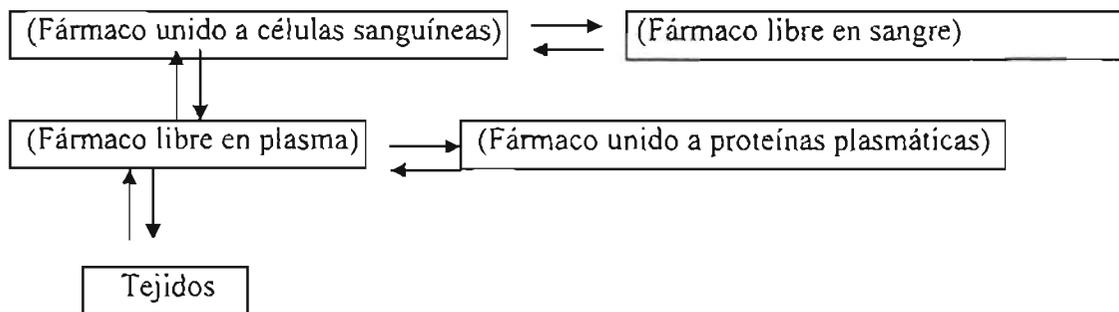


Figura 26. Representación esquemática de de distribución cinética del fármaco considerando a los eritrocitos de la sangre.

Solamente la fracción libre de fármaco se encontrará en disposición de abandonar el espacio vascular para difundir al espacio extravascular y alcanzar los distintos órganos y tejidos, donde se fijará con mayor o menor intensidad a las proteínas u otros componentes titulares.

5.6 Estudios de farmacocinética realizados en ratas Wistar y cuantificación de Cas IIIa en sangre.

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa WINNONLIN, versión 2.0.

El modelo que mejor se ajustó fue de modelo abierto de dos compartimentos con eliminación de primer orden, cuya ecuación es:

$$C_p = Ae^{\alpha t} + Be^{-\beta t},$$

donde  $C_p$ , concentración en sangre, A y B son interceptos al origen y alfa y beta los coeficientes correspondientes a constantes de velocidad de distribución y eliminación respectivamente.

La figura 27 muestra los valores analizados y los predichos con el modelo mencionado.

Los parámetros más importantes se muestran en la tabla 32.

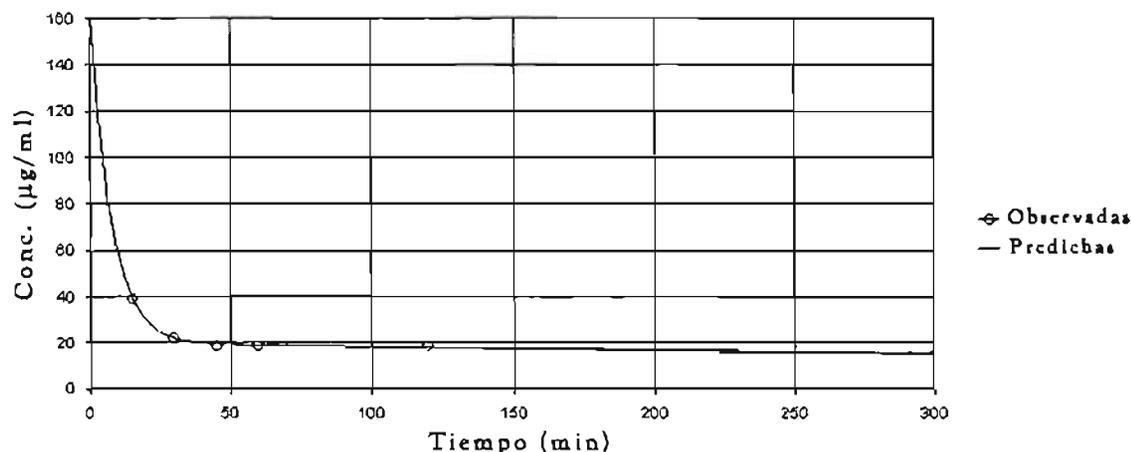


Figura 27. Gráfica de los datos analizados de Cas IIIa en sangre de rata de acuerdo al modelo propuesto de dos compartimentos. Dosis bolo intravenosa de 10 mg/kg.

Tabla 32. Parámetros farmacocinéticos obtenidos de la administración de 10 mg/Kg de Cas IIIa a ratas Wistar.

Parámetro	Valor
Área bajo la curva, ABC	22.277 mg/mL·min
Vida media k10	97.81 min
$\alpha$	0.131 min <sup>-1</sup>
$\beta$	9.28* 10 <sup>-4</sup> min <sup>-1</sup>
Vida media beta, t1/2	748.12 minutos (12.46 horas)
Concentración máxima, Cmax	157.37 µg/mL
Depuración, Cl	0.45* 10 <sup>-3</sup> L/min (0.45 mL/min)
Tiempo medio de residencia, TMR	1028.79 minutos (17.14 horas)
Volumen en el estado estacionario, Vss	0.462 L

Con la selectividad del método se demostró que no se encontraron interferencias de compuestos endógenos de la sangre así como de posibles metabolitos de Cas IIIa en la cuantificación del fármaco lo que permitió obtener el perfil de ln de concentración contra tiempo sin interferencias después de la administración de 10 mg/kg de Cas IIIa a ratas macho y realizar el ajuste de los datos obtenidos al modelo correspondiente.

En la mayoría de los valores de concentración sanguínea a los diferentes tiempos se tiene poca variabilidad a excepción del punto de 180 minutos. Todas las concentraciones predichas cayeron dentro del intervalo de concentración de la linealidad del método (5 – 50 µg/mL).

Del análisis de los datos anteriores y con ayuda del paquete WinNonlin 2.0, se encontró que el mejor modelo al cual se ajustaron los valores obtenidos fue el modelo abierto de dos compartimentos con eliminación de primer orden para una administración de dosis bolo intravenosa, sin tiempo lag. (Figura 27). Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 32, tomando en cuenta los parámetros farmacocinéticos independientes: depuración

---

Cl (0.45 mL/min) y volumen de distribución  $V_{ss}$  (0.462 L) y un tiempo medio de residencia, TMR de 17.14 h, así como los parámetros dependientes: vida media de eliminación,  $t_{1/2\beta}$  (12.46 h), vida media de  $\alpha$  (7.6 minutos), indican que la fase de distribución es más rápida que la de eliminación ( $\alpha > \beta$ ).

El modelo bicompartimental también se reportó para el compuesto de cisplatino, en un estudio en ratas (61, 62), este compuesto tiene una estructura química semejante a la de Cas IIIa: complejo de coordinación con estructura cuadrado plano, lo cual puede ser una característica para la forma de eliminación de estos fármacos.

5.7 Estudio farmacocinético en ratas Wistar con administración de Cas IIIa por bolo intravenoso y obtención de muestras de orina.

En la figura 28 se muestra la gráfica con los datos crudos de la cantidad acumulada promedio de Cas IIIa de orina de rata obtenida en los tiempos mencionados, con una dosis bolo de 9 mg/kg. Al analizar los datos con el paquete WINNONLIN 2.0 por el método de curva acumulativa (sigma menos), se obtuvieron los datos de la Tabla 34. En el método de curva acumulativa se utilizan cantidades acumuladas en cada intervalo de tiempo, sumando a cada valor, los valores obtenidos en las determinaciones anteriores. Estas curvas definen una trayectoria ascendente a medida que progresa la excreción del fármaco, hasta que cuando ya no queda fármaco por excretar en el organismo, la curva se vuelve asintótica (paralela al eje de abscisas).

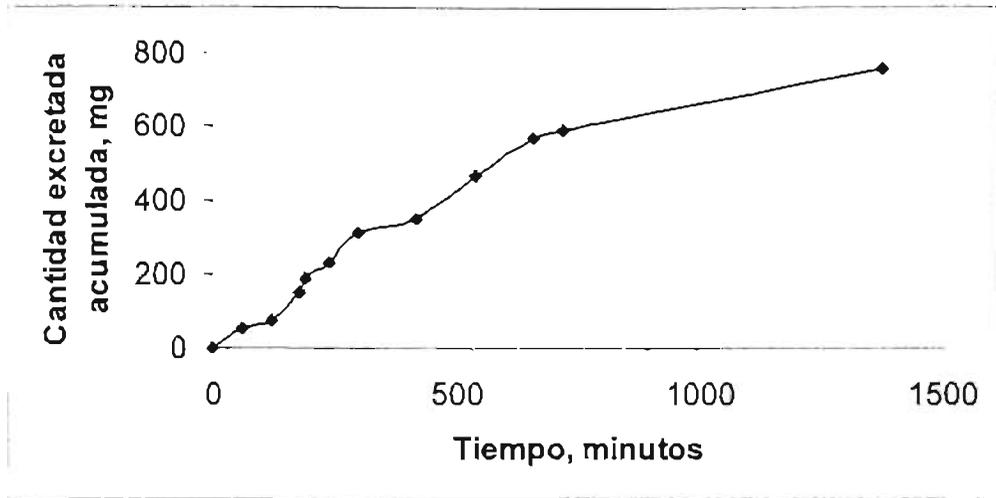


Fig 28. Estudio de Cas IIIa en ratas Wistar con obtención de datos urinarios, dosis bolo intravenosa 9 mg/kg.

Tabla 34. Datos del estudio en ratas Wistar con obtención de datos urinarios según el programa WINNONLIN y analizado por el método de trapezoides lineal.

Vida media de la excreción urinaria (minutos), 11 puntos.	529.5
Ultima cantidad de Cas IIIa en la excreción urinaria ( $\mu\text{g}$ )	759.3
Cantidad infinita predicha ( $\mu\text{g}$ )	997.63
% cantidad infinita predicha	23.88

Al restar el último valor de la curva acumulada, los valores de cantidad en cada intervalo de tiempo se obtienen datos de las cantidades o fracciones de dosis que faltan por excretar, es decir remanentes en el organismo. La gráfica obtenida es una recta cuya inclinación representa la constante de eliminación característica del fármaco. Los datos obtenidos por el método de cantidad remanente fueron:  $\ln Y = -0.0022x + 6.7857$ , Figura 29, lo que indica una constante de eliminación de  $-0.0022 \text{ min}^{-1}$ , cuya vida media es de 346.5 minutos (5.8 h), con una  $r^2 = 0.978$ .

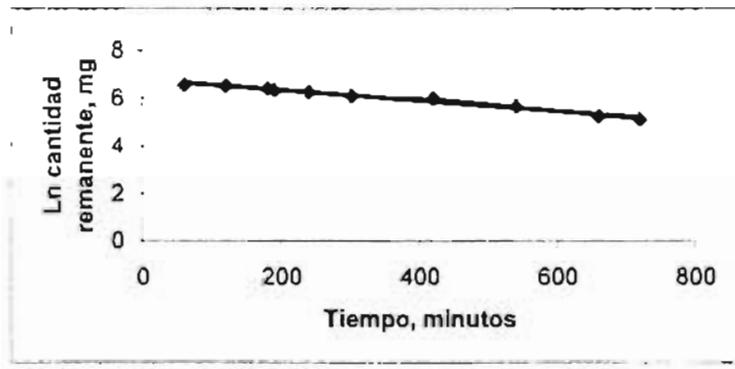


Figura 29. Estudio de Cas IIIa en ratas Wistar, método de cantidad remanente (sigma menos). Dosis bolo intravenosa 9 mg/kg

La cantidad inicial administrada de Cas IIIa a las ratas fue en promedio de 2.57 mg y se encontró una cantidad acumulada en la orina de 759.3  $\mu\text{g}$ , según el método de trapezoides lineal, lo que correspondió a un 29.54%, esto puede indicar que un 70.5% de Cas IIIa aún no ha sido excretado ya sea inalterado o como metabolito a las 23 horas. La vida media por este método fue de 529.5 minutos (8.83 horas), que nos indica que debió recolectarse orina por lo menos durante 63 horas para considerar 7 vidas media donde se asegura el 99.2% de la dosis de Cas IIIa excretada.

5.8 Farmacocinética preliminar en perros beagle con administración de Cas IIIa por infusión iv.

Estos estudios se llevaron a cabo en 2 perros con diferente dosis cada uno, una con 3.0 mg/kg y otra de 9 mg/kg. El estudio se realizó para obtener los tiempos de muestreo adecuados y las dosis más recomendables. Los datos se muestran a continuación.

5.8.1 Administración infusión intravenosa, dosis 3.0 mg/kg, peso del perro 13.6 kg.

La grafica concentración contra tiempo que se obtuvo con las concentraciones sanguíneas al analizarla en el programa WINNONLIN, se muestra en la figura 30, y el modelo al cual se ajustó mejor fue el de dos compartimentos, presentando alta variabilidad y baja correlación.

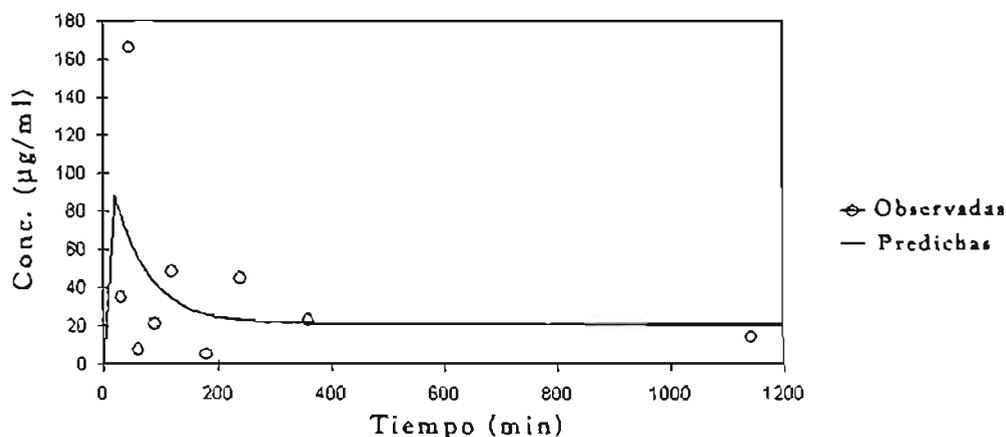


Figura 30. Administración de Cas IIIa en el perro por infusión intravenosa con una dosis de 3 mg/kg

En la gráfica se observa que los datos presentan alta dispersión, por lo cual no se pudo obtener un modelo consistente. Por otra parte, se observa que el compuesto tarda mucho en eliminarse y considerando un modelo no compartimental, se presenta un tiempo medio de

residencia de aproximadamente 2 semanas, una concentración máxima de 166.1 ug/mL a los 45 minutos y un área bajo la curva de 40472.75  $\mu\text{g/mL}\times\text{min}$  en la dosis de 3 mg/kg administrada por infusión intravenosa.

5.8.2 Administración por infusión intravenosa, dosis 9 mg/kg, peso perro 11.6 kg

La gráfica de las concentraciones sanguíneas se muestra en la figura 31, con los datos experimentales crudos

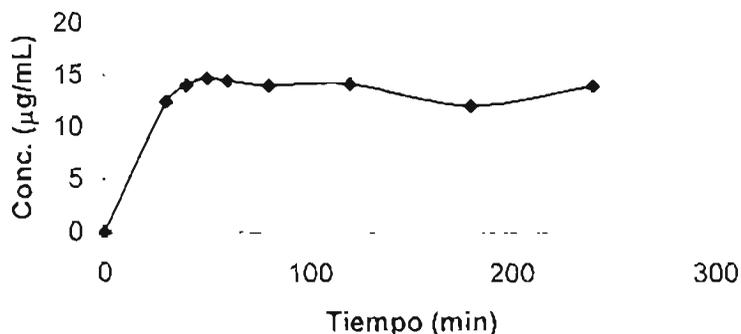


Figura 31. Administración de Cas IIIa por infusión intravenosa al perro beagle, dosis 9 mg/kg.

El análisis con el programa WINNONLIN de los datos experimentales no se observaron adecuados de acuerdo al comportamiento de los datos, ya que se observa que las concentraciones del compuesto llegaron a una meseta y no se observó una eliminación del fármaco en el intervalo de tiempo estudiado.

Se analizaron los datos por análisis no compartimental y se obtuvieron un TMR de 4 días y un área bajo la curva de cero a infinito de 80798.16  $\mu\text{g/mL} \times \text{min}$ .

Después de administrar 3.0 mg/kg de Cas IIIa a perros beagle por infusión intravenosa al analizar los datos no se encontraron interferencias de compuestos endógenos de sangre ni posibles metabolitos de Cas IIIa en la cuantificación de éste.

En la administración de dosis baja (3 mg/kg), los valores de concentración sanguínea y tiempo presentan variabilidad entre las observadas contra las predichas, figura 30. Todos los valores de concentración caen dentro del intervalo de linealidad reportado (5 –50 µg/mL). La forma de la gráfica obtenida muestra una perfusión del fármaco con dos velocidades, una inicial, rápida de muy corta duración y otra mas lenta que se mantiene hasta el fin de la perfusión, Wagner (80) propone como alternativa clínica este tipo de perfusión intravenosa ya que existe menor riesgo de obtener en la fase inicial niveles plasmáticos tóxicos.

En el caso de la administración a perros beagle, con dosis de 9 mg/kg de Cas IIIa por infusión intravenosa, figura 31, sólo se pudieron tomar muestras sanguíneas hasta los 220 minutos porque el perro mostró síntomas de intoxicación y falleció, presentando translocación de líquidos de las venas a pulmón. Esto nos indicó que esta dosis es tóxica en perros. Según el parámetro de TMR que fue de 4 días aproximadamente, lo cual indicó mayor permanencia de Cas IIIa en el organismo con esa dosis. Debido a que se obtuvieron concentraciones sanguíneas alrededor de 14 µg/mL, casi constantes a través del intervalo de muestreo, esto nos puede indicar que la Casiopeína IIIa, pudo haber sufrido un proceso de biotransformación en el perro debido a que ya no se encontraron concentraciones más altas comparadas con la dosis de 3 mg/kg y el metabolito formado pudo haberse distribuido, de tal manera que pudo ser retenido en tejidos más profundos, ocasionando la intoxicación presentada. De los estudios anteriores se puede inferir que se requiere una dosis menor a 9 mg/kg, un intervalo total de muestreo más grande ya que el tiempo medio de residencia del compuesto en el primer perro es de aproximadamente dos semanas, y se requieren por lo menos 5 vidas medias en dosis única para calcular parámetros farmacocinéticas adecuados

con una sola infusión. Debido a que la vida media es muy grande, probablemente sería adecuado el utilizar dosis múltiple de 1.0 mg/kg (la tercera parte de la primera dosis) por 3 días consecutivos, para llegar a lo que se denomina el estado estacionario o de equilibrio y poder determinar en menor tiempo parámetros más confiables. Por otro lado se puede observar que la dosis de 9 mg/kg presentó valores de concentración sanguínea de Cas IIIa bajos (aproximadamente de 14 mg/kg en promedio), lo que nos indica que a mayores dosis no aumentaron las concentraciones del compuesto inalterado y esto puede deberse a que el resto de Cas IIIa pudo presentar biotransformación y distribuirse en los tejidos.

De los parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada una de las especies estudiadas tabla 35, se puede observar que varían según la especie que se haya estudiado.

Tabla 35. Parámetros farmacocinéticos obtenidos en las diferentes especies estudiadas.

Parámetro farmacocinético	Rata	Perro	Conejo*
Dosis	9.0 mg/kg	3.0 mg/kg	9.0 mg/kg
Depuración, Cl	0.45 mL/min		1.46 mL/min
Volumen de distribución	0.462 L		0.0167 L
Tiempo medio de residencia, TMR	17.14 h	2 semanas	86 min
Vida media de eliminación	12.46 h		57 min

\* Reporte de tesis (51)

Estos datos nos indican que de una especie a otra existe variación interespecie lo que puede considerarse y analizarse como una propiedad y consecuencia del peso corporal y los procesos fisiológicos. Se requiere de mayor estudio en estas especies para plantear un escalamiento.

Còn la simple hipótesis de que el escalamiento de todos los parámetros fisiológicos son proporcionales al tamaño del cuerpo o masa corporal. El escalamiento farmacocinético interespecies puede describirse como una operación donde un parámetro farmacocinético de interés se escala a través de diferentes especies de una manera ordenada (el cambio en el parámetro correlaciona con la masa corporal), lo que da origen a ecuaciones alométricas, donde similitudes bioquímicas, fisiológicas y anatómicas entre los animales se pueden generalizar y expresar matemáticamente (81). Estos estudios contribuyen a la caracterización de este compuesto en modelos animales para evaluar su seguridad, complementándose con los estudios de toxicidad y considerar los estudios no clínicos como una pauta para la extrapolación hacia humanos.

---

## VI. Conclusiones

El desarrollo y optimización del método analítico en los diferentes fluidos biológicos (sangre, plasma y orina) fue adecuado para su aplicación en la determinación del porcentaje de unión de la casiopeína III<sub>ia</sub> a proteínas plasmáticas y su cinética de distribución *in vitro*, así como para los primeros estudios farmacocinéticos en rata Wistar y perro beagle, se obtuvieron los primeros parámetros que ayudarán a optimizar la dosificación en los estudios preclínicos en estas especies ya que no se tenía ninguna información antecedente.

La evaluación farmacocinética en ratas reveló que la dosis de 9 mg/kg no es tóxica para esta especie y se obtuvieron parámetros farmacocinéticos que indican una distribución del compuesto en circulación sanguínea, con una vida media de 12.5 h y una excreción de Cas III<sub>ia</sub> inalterada en orina de 30%.

La evaluación farmacocinética en perros reveló que la dosis de 9mg/kg si es tóxica en esta especie y es posible que la casiopeína III<sub>ia</sub> puede presentar metabolismo de acuerdo con los perfiles de concentración sanguínea contra tiempo. La vida media encontrada con una dosis de 3 mg/kg fue de 10 días, y para una dosis de 9 mg/kg fue de 48 días, lo que hace suponer que puede cambiar la cinética al cambio de la dosis.

Los parámetros encontrados en perro, no son concluyentes y varían según la especie animal que se estudie. Se tienen que realizar más estudios en esta especie, para obtener parámetros a dosis menores de 3 mg/kg.

Se cumplieron los objetivos planteados para el compuesto de Casiopeína III-*ia* cuyos resultados servirán para proyectar estos estudios hacia el mejor conocimiento preclínico que aportará datos relevantes para su aplicación y dosificación en la clínica en un futuro.

---

**VII. LISTA DE ABREVIATURAS**

Cas IIIa. Casiopeína IIIa

ND. No detectado

LVF. Leucemia viral felina

C<sub>L</sub>. Concentración de fármaco libre

C<sub>T</sub>. Concentración de fármaco total

C<sub>U</sub>. Concentración de fármaco unido

f<sub>L</sub>. Fracción de fármaco libre

f<sub>U</sub>. Fracción de fármaco unido

F. Fármaco

P. Proteínas

K<sub>a</sub>. Constante de equilibrio de afinidad

K<sub>d</sub>. Constante de equilibrio de disociación

AAG.  $\alpha$ -1-glicoproteína

VLDL. Lipoproteínas de muy baja densidad

LDL. Lipoproteínas de baja densidad

IDL. Lipoproteínas de densidad intermedia

HDL. Lipoproteínas de alta densidad

Cl. Depuración sistémica

V<sub>d</sub>. Volumen de distribución

t<sub>1/2</sub>. Vida media de eliminación del fármaco

ABC<sub>0 - ∞</sub>. Área bajo la curva de perfiles de concentración plasmática o sanguínea contra tiempo de cero a infinito

DMSO. Dimetilsulfóxido

PEG. Polietilenglicol

C<sub>p</sub>. Concentración plasmática o sanguínea del fármaco

k. Constante de velocidad de primer orden

V<sub>c</sub>. Volumen de distribución del compartimento central

V <sub>$\beta$</sub> . Volumen de distribución del compartimento periférico

- $\alpha$ . Fase alfa, fase inicial de distribución del fármaco en un modelo de dos compartimentos con administración intravenosa
- $\beta$ . Fase de eliminación, o fase terminal en un modelo de dos compartimentos con administración intravenosa
- $k_{21}$ ,  $k_{10}$ ,  $k_{12}$ . Microconstantes en un modelo de dos compartimentos con administración intravenosa
- A y B. Interceptos de la gráfica concentración-tiempo en una administración intravenosa en un modelo de dos compartimentos
- R. Velocidad de infusión, orden cero. Unidades cantidad/tiempo
- D. Cantidad de fármaco en el cuerpo después de una administración por infusión intravenosa
- TMR. Tiempo medio de residencia
- TVR. Varianza de la distribución de frecuencias en el tiempo medio de residencia
- $ABCM_{0-\infty}$ . Área bajo la curva del primer momento de cero a infinito
- HeLa. Líneas celulares de carcinoma cervico-uterino humanas
- SiHa. Líneas celulares de carcinoma cervico-uterino humanas
- B<sub>16</sub>. Línea tumoral murina tipo melanoma
- L<sub>1210</sub>. Línea tumoral murina tipo leucemia linfocítica
- LL. Carcinoma de pulmón de Lewis
- S<sub>180</sub>. Línea tumoral murina tipo sarcoma
- %ILS. Porcentaje de supervivencia
- PET. Técnica de tomografía de emisión de positrones
- CLAR. Cromatografía de líquidos de alta resolución

---

**VIII. Bibliografía.**

- [1]. L. Ruiz-Azuara. Procces to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agent. U.S. Patent. April 21 (1992) Number 5, 107, 005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997).
- [2]. L. Ruiz-Azuara. Procces to obtain new mixed copper aminoacidate from methyl phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent. Pat. No. 5,576,326. November 19 (1996).
- [3] ®Mark Tittle: CASIOPEINA. Reg 407543 SECOFI (1992).
- [4]. I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramirez. C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, et al. Knigth's Move in the Periodic Table, from Platinum to Copper. New Anticancer compounds, Casiopeinas, *In vitro* evaluation. *Metal Based Drugs*. 8, (1) 19-28. 2001
- [5] L. Ruiz-Ramírez, I. Gracia-Mora, R. Moreno-Esparza, D. Díaz, L. Gasque, L. Huerta, L. Mayet, C. Lomelí. The antitumor activity of several transition metal complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 43, 2-3, 615. 1991
- [6] I. Gracia, M.E. Bravo, L. Ruiz-Ramirez, M. Tinoco, M.L. Mayet, L. Huerta. New Antineoplastic in vivo Screening of mixed Chelate Copper Coordination Compounds (Casiopeinas) in several murine Tumoral Model, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, (2004) enviado
- [7]. L. Gasque, L. Ruiz-Ramírez, R. Moreno-Esparza. Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10-phenanthroline. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 48 (2) 121. 1992
- [8]. L. Ruiz-Ramírez, L. Gasque, A. Martínez, R. Moreno-Esparza and X. Solans. Copper (II) hydrate mixed chelate complexes, *Acta Crystallographic*, C49, 227. 1993

- [9]. A. Álvarez, J.L. Briansó, J.F. Piniella, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez and G. Ferrer-Sueta. Aqua(glycinato)(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)copper, *Acta Crystallographic*. C51, 852-854. 1995
- [10]. R. Moreno-Esparza, E. Molins, J.L. Briansó, L. Ruiz-Ramírez and L. Redón. Aqua(1,10-phenanthroline)(L-serinato)copper (II) Nitrate, *Acta Crystallographic*. C51, 1505-1508. 1995
- [11]. X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, L. Gasque, A. Martínez, R. Moreno-Esparza. Structures of chloro (glycinato)(1,10-phenanthroline)copper (II) Monohydrate (1) and Aqua (1,10-phenanthroline)(L-phenylalalinato)copper (II) Nitrate Monohydrate, *Acta Crystallographic*. C49 890-893. 1993
- [12]. S. Ferrer, L. Ruiz-Ramírez, R. Radi. Ternary copper complexes and manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid)(porphirin) catalyze peroxyxynitrite-dependent nitration of aromatics, *Journal of Chemical Research in Toxicology* 10, 12, 1338-1344. 1997
- [13] A. Rivero-Müller, N. Plant, L. Ruiz-Ramírez, A. De Vizcaya-Ruiz y M. Dobrota. Degradation of DNA by the Cooper-based Anticancer Agent Casiopeina II, *Human and Experimental Toxicology* 17, 531, 1998
- [14]. I. Fuentes Noriega, L. Ruiz-Ramírez, A. Tovar-Tovar, H. Rico Morales, I. Gracia Mora. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina III-i in rat plasma, *Journal. of Chromatography B.*, 772 (2002) 115-121.
- [15] A. de Vizcaya-Ruiz, A. Rivero- Muller, L. Ruiz-Ramírez, G. E. N. Kass, L.R. Kelland, R. M. Orr and M. Dobrota. Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound-Casiopeina II in L1210 and CH1 cells, *Toxicology in Vitro*. (2000) 14, 1-5

- [16] A. Tovar-Tovar, L. Ruiz Ramírez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosalez-Hoz. Structural and reactivity studies on 4,4-dimethyl-2,2-bipyridine,acethylacetate copper (II) nitrate (Casiopeina III-I) with methionine, by UV-vis and EPR Techniques, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2004) 98,6,1045-1053
- [17] Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Médica Panamericana. 8ava ed. México, 1047-152 (1991).
- [18] H. E. Lessner. Oncología médica. El Manual Moderno. México (1980)
- [19], B.N. La Du. Fundamentals of drug metabolism and drug disposition. Waverly Press, INC. USA (1972) 63-75.
- [20] S. Hellman. The First Century of Cancer Chemotherapy, *Journal of Clinical Oncology* 16, 2295-2296, 1998.
- [21] B. Rossenberg, L. VaCamp, J.E. Trosko, y V.H. Monsour. Platinum compounds. A new class og potent anti-tumor agents, *Nature* 222, 385-386, 1969.
- [22] J. Smith J. y cols. *Biopharmaceutic and Drug Disposition*. 21:285-291, 2000.
- [23] F. Tse. Effect of changes in plasma protein binding on half-life of drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69(6):751-752. 1980.
- [24] H. Kurz. Methodological problems in drug-binding studies. Praeger Publishers, New York 1986. Pp 70-92.
- [25] J. Koch-Weser y E M. Sellers. . Binding of drugs to serum albumin (First of two parts), *The New England Journal of Medicine*. 294(6): 311-316, 1976.
- [26] C.D. Klaassen, J.B. Watkins. Cassarett and Doull's Toxicology: The basic sciences of poissons. McGraw-Hill Companies Inc. 242-284 (1999).
- [27] G.M. Pacific y A. Viani. Methods of determining plasma and tissue binding of drugs, *Clinical Pharmacokinetics*. 23(6):449-468, 1992.

- 
- [28] Swarbrick-Boylan. Encyclopedya of pharmaceutical technology. Vol 13. Ed Dekker, INC. USA. 1996. Pp 151-177
- [29] J.P. Tillelment, F. Lhoste, J.F. Giudicelli. Clinical Pharmacokinetics. 3:144-154, 1978.
- [30] M. Rowland, T. Tozer. Clinical Pharmacokinetics. Concepts and applications. Lea & Febiger. USA. 198. Pp 39, 251-253.
- [31] L. Shargel A. Yu. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 3a ed. Appleton & Lange. Connecticut. 1993. Pp 77
- [32] F.P. Abramson, J. Jenkins y Y. Ostchega. Effects of cancer and its treatments on plasma concentration of alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein and propranolol binding, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 32(5):659-663, 1982.
- [33] J. Barre, F. Didey, F. Delion, y J.P. Tillelment. Problems in therapeutic drug monitoring: Free drug level monitoring. 10:133-143, 1988.
- [34] J.J. Lima, J.J. Mackichan, N. Libertin, J. Sabino. Influence of volume shifts on drug binding during equilibrium dialysis: correction and attenuation, *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 11(5):483-498, 1983
- [35] J. Oravcova, B. Bohs y W. Lindner. Drug Protein binding studies, new trends in analytical and experimental methodology, *Journal of Chromatography B*. 677:1-28, 1996.
- [36] D.J. Edwards, D. Lalka, F. Cerra, y R.L. Slaughter. Alpha<sub>1</sub>- acid glycoprotein concentration and protein binding in trauma, *Clinical of Pharmacology and Therapeutics*. 31(1):62-67, 1982.
- [37] A. Lipton, H.A. Harvey, S. DeLong. Glycoproteins and human cancer, *Cancer* 43(5):1766-1771, 1979.

- 
- [38] P.A. Routledge, D.G. Shand, A. Barchowsky, G. Wagner, y W.W. Stargel. Relationship between alpha<sub>1</sub>- glycoprotein and lidocaine disposition in myocardial infarction, *Clinical of Pharmacology and Therapeutics*. 30(2):154-157, 1981.
- [39] S. Dutta, y cols. Subcellular distribution of Digoxina –H in isolated guinea pigs and rat hearts, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 159:324-334, 1968
- [40] E.H. Charles, Drug Development, 2ª edición, CRC Press INC., Florida, USA., (1990).
- [41] P. Welling, L. Lasagna, V. Banakar. The drug development process. Increasing efficiency and cost effectiveness, Vol. 76, Ed. Marcel Dekker, INC., New York, USA (1996).
- [42] J. Doménech, J. Martínez y J.M. Plá. Biofarmacia y Farmacocinética, Vol I. Editorial Síntesis. 53-115, 1998.
- [43] E.P. Karl. Biopharmaceutical statistic for drug development. Ed. Marcel Dekker, INC., New York, USA. 1988.
- [44] T. Karnes, M. Clark. Precision, accuracy and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis, *Pharmaceutical Research*, No 10, pg 1420-1426. 1993
- [45] T. Karnes, G. Shiu, Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research*, No 4, pg 421-426, 1991.
- [46] V.P. Shad, K.K. Midha, S. Dighe, et al. Analytical methods validation for bioavailability, bioequivalence and pharmaceutical studies, *Journal of Pharmaceutical Science.*, 81(3), 309-312, 1992.
- [47] J.M. Zúñiga y cols. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Mc Graw-Hill. Interamericana. México. 26-27 y 552-555. 2001

- [48] S. H. Kye, G.K. Ion, W. L. Jong y G.L. Myung. Blood partition and protein binding of a new reversible proton pump inhibitor, YH1885, *Biopharmaceutics & drug disposition* 19: 413-415,1998.
- [49] S. Lindskog, P. Nyman. Metal binding properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, *Biochemistry and Biophysica Acta* 86: 462-474 (1964).
- [50] A. Malaz, T. Abu, R. T. David. Simulation of the Pharmacokinetics profile of methazolamide in blood: Effect of erythrocyte carbonic anhydrase binding on drug disposition, *Pharmaceutical Research*. Vol 19, No 4, 2002. p 551-555.
- [51] J. J. Antonio. Farmacocinética de Casiopeína III-i. Estudio preclínico en conejos. Tesis de Maestría en C. Químicas (Biofarmacia). Facultad de Química. UNAM. 2001.
- [52] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramirez, J.A. Howarth, M. Dobrota. Hematotoxicity Response in Rats by the Novel Copper-Based Anticancer Agent: CASIOPEINA II, *Journal of Hematology*, 194, 103-113, 2003
- [53] B. Rossenberg, L. VanCamp, y T. Krigas. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis from a platinum electrode products. *Nature* 205, 698-699, 1965.
- [54] J.A. Howle and G.R. Gale. Cis-dichlorodiamineplatinum (II): Persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis *in vivo*, *Biochemical Pharmacology*, 19, 2757-2762 (1970).
- [55] J.J. Roberts. Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, 79-97. (1974) Springer-Verlag, Heidelberg.
- [56] J. J. Roberts and J. M. Pascoe. Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy, Vol. II, 249-252. Univ. Park Press, Baltimore. (1972).

- 
- [57] P. Lecointe, J. P. Macquet and J. L. Butour. Correlation between the toxicity of platinum drugs to L1210 leukaemia cells and their mutagenic properties *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90, 12, 209-213. 1979
- [58] A.J. Thomson y S. Mansy. Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy, Vol. III, 199-203. Baltimore University Press, Baltimore. 1972.
- [59] C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta and S. A. Slyter. Reactivity of *cis* dichlorodiammineplatinum(II) (cisplatin) toward selected nucleophiles. *Polyhedron*, 1, 201-202.1982
- [60] K. P. Beaumont, C. A. McAuliffe and M. J. Cleare. Platinum complexes of substituted ethylenediamines and their anti-tumour activity *Chemico-Biological Interactions*. 14, 179-193. 1976
- [61] D. F. Long, A. J. Repta and L. A. Sternson. The reactivity of cisplatin in plasma. Implications for handling in pharmacokinetic studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 6, 167-173. 1980
- [62] T. F. Patton, A. J. Repta, L. A. Sternson and R. J. Belt. Pharmacokinetics of intact cisplatin in plasma. Infusion versus bolus dosing. *International Journal of Pharmaceutics*, 10, 77-85. 1982
- [63] E. Cvitkovic. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. *Cancer Treatment Reviews*, 24, 265-281. 1998
- [64] W. W. Alden and A. J. Repta. Exacerbation of cisplatin-induced nephrotoxicity by methionine *Chemico-Biological Interactions*, 48, 121-124. 1984
- [65] C. M. Riley, L. A. Sternson and A. J. Repta. High-performance liquid chromatography of inorganic platinum(II) complexes using solvent-generated anion

---

exchangers: II. The effect of electrolytes on solute retention. *Journal of Chromatography A*, 219, 235-244. 1981

[66] C. M. Riley, L. A. Sternson and A. J. Repta. High-performance liquid chromatography of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) using chemically-bonded and solvent-generated ion exchangers. *Journal of Chromatography*, 217, 405-420. 1981

[67] C. M. Riley, L. A. Sternson and A. J. Repta. Assessment of cisplatin reactivity with peptides and proteins using reverse-phase high-performance liquid chromatography and flameless atomic absorption spectroscopy *Analytical Biochemistry*, 124, 167-179. 1982,

[68] C. M. Riley, L. A. Sternson, A. J. Repta and R. W. Siegler. High-performance liquid chromatography of platinum complexes on solvent generated anion exchangers : III. Application to the analysis of cisplatin in urine using automated column switching, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 229, 373-386. 1982

[69] A.F. LeRoy, R.J. Lutz, R.L. Dedrick, C.L. Litterst y A.M. Guarino. *Cancer, Treatment and Reparation*. 63, 59-71 (1979).

[70] C.W. Welsch. *Proceedings of American Association of cancer research*. 12, 25 (1971).

[71] E. Cvitkovic. Platinum resistance as paradigm of preclinical and clinical conceptual differences. *European Journal of Cancer*. 31, S66. 1995

[72] E.B. Douple, R.C. Richmond y M.E. Logan. *Journal of Clinical, Hematology and Oncology*. 7, 585-603. (1977).

[73] U. Schaeppi, I.A. Herman, R.W. Fleischman, H. Rosenkrantz, V. Ilievski, R.A. Phelan, D.A. Cooney y R.D. Davis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 25, 230-241. (1973).

- 
- [74] M. Marty, F. Lévi, D. Machover, E. Diaz-Rubio, A. de Gramont, C. Garufi, M. Itzhaki, E. Cvitkovic, M. A. Bensmaïne, S. Brienza and J. L. Misset. Oxaliplatin (L-OHP®): summary of results in advanced colorectal cancer (ACC), *European Journal of Cancer*, 31, S154. 1995
- [75] C. Garufi, M. A. Bensmaïne, S. Brienza, J. L. Misset, A. Aschelter, R. Pace, F. Bertheault-Cvitkovic, E. Terzoli and F. Lévi. Addition of oxaliplatin (L-OHP®) to chronomodulated (CM) 5-fluorouracil (5-FU) and folinic acid (FA) for reversal of acquired chemoresistance in patients with advanced colorectal cancer (ACC) *European Journal of Cancer*, 31, S29. 1995
- [76] E.S. Baum. Phase II trial of cisplatin in refractory childhood cancer: Children cancer study group report. *Cancer, Treatment and Reparation*. 65: 815-22. 1981
- [77] P. Terheggen. Formation of retraction products of carboplatin with DNA in vitro and in cancer patients, *British Journal of Cancer*. 63:195-200. 1991
- [78] R.J. Knox. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cisplatin and carboplatin differ only in the kinetics of their interaction with DNA, *Cancer Research*. 46:1972-9. 1986
- [79] S.H. Yalkowsky. Solubility and solubilization in aqueous media. Oxford University Press. American Chemical Society, Washington D.C. 417-431. 1999
- [80] J.G. Wagner. Pharmacokinetics of the Pharmaceutical Scientist. Technomic, Basel, 238-240, 1993.

---

[81] F.G. King, R.L Dedrick, F.F. Farris. Physiological pharmacokinetics modeling of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (DDP) in several species. *Journal of pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 14: 131-55. 1986.

## Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina IIIi<sup>®</sup> in rat plasma

Inés Fuentes-Noriega<sup>a</sup>, Lena Ruiz-Ramírez<sup>b,\*</sup>, Araceli Tovar Tovar<sup>b</sup>,  
Héctor Rico-Morales<sup>c</sup>, Isabel Gracia-Mora<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

<sup>b</sup>Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

<sup>c</sup>Unidad de Experimentación Animal, Edif. E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Received 21 August 2001; received in revised form 4 January 2002; accepted 28 January 2002

### Abstract

A sensitive and specific liquid chromatographic method using extraction with zinc sulfate has been developed for the determination of Casiopeina IIIi and validated over the linear range 5–100 µg/ml in 1 ml of rat plasma. The analysis was performed on a Symmetry C<sub>18</sub> (5 µm) column. The mobile phase was methanol: 0.01 M phosphate buffer pH 6.5 (40/60, v/v). The column effluent was monitored at 262 nm. The results showed that the assay is sensitive at 5 µg/ml. Maximum intra-day coefficient of variation was 10.6%. The recovery obtained in plasma was 87.2%. The method was used to perform protein binding studies by equilibrium dialysis in rat plasma and was found to be satisfactory. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Antineoplastic; Casiopeina IIIi

### 1. Introduction

A series of mixed chelated copper(II) complexes of general formulae Cu(N–N)(O–N)NO<sub>2</sub> or Cu(N–N)(O–O)NO<sub>2</sub> (when N–N=4,7-dph.1,10-phen and O–N=aminoacide (I), N–N=1,10-phen. or 4,7-dm.1,10-phen and O–N=aminoacide (II), N–N=2,2-bipy or 1,10-phen and O–O=acac or salal (III), N–N=4,4-dm.2,2-bipy or 2,2-bipy and O–N=aminoacide (IV), N–N=5R.1,10-phen (R=Me, Cl,

OH, NO<sub>2</sub>) and O–N=aminoacide (V), N–N=5,6-dm.1,10-phen and O–N=aminoacide (VI), N–N=3,4,7,8-dph.1,10-phen or 2,9-dm. 4,7-dph.1,10-phen and O–N=aminoacide (VII), have been registered under the name of CASIOPEINAS<sup>®</sup> [1–3].

These compounds have shown cytotoxic and antineoplastic activity in vitro and in vivo [4–7]; stability constants and structural data have been reported [8–11]. Also, a study of the activity dismutasa superoxide (SOD) of Casiopeinas has been reported [12]. Studies of mechanisms of action are in progress.

Casiopeina IIIi (when N–N=4,4-dm.2,2-bipy, O–

\*Corresponding author. Fax: +52-5-616-2010

E-mail address: lena@servidor.unam.mx (L. Ruiz-Ramírez).

O=acac) is a potentially useful antineoplastic agent [13]. It is very active against L1210 leukemia cells and also kills cells by apoptosis [14], induces a weak recombinogenic action and has the ability to degrade DNA *in vitro* under a range of several cultures [15]. This work was realized as part of a global project for the design and development of antitumor molecules named Casiopeina at the National University of Mexico.

In order to determine the protein binding and the preclinical pharmacokinetics parameters in rats, a sensitive and specific method of assay was needed in order to measure the drug in plasma. This paper describes a rapid, specific, reliable and sensitive analytical method based on reversed-phase liquid chromatography for the quantitation of Casiopeina IIIi. The method was validated according to procedures, and acceptance criteria based on USP XXIII guidelines [16] and recommendations of Shah et al. [17], Bresolle et al. [18] and Braggio et al. [19].

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and reagents

Casiopeina IIIi (Fig. 1) was obtained in our laboratory following the procedure reports in Patents [1,2]. Pooled rat plasma samples were used for the validation method.

Methanol was HPLC grade and other reagents

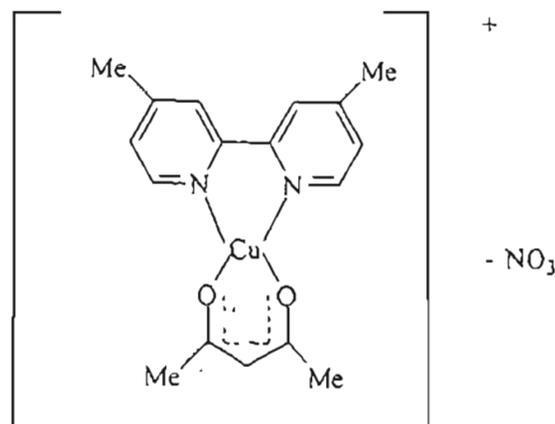


Fig. 1. Chemical structure of Casiopeina IIIi

were analytical grade. Naproxen was used as internal standard, it was added to academic solutions in a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (calibration samples in mobile phase and control rat plasma samples). The relative peak area (drug peak/internal standard peak) was analyzed.

### 2.2. Animals

Male Wistar rats (250–300 g) were kept under clean conventional conditions and had access to food and water *ad libitum*.

### 2.3. Chromatographic conditions

A high performance liquid chromatograph apparatus was used with a Shimadzu pump Model LC10AS (Kyoto, Japan), a Shimadzu variable-wavelength UV absorbance detector (Model SPD10AV), a Shimadzu automatic injector (Model SIL 10A) fitted with a 50- $\mu\text{l}$  sample loop (Corati, CA, USA), a Shimadzu system controller Model SCL 10A (Kyoto, Japan) and an integrator chromatography data station (Shimadzu Class VP Version 5.0, Shimadzu, 1999), a stainless steel analytical column of 250 $\times$ 4.6 mm I.D. (Waters Associates, Millford, MA, USA) packed with Symmetry  $\text{C}_{18}$  (particle size, 5  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase of 0.01 *M* sodium phosphate buffer (pH 6.5)/methanol (60:40) was kept at a flow-rate of 1 ml/min. The analyses were carried out at 20–24  $^{\circ}\text{C}$ . The absorbance at 262 nm was recorded at a sensitivity of 1.0 AUFS (absorbance units full scale) in the programmed parameters. A  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$  precolumn (Security Guard, Phenomenex guard cartridge system) was used.

### 2.4. Sample preparation

To 1 ml of plasma in a 5-ml centrifuge tube was added 0.1 ml of zinc sulfate (10% w/v) [20]. The mixture was shaken for 15 s in a vortex, then 1 ml of mobile phase was added to Naproxen (concentration of 10 mg/l, in the stock solution) followed by vigorous stirring for 15 s, and centrifugation for 10 min at 5000 *g*.

The supernatant was filtered through a green 25-mm syringe filter 0.2  $\mu\text{m}$  (Acrodisc, Gelman Sci-

ences). An aliquot of 250  $\mu$ l was put in the vials and 50  $\mu$ l injected into the HPLC system.

### 2.5. Calibration curves in mobile phase

Casiopeina IIIi (10.0 mg) was diluted in water in a 10-ml volumetric flask, and the required concentrations (5–100  $\mu$ g/ml) were prepared in mobile phase at a dilution of 5.0 ml.

### 2.6. Calibration curves in rat plasma

Casiopeina IIIi (10.0 mg) was diluted in a little water (less than 7% of the total volume), and then diluted to 10 ml in rat plasma in a volumetric flask (1.0 mg/ml); the required concentrations (5–75  $\mu$ g/ml) were prepared in rat plasma at a dilution of 5.0 ml.

### 2.7. Calibration curves in phosphate solution (64 mM, pH 7.4)

Casiopeina IIIi (10.0 mg) was diluted in 10 ml of phosphate solution. The required concentrations (5–50  $\mu$ g/ml) were prepared in phosphate solution at a dilution of 5.0 ml.

### 2.8. Protein binding studies

In a preliminary study, equilibrium dialysis was used to determine protein binding in rat plasma. To avoid problems with equilibrium dialysis equipment with five cells, it was validated before analysis with no adsorption of Casiopeina IIIi at the membrane: it was freely permeable. Shift volume was also analyzed (the water which passed over the buffer to plasma, but the displaced volume is less than 10%) and blank errors (the membranes do not have any soluble impurity which could give some absorption at the analyzed wavelength) [21,22]. Teflon cells and Spectra/Por<sup>®</sup> 2 dialysis membranes were used with molecular mass cut-offs of 12–14 000 Da (Spectrum, USA). Membranes were washed in distilled water for approximately 30 min, another 30 min in methanol, and they were put in phosphate buffer solutions of pH 7.4, one day before use. The equilibrium time was 5 h: to find this time, 1 ml of phosphate buffer solution (64 mM, pH 7.4) was placed in the narrow-

est cell of dialysis equipment and in the wider cell was placed 1 ml of rat plasma with 50  $\mu$ g/ml of Casiopeina IIIi. The concentration in both cells was analyzed several times (0, 30, 60, 90, 180, 250, 320, 400 and 480 min) using the methodology mentioned in Section 2.4 and HPLC (Fig. 2).

Animal plasma samples were prepared from blood taken from the Wistar rat species, plasma was collected from  $\geq 5$  animals and pooled prior to storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  for  $< 1$  month. Plasma (1.0 ml) adjusted to pH 7.4 with carbogen gas (5%  $\text{CO}_2$ , 95%  $\text{O}_2$ ) and spiked with different concentrations of Casiopeina IIIi was dialyzed against an equivalent volume of phosphate buffer (64 mM, pH 7.4) made isotonic with NaCl at  $37^{\circ}\text{C}$  for 5 h, until equilibrium was reached according to a prestudy.

All experiments were carried out in quintuplicate. Three concentrations of Casiopeina IIIi in rat plasma (10, 25 and 50  $\mu$ g/ml) were analyzed and prepared as mentioned in Section 2.6.

After 5 h, the solutions of phosphates and plasma were analyzed by HPLC. The plasma samples of rats were analyzed for total drug concentration using the method described in Section 2.4, phosphate solution samples were filtered by Acrodisc filters and then injected into the HPLC.

Calibration curves in rat plasma, prepared at 5, 10, 25, 50, 75  $\mu$ g/ml of Casiopeina IIIi and calibration curves in phosphate solution prepared as mentioned before, at a concentration of 5, 10, 20, 40 and 50  $\mu$ g/ml of Casiopeina, with the dialyzed samples in plasma and phosphate solution were run at HPLC.

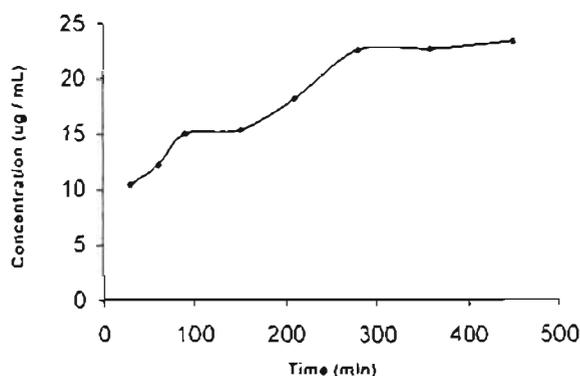


Fig. 2. Equilibrium time for Casiopeina IIIi with the dialysis methodology.

The unbound and bound drug concentration were determined. The unbound fraction ( $f_u$ ) of drug was calculated as the ratio of concentrations between phosphate buffer solution and the total concentration in plasma. It was assumed that albumin is the only protein binding involved

$$f_u (\%) = C_{\text{buffer}} / C_{\text{total}} \times 100$$

$$\text{where } C_{\text{total}} = C_{\text{bound}} + C_{\text{unbound}}$$

### 2.9. Stability studies

For stability studies, control rat plasma and buffer phosphate (64 mM, pH 7.4) solutions were spiked with Casiopeina IIIi at 6 and 37 °C; each determination was carried out in triplicate.

### 2.10. Pharmacokinetics application (rat)

Wistar rats ( $n=18$ ) were administered with a single i.v. dose of 4.5 mg Casiopeina IIIi/kg body wt. in a solution of 1% NaCl. Blood samples were collected at 0, 10, 15, 20, 30, 45, 50, 90 and 120 min postdose. Two rats were bled once per time point.

Plasma was prepared by centrifugation of blood and plasma samples of Casiopeina IIIi were analyzed in 1 ml of rat plasma, described in Section 2.4. Calibration curves (5–100  $\mu\text{g}$  Casiopeina IIIi/ml) were made with the same described extraction methodology and were run with the samples into HPLC.

## 3. Results and discussion

Chromatograms of plasma are shown in Fig. 3. The retention time for Casiopeina IIIi was 5.0 min. No interfering peaks from plasma were detected at the retention time of Casiopeina IIIi. The probable decomposition compounds are 4,4'-dimethyl 2,2'-bipyridin-Cu and acetylacetonate-Cu. This statement was corroborated by an experiment in which the dissociated compounds proposed were analyzed and the retention time found for 4,4'-dimethyl 2,2'-bipyridin-Cu was 2.3 min and the retention time for acetylacetonate-Cu was 6.0 min. These retention times were compared with those obtained in the experiment with the original drug.

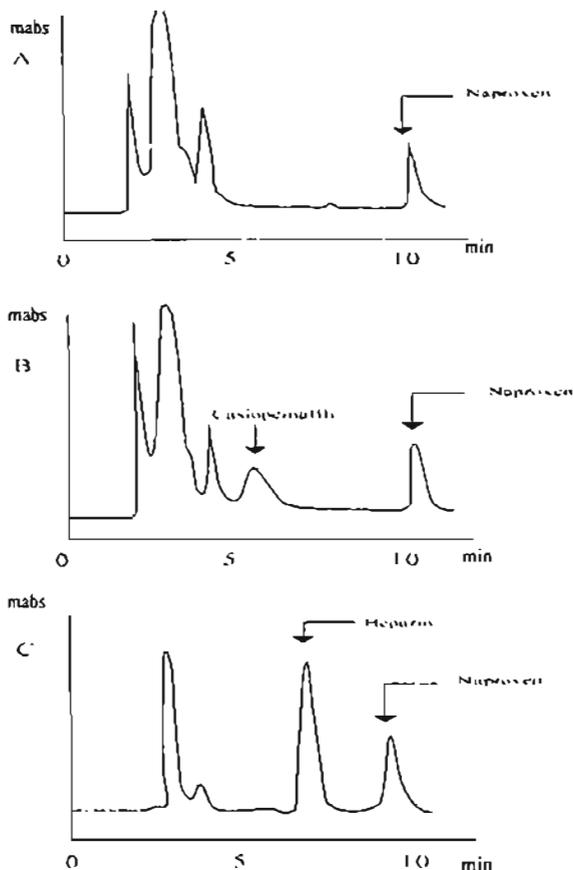


Fig. 3. (A) Chromatogram of blank plasma with internal standard, Naproxen, retention time 10.9 min. (B) Plasma spiked with Casiopeina IIIi (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), retention time 5.0 min. (C) Plasma spiked with heparin (retention time 8.7 min) and Naproxen (internal standard).

A linear relationship ( $r=0.9988$ ) was found when the relative peak area of Casiopeina IIIi was plotted against various concentrations from 5.0 to 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

The intra-assay precision of the validation was estimated from calibration curves in rat plasma (5, 10, 25, 50, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Casiopeina IIIi) prepared separately the same day in triplicate.

The corresponding mean determination coefficient ( $r^2$ ) of the linear regression analysis was 0.9978, and the C.V. was from 1.7 to 9.1%. Inter-day precision was estimated from the calibration curves in rat plasma worked in triplicate on three different days.

Intra-day and inter-day precision of the method,

assessed by analyzing samples with plasma spiked with known amounts of Casiopeina IIIi, are given in Table 1. It can be seen that the maximum within-day coefficient of variation was 10.6% at 5  $\mu\text{g/ml}$ .

The recoveries of Casiopeina IIIi were determined by comparing the relative peak area from plasma spiked with known amounts of the compound (5.0, 10.0, 25.0, 50.0 and 100.0  $\mu\text{g/ml}$ ) using the extraction procedure described versus the relative peak area from the same series prepared in mobile phase and injected into HPLC. Each sample was determined in triplicate. The mean recovery of Casiopeina IIIi in plasma was on average 87.2%. The heparin used as anticoagulant in plasma samples showed a retention time of 8.7 min (Fig. 3C).

The LOQ of 5  $\mu\text{g/ml}$  was defined as the sample

Table 1  
Intra-day and inter-day precision of the HPLC methodology in rat plasma samples

Theoretical concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Experimental concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	C.V. (%)	Recovery (%)
Intra-day ( $n=3$ )			
5	4.20	9.2	84.0
10	8.52	1.7	85.2
25	22.13	1.4	88.5
50	44.50	3.1	89.0
100	85.10	3.9	85.1
			Average recovery 86.36
Inter-day ( $n=6$ )			
5	4.23	10.6	84.6
10	8.76	2.9	87.6
25	22.3	2.6	89.2
50	43.56	2.8	87.1
100	86.43	3.5	86.4
			Average recovery 87.0
Inter-day ( $n=9$ )			
5	4.35	9.3	87.0
10	8.92	4.3	89.2
25	23.12	3.4	92.5
50	43.87	4.7	87.7
100	85.67	2.8	85.7
			Average recovery 88.4
			Total average recovery 87.2

$n$  is the number of samples used in standard deviation.

concentration from spiked rat plasma resulting in the minimum concentration in the validated curve.

The limit of detection (LOD) was defined as the sample concentration resulting in a peak area of three times the noise level. A value of 150 ng/ml was determined.

The stability of Casiopeina IIIi before and after sample pre-treatment was determined. After 48 h at 6 °C, 96% of Casiopeina IIIi was still present in rat plasma. In buffer phosphate solutions, there was 97% Casiopeina IIIi at 37 °C after 24 h and plasma spiked with Casiopeina IIIi at 37 °C was determined to be 97.5% for 24 h.

The precolumn filter was changed after 60 samples and the column was used for 45 samples with Casiopeina IIIi plasma extraction; after this, it needs to be washed with warm water (approximately 100 ml) and methanol/water (1:1) (approximately 100 ml). The life of the column was about 750 injections.

In protein binding studies in rat plasma at concentrations of 50, 25 and 10  $\mu\text{g/ml}$ , a lower percentage (12.9%) was observed at a high concentration (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and a high percentage (83.9 and 77.2%) at 25 and 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 4).

Results showed that protein binding in rat plasma was higher than 80% in concentrations of 25 and 10  $\mu\text{g/ml}$ . More analyses must be carried out by this methodology in order to understand the behavior of Casiopeina IIIi in the presence of several plasma proteins.

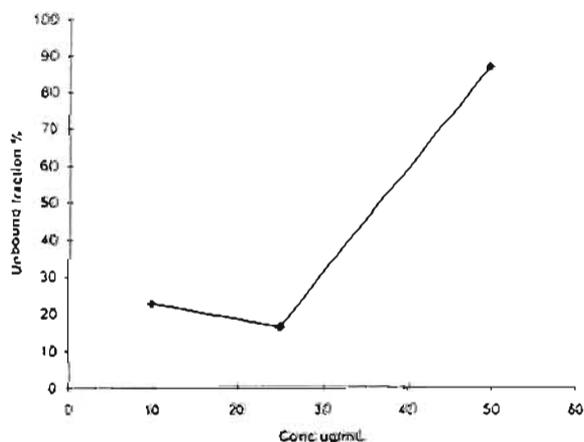


Fig. 4. Preliminary protein binding of Casiopeina IIIi in rat plasma by equilibrium dialysis.

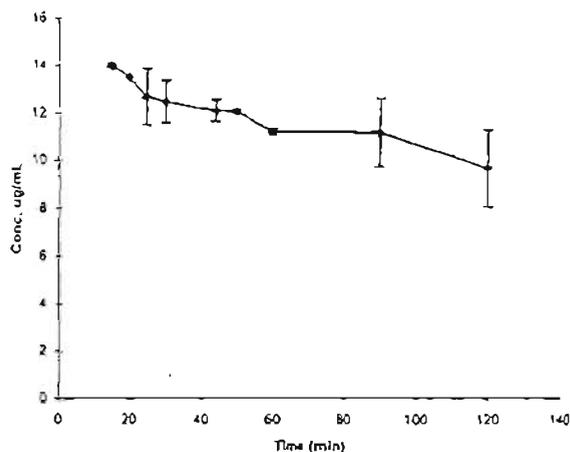


Fig. 5 Pharmacokinetics application of Casiopeina IIIi (Wistar rat), with SD and two determinations per point.

### 3.1. Pharmacokinetic results

No chromatographic interferences from any endogenous compounds were found.

Fig. 5 shows the plasma concentration–time profile of Casiopeina IIIi after the administration of 4.5 mg/kg. Apparently, the concentration  $C_0$ , at zero time, was 13.4  $\mu\text{g/ml}$ , in a two-compartment model obtained by WINNONLIN software, and the beta half-life obtained was 276.1 min. In a preliminary study, the half-life obtained suggests that Casiopeina IIIi is distributed in several organs

## 4. Conclusions

The method developed proved to be useful and reliable for the determination of Casiopeina IIIi in plasma. The pre-treatment procedure for the sample, involving direct precipitation with zinc sulfate, is fast and simple.

The method, validated for concentrations ranging from 5 to 100  $\mu\text{g/ml}$ , had good repeatability and accuracy and low limits of quantification and detection. The recovery of Casiopeina IIIi was good enough, it is reproducible and constant over the entire ranging of the calibration line. This method is sufficiently sensitive to perform protein binding by

equilibrium dialysis and can be applied in future preclinical pharmacokinetic studies.

## Acknowledgements

IFN acknowledge support from DGAPA. This work was financially supported by DGAPA-UNAM (IN 223598 FQ), PADEP 205325 (1997) and CONACYT G35012N.

## References

- [1] L. Ruiz-Azuara, Process to obtain new mixed copper amino-acidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent application serial no. 07/628 843, April 21, 1992; no 5,107,005. U.S. Patent Re 35,458, Feb. 18, 1997.
- [2] L. Ruiz-Azuara, Process to obtain new mixed copper amino-acidate from methyl phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent application serial no. 07/628,628 (1992); Pat. no. 5,576,326, Nov. 19, 1996.
- [3] Mark Tittle: CASIOPEINA, Reg. 407543 SECOFI, 1992.
- [4] P. Ostrosky, R. Montero, N. Hernández, L. Gasque, L. Herrera, L. Ruiz-Ramirez, M. Ruiz, C. Coninas, R. Rodríguez, *Mutagenesis* 11 (1988) 80.
- [5] L. Ruiz-Ramirez, I. Gracia-Mora, R. Moreno-Esparza, D. Díaz, L. Gasque, L. Huerta, L. Mayet, C. Lomeli, *J. Inorg. Biochem.* 43 (2–3) (1991) 615.
- [6] E. García, M. Medina, L. Rojas, L. Ruiz-Ramirez, P. Ostrosky, R. Rodríguez, *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34 (1991) 65.
- [7] L. Ruiz-Ramirez, M.E. De la Rosa, I. Gracia, A. Mendoza, G. Pérez, G. Ferrer-Sueta, M. Breña, P. Gutierrez, E. Pimentel, M. Cruces, A.T. Natarajan, *J. Inorg. Biochem.* 59 (2–3) (1995) 206.
- [8] L. Gasque, L. Ruiz-Ramirez, R. Moreno-Esparza, *J. Inorg. Biochem.* 48 (2) (1992) 12.
- [9] L. Ruiz-Ramirez, L. Gasque, A. Martínez, R. Moreno-Esparza, X. Solans, *Acta Crystallogr.* C49 (1993) 227.
- [10] A. Alvarez, J.L. Briansó, J.F. Piniella, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramirez, G. Ferrer-Sueta, *Acta Crystallogr.* C51 (1995) 852.
- [11] R. Moreno-Esparza, E. Molins, J.L. Briansó, L. Ruiz-Ramirez, R. Redón, *Acta Crystallogr.* C51 (1995) 1505.
- [12] S.G. Ferrer, L. Ruiz-Ramirez, R. Radi, *J. Chem. Res. Toxicol.* 10 (12) (1997) 1338.
- [13] I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramirez, C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez et al., *Metal Based Drugs* 8 (1) (2001) 19.
- [14] A. de Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramirez, G.E.N. Kass, L.R. Kelland, R.M. Orr, M. Dobrota, *Anti-cancer Res.* 18 (1998) 4853.
- [15] 3rd Workshop on Casiopeinas, Chemistry School, UNAM, May 1998.

- [16] United States Pharmacopeia XXIII, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1994, p. 1929.
- [17] V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman, S. Spector, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 309.
- [18] F. Bresolle, M. Bromet-Petit, M. Audran, *J. Chromatogr. B* 686 (1996) 3.
- [19] S. Braggio, R.J. Bamaby, P. Grossi, M. Cugola, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 375.
- [20] S. Lam, G. Malikin, *J. Liquid Chromatogr.* 12 (10) (1989) 1851.
- [21] J. Liuang, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 1368.
- [22] S. Hwang, W. Bayne, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 11 (1984) 483.