



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO PRELIMINAR DE FARMACOCINÉTICA DE  
CASIOPEÍNA III<sub>IIa</sub> (UN NUEVO ANTICANCERÍGENO) EN  
RATAS, A PARTIR DEL ANÁLISIS DE DATOS URINARIOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
ALBERTO ROMERO RAMÍREZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado Asignado:

Presidente            Dra. Inés Fuentes Noriega.

Vocal                M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado.

Secretario           M. en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez.

1er. Suplente        M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz.

2do. Suplente       M. en F. Luís Jesús García Aguirre.

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 112 y 113, Conjunto E

Departamento de Farmacia

Facultad de Química, UNAM

Asesora:            \_\_\_\_\_  
Dra. Inés Fuentes Noriega.

Sustentante:        \_\_\_\_\_  
Alberto Romero Ramírez.

*Dedico este trabajo:*

*A ese obsequio tan preciado, la vida.*

*A mi mamá Virginia E. Ramírez Díaz y a mi papá Roberto Romero López. Gracias por todo su amor, apoyo y confianza. Ambos jugaron un papel muy importante en la culminación de esta etapa de mi vida. Los quiero muchísimo.*

*A mis hermanitas Angélica, Ale y Adri. Gracias por esa gran fraternidad mostrada día a día. Las quiero muchísimo.*

*A la memoria de mis abuelitos: Teresa y Telésforo.*

*A la memoria de mi abuelita Marina. Estoy completamente seguro de que estarían muy contentos de poder leer este trabajo.*

*A mi abuelita Esperanza. Agradezco todo tu cariño, sin duda alguna eres un ejemplo de fortaleza, superación, lucha y amor hacia la vida.*

*A mis abuelitos: Emilia y Alberto. Gracias por todo su cariño, son un modelo de superación, lucha y amor por la vida.*

*A mis tíos. Por compartir conmigo parte de su vida. Sé que siempre podré contar con ustedes. Gracias.*

*A mis primos. Por la amistad que nos une y por esos buenos momentos compartidos.*

*Agradezco:*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México. Esa gran institución de nuestro país, que contribuyó de manera muy importante en mi formación universal. “Mi alma máter”*

*A la Facultad de Química. Que me aportó las herramientas necesarias para crecer profesionalmente dentro del área de la Química.*

*A mis maestros de la Facultad de Química. Que me otorgaron parte de su vida, con la finalidad de poder compartir sus conocimientos y experiencias.*

*A mis compañeros y amigos de la Facultad de Química. Por todos los momentos compartidos dentro y fuera del aula.*

*A la Dra. Inés Fuentes Noriega. Por ese apoyo tan íntegro que me brindó durante la realización de este trabajo, que espero, contribuya en algo a ese gran sueño llamado Casiopeínas.*

*A todos mis compañeros del laboratorio de Biofarmacia. Por esa gran amistad que me han hecho sentir dentro y fuera del laboratorio.*

*A mis compañeros, Julio C. Rivera. y Roberto C. Cañas. Por su gran amistad y el haber compartido conmigo sus experiencias dentro del mundo de la Cromatografía y la Biofarmacia.*

*A ese gran proyecto llamado Casiopeínas.*

*A la Unidad de Experimentación Animal, al laboratorio de Química Inorgánica.*

*A los proyectos:*

*CONACYT SECTORIAL SALUD 2002-C01-7677*

*Facultad de Química 6390-05*

*PAPIIT IN-212100*

*A los M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado y Lauro Misael Del Rivero Ramírez. Por sus valiosos comentarios y observaciones.*

*A la M. en C. María de Lourdes Mayet Cruz y al M. en F. Luís Jesús García Aguirre.*

*A la Dra. Helgi Jung Cook, a los M. en C. Kenneth Rubio C. y Juan Manuel Rodríguez.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1.1 Introducción.....	12-13
1.2 Resumen.....	13-14
1.3 Objetivos.....	15
1.4 Hipótesis.....	15
2.1 Cáncer.....	17-20
2.1.1 Carcinogénesis.....	20-22
2.1.2 Tratamientos contra el cáncer.....	22-23
2.2 Casiopeínas®.....	23-26
2.2.1 Casiopeína Illia.....	26-30
2.3 Estudio preliminar de farmacocinética.....	30-32
2.3.1 Modelos compartimentales.....	32-34
2.3.2 Análisis estadístico enfocado en la comparación farmacocinética....	34-35
2.4 Cromatografía.....	35-37
2.4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	37-39
2.5 Validación de métodos analíticos en fluidos biológicos.....	39-41
3.1 Equipos.....	43
3.2 Material biológico.....	43
3.3 Estándares.....	43
3.4 Reactivos.....	44
3.5 Soluciones.....	44
3.6 Preparación de soluciones.....	44-46

---

3.7 Preparación de las curvas de calibración.....	46
3.8 Método bioanalítico.....	47-48
3.8.1 Condiciones cromatográficas del método analítico utilizado para el estudio de farmacocinética.....	48
3.8.2 Estudio preliminar de farmacocinética.....	49-52
3.8.3 Método cromatográfico directo de Casiopeína IIIa.....	52-53
3.9 Obtención de los parámetros farmacocinéticos a las dosis evaluadas .....	53-54
4.1 Revalidación del método.....	56-59
4.2 Parámetros farmacocinéticos obtenidos a las dos dosis diferentes.....	59-60
4.3 Análisis estadístico enfocado en la comparación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos a ambas dosis.....	60-62
5.1 Método analítico aplicado en la cuantificación de Casiopeína IIIa en orina de rata por CLAR.....	64
5.2 Estudio preliminar de farmacocinética.....	64-71
6.1 Conclusiones .....	73-74
Lista de abreviaturas.....	75
Anexo I.....	76-79
Anexo II.....	80
7.1 Referencias Bibliográficas.....	82-88

---



---

 ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Principales causas de mortalidad en población mexicana, 2005.....	19
Figura 2. Procesos del cáncer.....	20
Figura 3. Estructura de la Casiopeína IIIia.....	27
Figura 4. Clasificación general de la cromatografía.....	37
Figura 5. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	39
Figura 6. Cajas metabólicas con los animales de experimentación durante el estudio.....	50
Figura 7. Etapas del estudio.....	51
Figura 8. Diagrama de flujo del método cromatográfico.....	53
Figura 9. Cromatograma Casiopeína IIIia 100 µg/mL en agua.....	56
Figura 10. Cromatograma Clorhidrato de Ranitidina 100 µg/mL en metanol.....	56
Figura 11. Cromatograma orina blanco de rata macho Wistar.....	57
Figura 12. Cromatograma analito 100 µg/mL y estándar interno 5 µg/mL en orina de rata macho Wistar.....	57
Figura 13. Curva promedio de Casiopeína IIIia en orina de rata macho.....	59
Figura 14. Fórmula utilizada para calcular el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ).....	59
Figura 15. Fórmulas empleadas para poder calcular el valor de t.....	61
Figura 16. Curva acumulada global de Casiopeína IIIia en orina de rata macho, referida a una dosis bolo de 7 mg/Kg.....	66
Figura 17. Curva acumulada global de Casiopeína IIIia en orina de rata macho, referida a una dosis bolo de 9 mg/Kg.....	66
Figura 18. Gráfica para obtener la $K_{el}$ del fármaco en orina de rata, relacionado a una dosis bolo de 7 mg/Kg.....	69

---

Figura 19. Gráfica para obtener la $K_{el}$ del fármaco en orina de rata, relacionado a una dosis bolo de 9 mg/Kg.....	69
Tabla 1. Curva de calibración de Casiopeína IIIa en agua.....	46
Tabla 2. Curva de calibración de Casiopeína IIIa en orina de rata macho.....	46
Tabla 3. Condiciones cromatográficas establecidas para el método bioanalítico.....	47
Tabla 4. Parámetros estadísticos en la validación del método bioanalítico de Casiopeína IIIa por CLAR.....	47
Tabla 5. Relación de la cantidad de Casiopeína IIIa a administrar para cada dosis.....	52
Tabla 6. Linealidad y precisión del método, utilizando como respuesta el área de la Casiopeína IIIa entre el área del estándar interno.....	58
Tabla 7. Linealidad y precisión del método, utilizando como respuesta el área del analito de interés.....	58
Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos obtenidos individualmente, considerando la administración de Casiopeína IIIa en una dosis bolo de 7 mg/Kg.....	60
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos obtenidos individualmente, considerando la administración de Casiopeína IIIa en una dosis bolo de 9 mg/Kg.....	60
Tabla 10. Valores de $t$ obtenidos, asociados con la comparación farmacocinética.....	62

Tabla 11. Datos vinculados con la excreción de Casiopeína IIIa, obtenidos a partir del promedio de las concentraciones de las muestras de orina recolectadas en el intervalo de tiempo correspondiente, referido a una dosis bolo de 7 mg/Kg..... 65

Tabla 12. Datos vinculados con la excreción de Casiopeína IIIa, obtenidos a partir del promedio de las concentraciones de las muestras de orina recolectadas en el intervalo de tiempo correspondiente, referido a una dosis bolo de 9 mg/Kg..... 65

Tabla 13. Datos asociados con el cálculo de la constante de eliminación, relacionados a una dosis bolo de 7 mg/Kg..... 68

Tabla 14. Datos asociados con el cálculo de la constante de eliminación, relacionados a una dosis bolo de 9 mg/Kg..... 68

# Capítulo 1

# Introducción

## 1.1 Introducción.

El cáncer al ser uno de los problemas más fuertes de salud, ha generado el interés en la búsqueda, síntesis y caracterización de nuevos compuestos con actividad antineoplásica.

Por lo que bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara se diseñaron y se sintetizaron en la Facultad de Química, UNAM, un nuevo grupo de compuestos de coordinación, los cuáles tienen en su estructura al elemento cobre (II) como centro metálico, ligantes tipo quelatos diiminas (N-N) y un ligante tipo aminoacidato (N-O) ó acetilacetionato (O-O), conocidos con el nombre de Casiopeínas.<sup>®</sup>

Dichos compuestos se diseñaron tomando como base al *cis*-platino, considerando así que era necesario que fármacos como las Casiopeínas<sup>®</sup> tuvieran un espectro más amplio de actividad antitumoral y que además presentaran menos efectos secundarios adversos, tomando en cuenta que una parte importante dentro del desarrollo de estos nuevos fármacos es la toxicidad tanto en líneas celulares normales como en células cancerígenas.

Hasta el momento se han logrado sintetizar y caracterizar alrededor de 100 compuestos, por lo que ha sido importante el organizarlas en familias de acuerdo a sus diferencias estructurales, mostrándose así cierta diversidad en cuanto a actividad, toxicidad y/o selectividad tumoral.

Casiopeínas<sup>®</sup> de las familias II y III han demostrado tener una mayor actividad citotóxica, citostática tanto *in vivo* como *in vitro*, actividad antineoplásica importante, además de presentar baja toxicidad.

Debido a todo esto se ha generado una gran expectativa para una aplicación clínica, por lo que actualmente se están evaluando dentro de una fase preclínica.

Es importante tomar en cuenta que para poder realizar la cuantificación química de estos fármacos en fluidos biológicos, se requiere contar con un método bioanalítico validado.<sup>1, 2</sup>

## 1.2 Resumen.

Este trabajo consistió en un estudio preliminar de farmacocinética de Casiopeína IIIa en ratas macho Wistar, a partir de su cuantificación en orina por cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando un método analítico previamente validado<sup>3</sup> en nuestro laboratorio.

Para demostrar la confiabilidad del método y del analista fue necesario revalidar algunos parámetros, antes de proceder con la caracterización farmacocinética de la Casiopeína IIIa en orina de rata.

En este estudio se tomaron como modelo experimental dos grupos de 9 ratas macho Wistar, cuyo peso osciló entre 263-419 g, a uno de los dos grupos se le administró Casiopeína IIIa en una dosis bolo de 7 mg/Kg, mientras que al otro grupo se le administró Casiopeína IIIa en una dosis bolo de 9 mg/Kg.

Se recolectaron muestras de orina a diferentes intervalos de tiempo (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 horas), cada muestra recolectada se trató mediante un método cromatográfico directo, esto con la finalidad de realizar la cuantificación del fármaco y finalmente a partir del análisis de datos urinarios el obtener parámetros farmacocinéticos de la Casiopeína IIIa.

De acuerdo a datos referidos a la revalidación, el método bioanalítico presentó un coeficiente de correlación,  $r = 0.997$  en el intervalo de 3  $\mu\text{g/mL}$  a 15  $\mu\text{g/mL}$ .

La ecuación correspondiente a la curva promedio de Casiopeína Illia en orina de rata macho fue  $y = 16190x + 118141$ , con un coeficiente de determinación  $r^2 = 0.995$  y un coeficiente de variación de 12 a 28%.

De manera global, para una dosis bolo de Casiopeína Illia de 7 mg/Kg se obtuvo una constante de eliminación de  $0.044 \text{ h}^{-1}$ , un tiempo de vida media de 15.75 h y una cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito de 1.15 mg.

Tomando en consideración el promedio de los parámetros farmacocinéticos individuales, se obtuvo una constante de eliminación de  $0.059 \text{ h}^{-1}$ , un tiempo de vida media de 13.4 h y una cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito de 0.88 mg.

En lo referente a una dosis bolo de Casiopeína Illia de 9 mg/Kg globalmente se obtuvo una constante de eliminación de  $0.056 \text{ h}^{-1}$ , tiempo de vida media de 12.38 h y una cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito de 1.67 mg.

De acuerdo al promedio de los parámetros farmacocinéticos individuales, se obtuvo una constante de eliminación de  $0.202 \text{ h}^{-1}$ , un tiempo de vida media de 11.52 h y una cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito de 0.63 mg.

### 1.3 Objetivos.

- Determinación de parámetros farmacocinéticos urinarios de la Casiopeína Illia en dos diferentes dosis.
- Evaluación de la farmacocinética a dos dosis diferentes.

### 1.4 Hipótesis.

- La Casiopeína Illia tiene una excreción urinaria como fármaco inalterado mayor al 50%.

# Capítulo 2

# Antecedentes

## 2.1 Cáncer.

El cáncer engloba una serie de enfermedades que tienen diferentes factores de riesgo, localizaciones distintas, cuadros clínicos propios, evolución y pronósticos diversos, pero tienen en común, en mayor o menor grado, una serie de fundamentos biológicos que las distinguen de otros tipos de enfermedades.<sup>4</sup>

Las células cancerosas crecen de forma anormal y descontrolada, situación que es transmitida a células hijas, además tienen la capacidad de difundir tanto a nivel local (invasión), como a distancia (metástasis) dañando de manera importante tejidos y órganos.

El cáncer es el resultado de la falta de control en la reproducción celular en un tejido en el que, previa intervención de factores etiológicos sobre una o varias células, éstas se reproducen sin regulación ni finalidad, de forma autónoma, acompañándose de pérdida de la muerte celular programada (apoptosis).

Las causas del cáncer son fundamentalmente ambientales, donde los agentes etiológicos actúan de manera múltiple y secuencial sobre las células normales, en un proceso que comprende las fases de iniciación y promoción. Los agentes iniciadores determinan la aparición de un gen alterado o una mutación somática, conocida como oncogén.

Los agentes promotores consiguen la expresión de los oncogenes o la inhibición de los antioncogenes. La acción de los oncogenes se manifiesta mediante la liberación de factores de crecimiento celular y consiguiendo así la proliferación de un clon de células no diferenciadas.

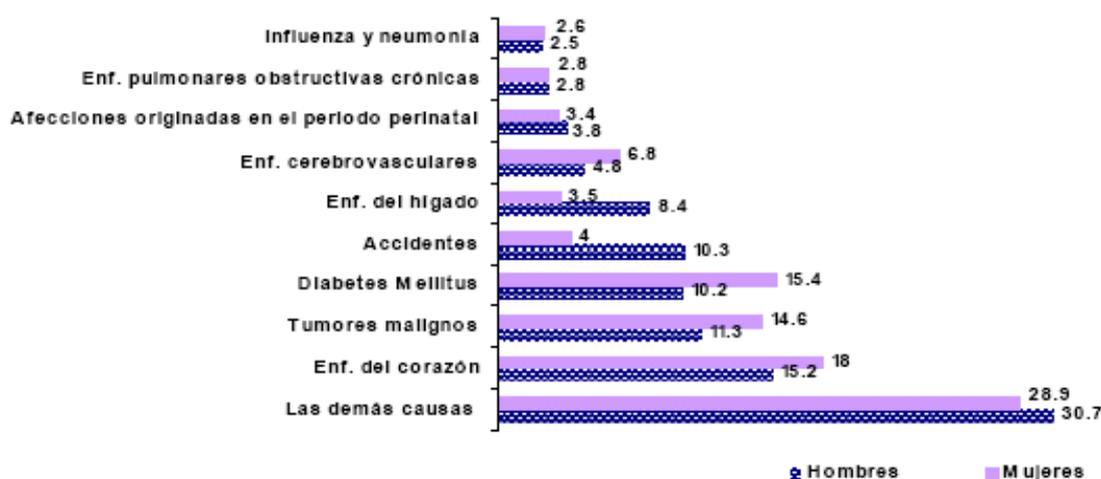
Las células tienen genes normales, protooncogenes, que al mutar dan lugar a los oncogenes, muy probablemente después de presentar exposición a ciertos agentes físicos, químicos o biológicos.

Estos oncogenes se dividen en oncogenes activadores, que son genes que favorecen el crecimiento e invasividad, y oncogenes supresores, cuya misión es frenar la división celular, evitando el crecimiento excesivo. El juego entre los dos controla la velocidad de crecimiento de una célula, así como el aumento de los genes activadores o la disminución de los genes supresores dando lugar al crecimiento incontrolado.

Otros genes que juegan un papel en el desarrollo de un cáncer son los genes reparadores del ácido desoxirribonucleico (ADN), que subsanan los errores en la incorporación de nucleótidos durante la replicación del ADN, serían en este sentido genes supresores.<sup>5</sup>

Cinéticamente, el tumor representa una población celular en expansión, caracterizada por una ausencia o déficit permanente de la sensibilidad al control de la multiplicación o una pérdida de sensibilidad a las órdenes de la apoptosis.

En el 2005, el cáncer representaba la quinta causa de muerte a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS), mientras que en nuestro país de acuerdo al Instituto Nacional de Geografía, Informática y Estadística (INEGI), se situaba dentro de las primeras tres causas de mortalidad (figura 1), que de acuerdo al registro histopatológico de neoplasias malignas, se ha presentado en mayor índice el cáncer cérvico-uterino, cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de próstata.



**Figura 1.** Principales causas de mortalidad en población mexicana, 2005.

La incidencia de cánceres específicos entre poblaciones o entre individuos de distinto sexo o etnia dependerá de algunos factores como:

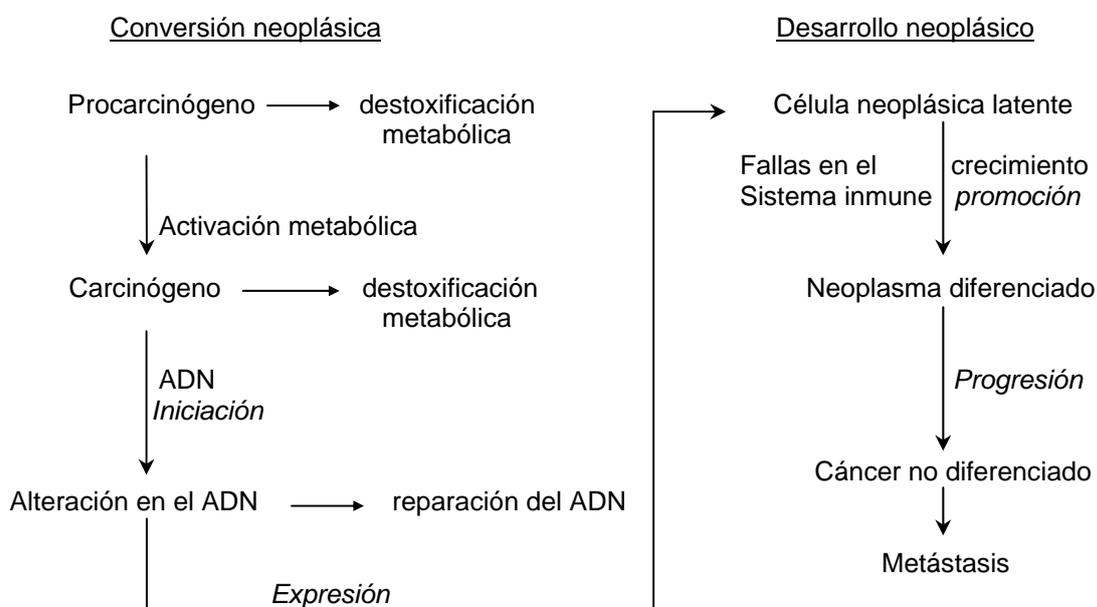
- Edad. En la mayoría de los cánceres en tejido celular, las tasas de incidencia aumentan constantemente a lo largo de la vida. Este aumento se ha interpretado como un efecto acumulativo de la exposición a carcinógenos a lo largo de ella. Hay otros tumores que no siguen tal patrón como el cáncer de testículo y algunos tipos de leucemias, sin embargo es así en tumores de pulmón, colon o mama.
- Sexo. Hay más casos de cáncer en el hombre que en la mujer, esto a consecuencia de hábitos y/o actividades que provoquen una exposición frecuente a agentes carcinogénicos o bien por alguna susceptibilidad ligada al sexo.
- Ambientales. Inducción directa del cáncer por exposición a agentes químicos, físicos, biológicos, hábitos, actividades ocupacionales, etc.

- Variaciones geográficas. La incidencia de algunos tipos de cáncer está uniformemente distribuido por el mundo, mientras que otros muestran grandes diferencias.
- Grupos étnicos. También se observan distintos patrones de distribución dependiendo de la etnia, costumbres, hábitos ya que se observan diferencias en el cáncer de mama entre las mujeres de raza negra, de raza blanca y mujeres de origen hispano.

Algunos otros factores pero no menos importantes son la religión, nivel social, problemas de migración, accidentes.

### 2.1.1 Carcinogénesis.

Se sabe que el cáncer se lleva a cabo en dos tiempos, una es la conversión, mientras que el otro es el desarrollo neoplásico, mismos que a su vez abarcan tres etapas: iniciación, promoción, progresión.<sup>6</sup>



**Figura 2.** Procesos del cáncer.

- Etapa de iniciación. En esta fase el carcinógeno produce una alteración estructural en el ADN que conlleva la activación de un oncogén o la inactivación de un gen supresor. Es un proceso irreversible y con memoria.
  
- Etapa de promoción. Fase que no requiere necesariamente de la exposición al agente carcinogénico pero sí a un segundo agente denominado promotor. Se caracteriza por la expansión de la población iniciada. Es a diferencia de la fase de iniciación un proceso reversible. Parece ser que se desencadena no por acción directa sobre el ADN sino por estímulo de receptores de membrana.
  
- Etapa de progresión tumoral. La neoplasia ya establecida adquiere propiedades que conllevan mayor malignidad, como la capacidad de diseminar a distancia o la resistencia a fármacos, probablemente sea por acumulación de nuevas mutaciones en el ADN.

Los tumores inducidos por sustancias químicas (carcinogénesis química) se caracterizan por presentar rasgos comunes como el aparecer en edades relativamente más tempranas, presentar especificidad de órgano, aparecer tras exposiciones repetidas o prolongadas, en donde su periodo de latencia suele ser largo.

De acuerdo al nivel de actividad, se pueden considerar a los carcinógenos químicos en genotóxicos (interactúan con el ADN) o epigenéticos (facilitan el crecimiento celular e intervienen en la promoción tumoral)

Si hablamos de carcinogénesis física, esto sería provocado por radiaciones ultravioletas o radiaciones ionizantes, este último tipo de radiaciones generaría ruptura de enlaces químicos celulares siendo posible que su efecto se traduzca

en inducción de aberraciones cromosómicas. En este caso el riesgo de desarrollar un tumor va a depender de diversos factores como son la calidad de la radiación, la dosis, factores genéticos, la edad, el sexo.

A la carcinogénesis de tipo biológica se le pudiera atribuir sólo el 5% de todos los cánceres. En donde en términos generales, los virus no son agentes cancerígenos eficaces, debido a que a pesar de que muchas células son infectadas y pueden permanecer en tal estado durante décadas, en pocos casos se ve desarrollado el cáncer.

En contraste con la carcinogénesis química, en la carcinogénesis biológica los virus introducen información a la célula, de hecho el ADN vírico es mantenido por la célula, incluso si no son expresados genes víricos significativos.

### **2.1.2 Tratamientos contra el cáncer.**

Actualmente existen diversos tratamientos contra el cáncer como por ejemplo la quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia, terapia hormonal, entre otros. Siendo la quimioterapia el tratamiento de elección para ciertas afecciones malignas y/o cuando no se ha controlado la enfermedad.

Un problema importante en la quimioterapia es la resistencia que presentan los tumores a fármacos, presentándose tal resistencia en el tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de colon.

Entre los fármacos quimioterapéuticos más empleados está el *cis*-diaminodichloro-platino (II), descubierto por Rosenberg en 1965. Sin embargo algunas de las desventajas que se presentan durante el empleo de este tipo de compuestos es su alta toxicidad, así como su costo. Se han logrado desarrollar algunos análogos como el carboplatino, espiroplatino, oxalapatino cuya toxicidad se ve disminuida pero su costo sigue siendo elevado.

Lo anterior ha marcado el inicio de investigaciones encaminadas a encontrar otras alternativas quimioterapéuticas tomando como base al *cis*-diamino-dicloro-platino (II).

## 2.2 Casiopeínas.<sup>®</sup>

Por lo que bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara se comenzó un proyecto enfocado al desarrollo de un nuevo grupo de fármacos que comprenden a compuestos de carácter inorgánico conocidos con el nombre de Casiopeínas,<sup>®</sup> en cuya estructura tienen al cobre (II) como centro metálico, cuya fórmula general es  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$  ó  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ , presentando en su esfera de coordinación un ligante bidentado del tipo diimina (N-N), además de otro ligante que puede ser aminoacidoato (N-O) o bien donador acetilacetonato o salicilaldehidato (O-O), siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada.<sup>7</sup>

Tales compuestos han demostrado tener actividad citotóxica, citostática tanto *in vivo* como *in vitro* y actividad antineoplásica.<sup>8</sup> Se ha evidenciado que las Casiopeínas<sup>®</sup> inhiben el crecimiento celular *in vitro* en líneas celulares tumorales HeLa (línea celular de adenocarcinoma cérvico-uterino) y CaLo (línea celular de carcinoma epidermoide)<sup>9, 10</sup> mostrando una curva dosis-respuesta similar a la Mitomicina C y al *cis*-platino.

Tomando en cuenta la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) por vía intravenosa, así como estudios de toxicología experimental indican que las Casiopeínas<sup>®</sup> son menos tóxicas<sup>11, 12</sup> a diferencia otros compuestos.

Para que un compuesto de coordinación tenga actividad antineoplásica debe de cumplir con los siguientes postulados:<sup>13, 14, 15</sup>

- ✓ En las reacciones con moléculas biológicas él poder intercambiar rápidamente sólo alguno de sus ligantes.
- ✓ Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de haber intercambiado algún ligante con el organismo.
- ✓ Son necesarios dos ligantes en posición *cis*, ya sea monodentado o uno bidentado como grupos salientes. Los isómeros en posición *trans* son inactivos.
- ✓ Las velocidades de intercambio de estos ligantes le otorgan intervalos específicos de labilidad a cada compuesto.
- ✓ Los ligantes no intercambiables deben estar fuertemente enlazados.

De manera general, en lo referente a la síntesis de las Casiopeínas,<sup>®</sup> se ha considerado la mezcla de cantidades equimolares de dos ligantes y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  para así obtener una mezcla de reacción de color azul intenso, en la mayoría de los casos se evapora a presión reducida y a temperatura controlada.<sup>16</sup>

Obteniéndose un precipitado cuya coloración varía desde un verde oscuro a un azul en diferentes tonalidades según los ligantes. Este producto se somete repetidas veces a recristalización con la finalidad de purificarlo y finalmente se procede a realizar pruebas de caracterización por medio de procedimientos absolutos como Infrarrojo (IR), Ultravioleta (UV), Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE), rayos X.

Como ya se mencionó anteriormente, para la obtención de estos compuestos se ha considerado que el centro metálico sea el cobre, el cuál es un metal de transición ( $[\text{Ar}]4s^13d^{10}$ ) esencial en los sistemas biológicos, por lo que se espera que su toxicidad sea menor, comparado con otros complejos de platino.

Además de acuerdo a las propiedades químicas que presenta el cobre, permite la participación del mismo en procesos fundamentales que involucran la transferencia de electrones asociada a enzimas oxidativas, que su estado de oxidación sea similar al de los metales que se encuentran en los fluidos biológicos.

Tomando en cuenta las características de los compuestos en términos de solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas así como su estabilidad, se busca que el mecanismo de actividad de las Casiopeínas<sup>®</sup> sea por interacción con el ADN. Los ligantes tendrían que tener la capacidad de formar quelatos así como cierto grado de hidrofiliidad e hidrofobicidad.

El diseño fue pensado en que la planaridad en la geometría de la molécula le concediera la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimídicas del ADN, que la molécula adquiriera cierta carga confiriéndole polaridad, para así facilitar su transporte.

Además de que la naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante de diimina son responsables de la variación en cuanto a actividad biológica.

El centro metálico por su parte puede participar en ciclos de óxido-reducción (redox) para así poder liberar Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que oxidan al ADN dando como resultados daños irreparables en su estructura.

Adicionalmente el cobre puede o no intercambiar alguno de sus ligantes, presumiblemente el  $\alpha$ -a.a. o donador (O-O) para coordinarse directamente con los donadores, esto por nitrógenos de las bases, formando enlaces similares a los observados con el *cis*-platino. Finalmente el  $\alpha$ -a.a. o donador (O-O) se

proponen como responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por tanto en la selectividad tumoral de la molécula.

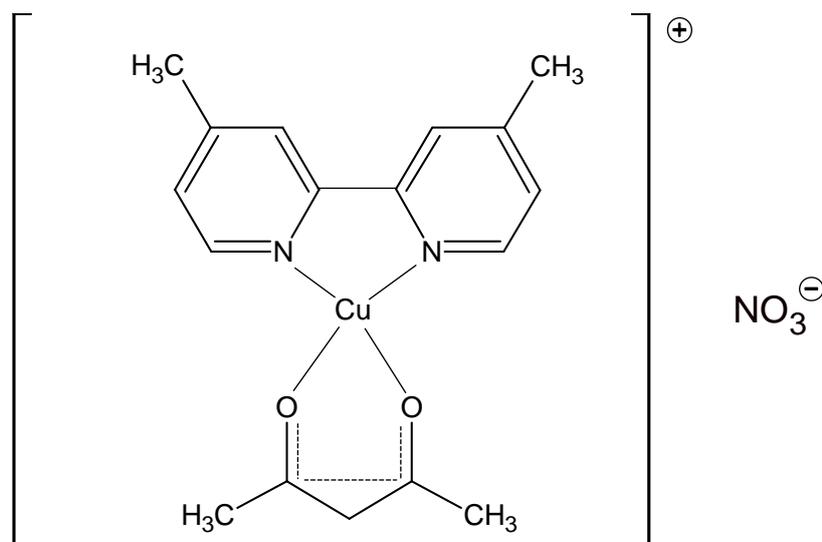
La razón para la búsqueda de nuevos compuestos está basada en el deseo por encontrar características como:

- ✓ Ausencia de resistencia cruzada al *cis*-platino.
- ✓ Un espectro más amplio de actividad, particularmente dentro de áreas clínicas donde el *cis*-platino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
- ✓ Mayor efectividad clínica antitumoral, así como disminución de efectos secundarios.
- ✓ Sinergismo en terapias combinadas.<sup>17</sup>

### 2.2.1 Casiopeína IIIa.

De la gran línea de Casiopeínas que hasta el momento han sido sintetizadas y caracterizadas, algunas Casiopeínas<sup>®</sup> tanto de la familia II como de la familia III han demostrado tener una mayor actividad antineoplásica, pero sobre todo, han presentado baja toxicidad.

El compuesto que se consideró para el desarrollo de este trabajo fue la Casiopeína IIIa,  $\text{Cu}[(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-bipiridina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ , polvo azul cristalino, cuyo peso molecular es de 408.71 g/mol, su fórmula condensada es  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{CuN}_2\text{O}_2 \cdot \text{NO}_3$ ; pKa de 8.25; coeficiente de partición de 0.01364<sup>18</sup>. En su estructura se presenta un ligante bidentado donador de oxígenos y un ligante bidentado donador de nitrógenos, presentando una geometría cuadrado plano.



**Figura 3.** Estructura de la Casiopeína IIIa.

Tal compuesto ha demostrado tener ligera genotoxicidad en linfocitos humanos *in vitro*,<sup>19</sup> actividad citostática, citotóxica *in vivo como in vitro*, actividad antineoplásica sobre líneas de carcinoma cérvico-uterino HeLa, SiHa (carcinoma de células escamosas de cérvix).<sup>20, 21</sup>

Aunque todavía no se tiene bien esclarecido el mecanismo de acción de la Casiopeína IIIa, se cree que es capaz de inducir muerte en células HeLa mediante mecanismos de apoptosis a diferencia de otras Casiopeínas<sup>®</sup> en donde la muerte celular se debe principalmente a mecanismos de necrosis o bien a ambos mecanismos.<sup>22</sup>

Aunque aún no se sabe como actúa el metabolismo sobre este tipo de fármacos, existen algunas evidencias de que las Casiopeínas<sup>®</sup> son activadas por algunas enzimas.

Por lo que se ha demostrado que los linfocitos humanos de sangre periférica cuentan en su conformación con algunas estructuras de la familia del citocromo P-450, involucrado en el metabolismo de xenobióticos.<sup>23</sup>

Por otro lado, se han realizado gracias a diversos estudios relacionados con la Casiopeína IIIa, los cuáles han arrojado la siguiente información:

### 1. Solubilidad.

La solubilidad de la Casiopeína IIIa a temperatura ambiente (19-22°C) es buena en los siguientes disolventes, presentando una disolución mayor en agua>metanol>etanol>solución salina al 9%>solución de fosfatos 64 mM.

### 2. Estabilidad.

El espectro obtenido en cada una de las disoluciones no presentó variación.

Presenta inestabilidad a la luz.

Se descompone a pH muy ácido (pH = 2) o a pH muy básico ( pH>8)

Bajo condiciones de congelación y protegida de la luz, la Casiopeína IIIa es estable en plasma humano y en sangre por 72 horas, en orina por 24 horas, en metanol por 96 horas y en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM a pH 7.4 es estable por un lapso de 10 días.

A temperatura ambiente y protegida de la luz, la Casiopeína IIIa es estable en metanol por 24 horas, en solución amortiguadora de fosfatos 64 mM, pH 7.4 a 37°C y protegida de la luz es estable por 24 horas.

En solución acuosa bajo refrigeración durante 16 días sólo tuvo un 3.8% de degradación.<sup>24</sup>

### 3. Toxicidad.

DL<sub>50</sub> en rata macho Wistar es de 14.36 mg/Kg por vía intraperitoneal y 5.51 mg/Kg por vía intravenosa.

DL<sub>90</sub> en rata macho Wistar es de 15.44 mg/Kg por vía intraperitoneal, y de 7.73 mg/Kg por vía intravenosa.<sup>25</sup>

Su toxicidad está regida aparentemente por el donador (N-N) así como por los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante.<sup>14</sup> Interacciona con el DNA superenrollado y lineal,<sup>26</sup> aunque la familia III de las Casiopeínas<sup>®</sup> presenta una menor intensidad de interacción a diferencia de otras Casiopeínas<sup>®</sup> de la familia I, II.<sup>27, 28</sup>

#### 4. Mecanismo de acción.

Ha demostrado ser un agente altamente recombinante con la línea celular SPD8, por lo cual su mecanismo de acción pudiera ser por inhibición de las topoisomerasas I y II. Induce acción recombinogénica débil en *Drosophila*.<sup>29</sup> Hay evidencia de que dicha molécula actúa como inhibidor de la fosforilación oxidativa.<sup>30</sup>

#### 5. Farmacocinética

Estudio de farmacocinética de Casiopeína IIIa en conejos, cuyo peso estuvo entre 2.5-5.0 Kg, dosis de 9 mg/Kg por infusión intravenosa.<sup>31</sup>

Depuración, CI = 1.46 mL/min.

Volumen de distribución, Vd = 0.0167 L.

Tiempo medio de residencia, TMR = 86 min.

Vida media de eliminación,  $t_{1/2}$  = 57 min.

Farmacocinética de Casiopeína IIIa en 3 ratas Wistar, cuyo peso osciló entre 250-300 g, dosis bolo de 9 mg/Kg por vía intravenosa.

Área bajo la curva, ABC = 22.27 mg/mL\*min.

Concentración máxima, Cmax = 157.37 µg/mL.

Depuración, CI = 0.45 mL/min.

Volumen de distribución, Vd = 0.462 L.

Tiempo medio de residencia, TMR = 17.14 h.

Vida media de eliminación,  $t_{1/2}$  = 12.46 h.

Estudio de farmacocinética de Casiopeína Illia en perros raza beagle, pesando entre 11.6-13.6 Kg, dosis de 3 mg/Kg y 9 mg/Kg por infusión intravenosa.<sup>3</sup>

*Dosis de 3 mg/Kg*

Área bajo la curva, ABC = 40.47 mg/mL\*min.

Concentración máxima, C<sub>max</sub> = 166.1 µg/mL.

Tiempo medio de residencia, TMR = 2 semanas.

*Dosis de 9 mg/Kg*

Área bajo la curva, ABC = 80.79 mg/mL\*min.

Concentración máxima, C<sub>max</sub> = 14.0 µg/mL.

Tiempo medio de residencia, TMR = 4 días.

## 6. Farmacodinamia.

Tiene propiedades citostáticas y antineoplásicas en modelos tumorales murinos.<sup>33</sup> Es notablemente activa contra la leucemia linfoide LI210. Además en gatos tratados se observó que la Casiopeína Illia cuenta con la capacidad de revertir a condiciones normales parámetros sanguíneos.<sup>34</sup>

### 2.3 Estudio preliminar de farmacocinética.<sup>35</sup>

La farmacocinética podría definirse como el estudio y caracterización de la evolución temporal de los fármacos y de sus metabolitos en el organismo, a través del análisis cinético de las curvas de concentración vs. tiempo o cantidad vs. tiempo, obtenidos a partir de muestras de fluidos biológicos.

La evolución temporal de un fármaco en el organismo humano o animal pasa por una serie de procesos: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción.

- Liberación. Tomando como ejemplo la administración por vía oral, la liberación es la primera etapa que sufre el principio activo, finalizando

con la disolución del mismo, que en el caso de la administración de un fármaco en solución, tal paso no existe.

- Absorción. La absorción es un proceso mediante el cuál las moléculas del fármaco alcanzan la circulación sanguínea, dicha etapa no existe en el caso de la administración parenteral intravenosa, aunque sí cuando se trata de una administración parenteral extravasal, como la intramuscular o la subcutánea.
- Distribución. Mediante esta etapa se llega a un estado de equilibrio. El tiempo necesario para que se logre dicho equilibrio es muy variable para los distintos fármacos.
- Eliminación. Desde el momento en que el fármaco llega a la circulación sanguínea, y al mismo tiempo en que se va dando la distribución, tiene lugar la eliminación del fármaco, que puede ser mediante metabolismo (biotransformación metabólica) y/o excreción como fármaco inalterado por orina y/o bilis mayoritariamente.

Como se indicó anteriormente el metabolismo y la excreción constituyen la eliminación. Por otra parte, la distribución y la eliminación componen, en su conjunto, la disposición del fármaco.

El estudio del LADME puede ser abordado mediante dos tipos de datos: concentraciones plasmáticas y/o cantidades excretadas de fármaco inalterado en orina, obtenidas a distintos tiempos tras su administración.

De la representación de tales datos frente al tiempo, se obtendrían las curvas de nivel plasmático o las curvas de excreción urinaria.

Las curvas de excreción urinaria pueden presentarse a través de dos formas: como curvas distributivas o como curvas acumulativas. En las curvas distributivas, se representa la velocidad de excreción, que se refiere a la cantidad de fármaco o fracción de la dosis por unidad de tiempo, mientras que en las curvas acumulativas se representan las cantidades acumuladas de fármaco excretado frente al tiempo, sumando a cada valor los obtenidos en las determinaciones anteriores.

### 2.3.1 Modelos compartimentales.<sup>36</sup>

Son una de las herramientas más utilizada en farmacocinética, son de extrema utilidad en la consecución de una de las metas de la terapéutica: por ejemplo la estimación de las dosis, pautas de dosificación más adecuadas para cada medicamento, mejor vía de administración, etc.

Un compartimento representa una fracción del material biológico en el que el fármaco se supone uniformemente distribuido y en el que presenta las mismas propiedades cinéticas. Un compartimento viene definido por sectores acuosos que ocupan un volumen determinado ( $V_d$ ) y que contiene una cantidad determinada de fármaco ( $Q$ ). Por tanto la concentración de fármaco ( $C$ ) en el compartimento vendrá dada por el cociente entre  $Q$  y  $V_d$  ( $C = Q/V_d$ ).

El modelo monocompartimental considera al organismo como un compartimento único de carácter fundamentalmente acuoso. Así tras una administración intravenosa rápida, se asume que las moléculas del fármaco sufrirán una distribución instantánea y uniforme en aquellas zonas del organismo a las que el fármaco en cuestión accede.

El único proceso que se considera sufre el fármaco es el de la eliminación. Por dicho motivo y conceptualmente, para cualquier unidad de tiempo, el fármaco

se halla uniformemente distribuido y se elimina desde el principio de acuerdo con un proceso cinético de primer orden.

El modelo monocompartimental, tras la administración intravenosa rápida (bolus) del fármaco, se caracteriza por la cantidad,  $Q$ , de éste en el compartimento (la cual varía a lo largo del tiempo), por el volumen acuoso en el que se distribuye,  $V_d$ , que se considera constante, y por la constante de velocidad de primer orden que rige el único proceso que sufre el fármaco, es decir, su eliminación del organismo,  $K_{el}$ , aunque la información acerca de la permanencia o fugacidad del fármaco en el organismo se estima con mayor facilidad a partir de un parámetro relacionado, denominado “semivida biológica”,  $t_{1/2}$ . La semivida se define como el tiempo en que una determinada concentración del fármaco se reduce a la mitad de su valor.

Algunas consideraciones para realizar estudios de excreción urinaria son:<sup>37</sup>

- ✓ El fármaco se debe eliminar por vía renal en proporción de cuando menos 50% en forma intacta.
- ✓ Se debe vaciar la vejiga antes de la administración del fármaco y guardar muestra de orina que servirá como blanco de análisis.
- ✓ Se debe administrar una cantidad suficiente de agua para provocar diuresis y poder obtener un número suficiente de muestras de orina durante las primeras horas.
- ✓ Para cada muestra es necesario anotar el lapso a partir del vaciado anterior y la cantidad total de orina eliminada.
- ✓ El fármaco no debe unirse a proteínas plasmáticas y su vía de excreción debe ser solamente por filtración glomerular.
- ✓ Se asume que la fracción de fármaco excretado en orina es constante.
- ✓ La orina debe colectarse por un periodo de tiempo tal en el que se asegure que todo el fármaco intacto haya sido excretado (cuando menos  $7 t_{1/2} = 99.2\%$  ó bien  $10 t_{1/2} = 99.9\%$ ).

El proceso de excreción urinaria de un fármaco se caracteriza por una cinética de orden uno; por lo tanto, es posible establecer que la velocidad con que el principio activo inalterado aparece en el fluido urinario, es proporcional a la cantidad de fármaco que existe en el organismo (y esta cantidad a su vez, está directamente relacionada con la concentración plasmática del mismo).<sup>38</sup>

Es importante que antes de probar nuevas moléculas con potencial farmacológico en seres humanos, se deban realizar pruebas farmacodinámicas, farmacocinéticas, de biodisponibilidad en modelos animales, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos se podría dilucidar con un razonable margen de seguridad el escenario que se presentaría al llevar a cabo estudios clínicos.

### **2.3.2 Análisis estadístico enfocado en la comparación farmacocinética.**

Muy a menudo, en la práctica, se tienen que tomar decisiones estadísticas sobre poblaciones, partiendo de la información muestral de las mismas, por lo que para llegar a tomar decisiones, es importante plantear determinados supuestos acerca de las poblaciones que se estudian. Tales supuestos pueden ser o no ciertos, conocidos como hipótesis estadísticas, estableciendo una hipótesis nula ( $H_0$ ) y una alternativa de la hipótesis nula ( $H_1$ ).

Los procedimientos que facilitan el decidir si una hipótesis se acepta o se rechaza o el determinar si las muestras observadas difieren significativamente de los resultados esperados, se llaman ensayos de hipótesis.

Si se rechaza una hipótesis cuando debería ser aceptada o si se acepta esta cuando debería ser rechazada, cometiéndose así un error al tomar una decisión equivocada.

La probabilidad máxima con la que en el ensayo de una hipótesis se puede cometer un error se conoce como nivel de significancia ( $\alpha$ ). Se acostumbra utilizar niveles de significancia del 0.05 ó 0.01. Si por ejemplo se elige un nivel de significancia del 0.05 ó 5% al diseñar una hipótesis, entonces habría aproximadamente 5 ocasiones en 100 en la que se rechazaría la hipótesis cuando debería ser aceptada, es decir, se está con un 95% de confianza de que se toma la decisión adecuada.

El número de grados de libertad, denotado por  $\nu$ , se define como el número (N) de observaciones independientes en la muestra (es decir, el tamaño de la muestra) menos el número (k) de los parámetros poblacionales, que tiene que ser estimado a partir de observaciones muestrales.<sup>39</sup>

#### **2.4 Cromatografía.**

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen entre dos fases, una es la fase estacionaria y otra es la fase móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la muestra es selectivamente retenido por la fase estacionaria.<sup>40</sup>

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. Dicha fase puede ser extendida como una capa o bien distribuida como una película.

De acuerdo a la naturaleza de la fase móvil, si esta es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa, de sus siglas en inglés (GC) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC).

A este último grupo pertenecen la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía líquida en columna abierta y la cromatografía líquida de alta

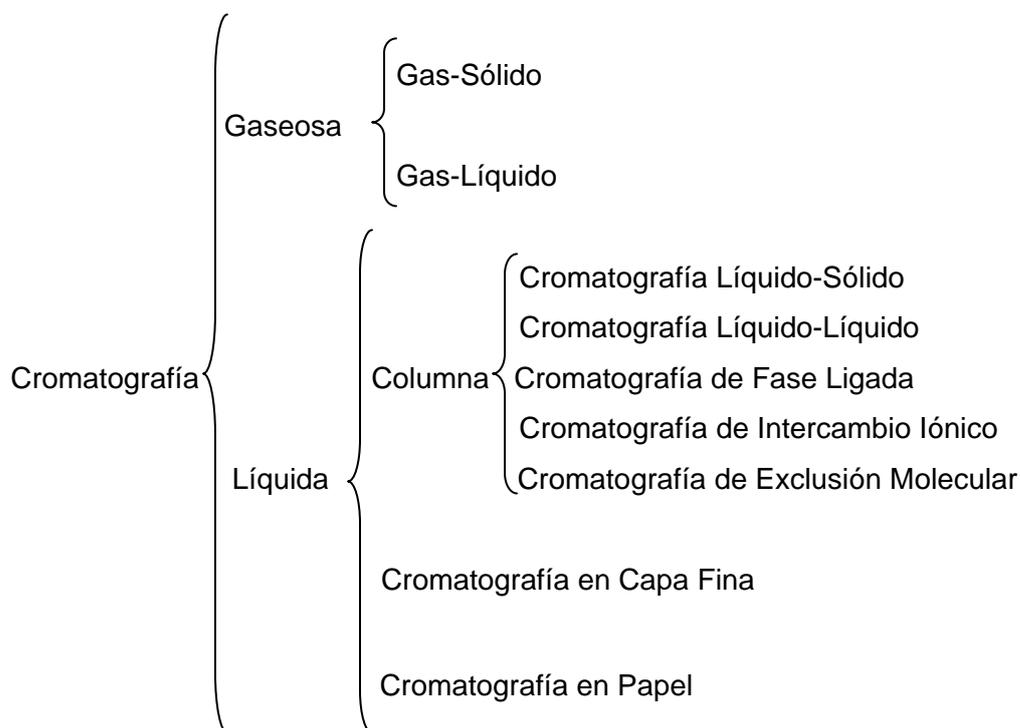
resolución (HPLC). A pesar de las diferencias existentes entre las distintas modalidades, los principios que gobiernan la separación son los mismos en todos los casos.

Si la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido la cromatografía sería denominada cromatografía líquido-sólido (LSC) o de adsorción. Análogamente existirá la modalidad de la cromatografía líquido-líquido (LLC) o de partición, en gas-líquido (GLC) ó gas-sólido (GSC).

Tomando en cuenta el fenómeno que ocurre dentro de la columna, la cromatografía puede clasificarse en cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC).

Entre las primeras se encuentran la cromatografía en fase normal, en fase ligada (BPC) y la de intercambio iónico (IEC). Entre las segundas se encuentran la cromatografía de filtración por gel (GFC) y cromatografía de permeación por gel (GPC).

En las modalidades de afinidad, el analito interactúa directa o indirectamente, a través del disolvente, con la fase estacionaria, mientras que en las separaciones por tamaño molecular no existe (al menos de manera teórica) ninguna interacción con la fase estacionaria.<sup>41</sup>



**Figura 4.** Clasificación general de la cromatografía.

### 2.4.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución.

El notorio avance que ha experimentado cada punto medular implicado en la separación de los componentes de una muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil, ha propiciado el origen de la cromatografía de líquidos de alta resolución, siendo esta una de las herramientas más empleadas por su gran aplicación, debido a que se pueden separar mezclas muy complejas, compuestos termolábiles, compuestos de variado peso molecular.

Básicamente los componentes de un equipo cromatográfico son los siguientes:

- Bombas: Las bombas en cromatografía de líquidos de alta resolución se encargan de impulsar la fase móvil proveniente del reservorio del disolvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna.

- Inyectores: El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal del disolvente a través del sistema.
  
- Columna: En ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio.
  
- Detectores: El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y así ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Dentro de los detectores más utilizados en cromatografía se encuentran los detectores de arreglo de diodos, detectores de longitud de onda variable, detectores de longitud de onda múltiple, detectores de fluorescencia, de índice de refracción.
  
- Sistema de toma y procesamiento de datos: El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, el de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos.



Figura 5. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

## 2.5 Validación de métodos analíticos en fluidos biológicos.<sup>42</sup>

La validación de un método analítico es un proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. La validación proporciona la confirmación documental de que los resultados obtenidos por medio del método son confiables.

Especificidad. Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Linealidad. Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

**Precisión.** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea. Se realiza como repetibilidad y/o como reproducibilidad.

**Repetibilidad.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

**Reproducibilidad.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

**Exactitud.** Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

**Límite de detección.** Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Límite de cuantificación.** Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Estabilidad.** Se determinan condiciones como temperatura, tiempo en la que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica durante su manejo, almacenamiento y procesamiento.

**Tolerancia.** Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser equipos, columnas. Por lo que tolerancia y

robustez se refieren a la influencia de factores externos e internos al método respectivamente.

Recuperación absoluta. Se refiere a la eficiencia de un método analítico para cuantificar él o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Revalidación. Algunos parámetros que se estarían evaluando serían: linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, claro que cualquier cambio crítico que se dé en el método analítico, da lugar a uno nuevo y por lo tanto requiere de una validación como tal.

Como por ejemplo, algún cambio en los equipos y/o proveedores de columnas generan impacto en la variación del método, por lo que los parámetros a revalidar serían tolerancia, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación.

# Capítulo 3

# Parte experimental

### 3.1 Equipos.

- i. Balanza analítica estándar Ohaus, modelo AS200.
- ii. Balanza analítica Sartorius, modelo A210P.
- iii. Desionizador de agua Millipore Milli-Q Water System, 0.22  $\mu\text{m}$ .
- iv. Equipo de filtración Millipore, con membranas tipo HB ó HA de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- v. Vórtex Thermolyne, modelo M16715.
- vi. Centrífuga Eppendorf, modelo 5416.
- vii. Centrífuga Micromax RF Thermo IEC.
- viii. Potenciómetro Thermo Orion, modelo 410.
- ix. Baño de ultrasonido Fisher-scientific FS60.
- x. Baño de ultrasonido Transsonic 700/H.
- xi. Columna Hypersil Elite C18, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ .
- xii. Precolumna security guard Phenomenex C18, 50 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ .
- xiii. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu, el cual consta de los siguientes módulos:

Bomba, modelo LC-10ADVP.

Autoinyector, modelo SIL-10ADVP.

Detector UV-VIS, modelo SPD-10AVP.

System Controller (integrador), modelo SCL-10AVP.

Computadora DELL Optiplex Gxa, con software Shimadzu CLASS-VP 5.0

Impresora Cannon, modelo LBP 3200.

### 3.2 Material biológico.

- i. Ratas macho Wistar, peso promedio 263-419 g, Harlan Fac. de Química.

### 3.3 Estándares.

- i. Casiopeína IIIia, lote 33MRG050402.
- ii. Casiopeína IIIia, lote 173MBG300305.
- iii. Clorhidrato de Ranitidina, lote RH1032001254, laboratorio IVAX.

### 3.4 Reactivos.

- i. Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) grado HPLC, TecnoLAB.
- ii. Fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) grado R A, J. T. Baker, lote K15460.
- iii. Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) grado R A, J. T. Baker, lote H05461.
- iv. Hexansulfonato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NaO}_3\text{S}$ ) grado HPLC, lote P135-27-2 Registro Technology INC. , Lote 041K54412 SigmaUltra.
- v. Agua grado HPLC.
- vi. Solución reguladora (biftalato) pH 4, lote A35C15 grado R A, J. T. Baker.
- vii. Solución reguladora (fosfatos) pH 7, lote A35C06 grado R A, J. T. Baker.
- viii. Solución reguladora (boratos) pH 10, lote A10C31 grado R A, J. T. Baker.

### 3.5 Soluciones.

- i. Solución amortiguadora de Fosfatos 0.01 M, pH 6.7
- ii. Solución de Hexansulfonato de Sodio 0.005 M.
- iii. Solución patrón de Casiopeína IIIia en agua 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- iv. Solución patrón de Casiopeína IIIia en orina de rata 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- v. Solución patrón de Casiopeína IIIia en orina de rata 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- vi. Solución patrón de Clorhidrato de Ranitidina en metanol 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- vii. Solución patrón de Clorhidrato de Ranitidina en metanol 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- viii. Casiopeína IIIia en solución salina fisiológica 6  $\text{mg}/\text{mL}$ .

### 3.6 Preparación de soluciones.

- i. Solución amortiguadora de Fosfatos 0.01 M, pH 6.7

Pesar 0.4230 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 0.6920 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, transferir cuantitativamente a un

matraz volumétrico de 500 mL, disolver con agua desionizada, llevar a un volumen aproximado de 480 mL, ajustar el pH y aforar con agua. Filtrar al vacío dos veces la solución por medio de una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

ii. Solución de Hexansulfonato de Sodio 0.005 M.

Pesar 0.0940 g de Hexansulfonato de Sodio, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con agua desionizada y llevar a volumen. Filtrar al vacío dos veces la solución por medio de una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

iii. Solución patrón de Casiopeína IIIa en agua 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Pesar con exactitud 0.0100 g, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con agua desionizada.

iv. Solución patrón de Casiopeína IIIa en orina de rata 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Pesar con exactitud 0.0100 g, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver en la mínima cantidad de agua desionizada y aforar con orina de rata.

v. Solución patrón de Casiopeína IIIa en orina de rata 500  $\mu\text{g/mL}$ .

De la solución patrón de Casiopeína IIIa en orina de rata 1000  $\mu\text{g/mL}$ , tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con orina de rata.

vi. Solución patrón de Clorhidrato de Ranitidina en metanol 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Pesar con exactitud 0.0050 g de Clorhidrato de Ranitidina, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y aforar con metanol.

vii. Solución patrón de Clorhidrato de Ranitidina en metanol 5 µg/mL.

De la solución patrón de Clorhidrato de Ranitidina 500 µg/mL, tomar una alícuota de 1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con metanol.

viii. Casiopeína IIIa en solución salina fisiológica 6 mg/mL.

Pesar con exactitud 0.0300 g de Casiopeína IIIa, transferir a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver y aforar con solución salina fisiológica.

### 3.7 Preparación de las curvas de calibración.

**Tabla 1.** Curva de calibración de Casiopeína IIIa en agua.

Concentración inicial Casiopeína IIIa (µg/mL)	Alícuota a tomar (µL) de la solución patrón de Casiopeína IIIa (solución iii)	Volumen final de la solución (mL)	Volumen a tomar de la solución (mL)	Adición de estándar interno (figura 8) (mL)	Concentración final Casiopeína IIIa (µg/mL)
6	60	10	1	1	3
10	100	10	1	1	5
14	140	10	1	1	7
20	200	10	1	1	10
30	300	10	1	1	15

**Tabla 2.** Curva de calibración de Casiopeína IIIa en orina de rata macho.

Concentración inicial Casiopeína IIIa (µg/mL)	Alícuota a tomar de la solución patrón de Casiopeína IIIa	Volumen final de orina (mL)	Adición de estándar interno (figura 8) (mL)	Concentración final Casiopeína IIIa (µg/mL)
6	12 µL (solución v)	1	1	3
10	20 µL (solución v)	1	1	5
14	28 µL (solución v)	1	1	7
20	20 µL (solución iv)	1	1	10
30	30 µL (solución iv)	1	1	15

### 3.8 Método bioanalítico.

La cuantificación de la Casiopeína Illia se realizó empleando un método bioanalítico previamente validado<sup>43</sup>, cuyas condiciones cromatográficas se describen en la tabla 3 y los resultados de validación se muestran en la tabla 4.

**Tabla 3.** Condiciones cromatográficas establecidas para el método bioanalítico.

Fase estacionaria	Columna Hypersil Elite C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm.
Fase móvil	Solución amortiguadora de Fosfatos (0.01 M pH 6.7)/ Metanol/Hexansulfonato de Sodio (0.005 M) en una proporción 65:30:5 v/v/v.
Flujo	0.8 mL/min.
Longitud de onda	274 nm.
Estándar interno	Clorhidrato de Ranitidina 5 µg/mL.
Volumen a inyectar	50 µL.
Tiempo de corrida	13 minutos.
Precolumna	Security guard Phenomenex C18, 50 x 4.6 mm, 5µm.

**Tabla 4.** Parámetros estadísticos en la validación del método bioanalítico de Casiopeína Illia por CLAR.

Parámetro de validación	Sistema	Método
Linealidad r	0.998	0.998 (3 - 15 µg/mL)
Precisión	<2%CV	0.95 - 2.19%CV
Precisión y exactitud		
Repetibilidad (Día 1)		1.28 - 7.03%CV <15% DEA
Reproducibilidad (Día2)		3.82 - 4.89%CV <15% DEA
%Recuperación		92.52 - 101.83%
Límite de detección		2 µg/mL
Límite de cuantificación		3 µg/mL 2.1%CV 0.33%DEA
Estabilidad a temperatura ambiente		<15% DEA después de 12h y 24h
Estabilidad a ciclos de congelación-descongelación		2 ciclos 6.81-29.7% DEA
Tolerancia a cambio de columna		<15% DEA
Tolerancia a cambio de longitud de onda		>15% DEA

Dado que este método bioanalítico fue previamente validado y que las condiciones cromatográficas y equipos son los mismos a excepción del analista, se decidió realizar la revalidación de algunos parámetros como linealidad, repetibilidad.

### **3.8.1 Condiciones cromatográficas del método analítico utilizado para el estudio de farmacocinética.**

- Columna: Hypersil Elite C18, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m.
  
- Fase móvil: Solución amortiguadora de Fosfatos (0.01 M pH 6.7)/ Metanol/Hexansulfonato de Sodio (0.005 M) en una proporción 65:30:5 v/v/v.
  
- Flujo: 0.8 mL/min.
  
- Longitud de onda: 274 nm.
  
- Estándar interno: Clorhidrato de Ranitidina 5  $\mu$ g/mL.
  
- Volumen a inyectar: 50  $\mu$ L.
  
- Tiempo de corrida: 13 minutos.
  
- Precolumna: Security guard Phenomenex C18, 50 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m.

### 3.8.2 Estudio preliminar de farmacocinética.

➤ Diseño experimental.

Se emplearon como modelo experimental dos grupos de 9 ratas Wistar macho, cuyo peso osciló entre los 263-419 g, (proporcionadas por laboratorios Harlan, Fac. de Química).

A un grupo de ratas se le administró una dosis bolo de Casiopeína IIIia de 7 mg/Kg y al segundo grupo en otro día, se le administró una dosis bolo de Casiopeína IIIia de 9 mg/Kg (ver tabla 5).

Antes de la administración del fármaco a cada uno de los animales de experimentación se les sometió a un periodo de ayuno de 8 horas, con agua *ad libitum*. Después se recolectó la cantidad de orina acumulada durante tal periodo de tiempo, que además de servir como blanco sirvió para poder preparar la curva de calibración.

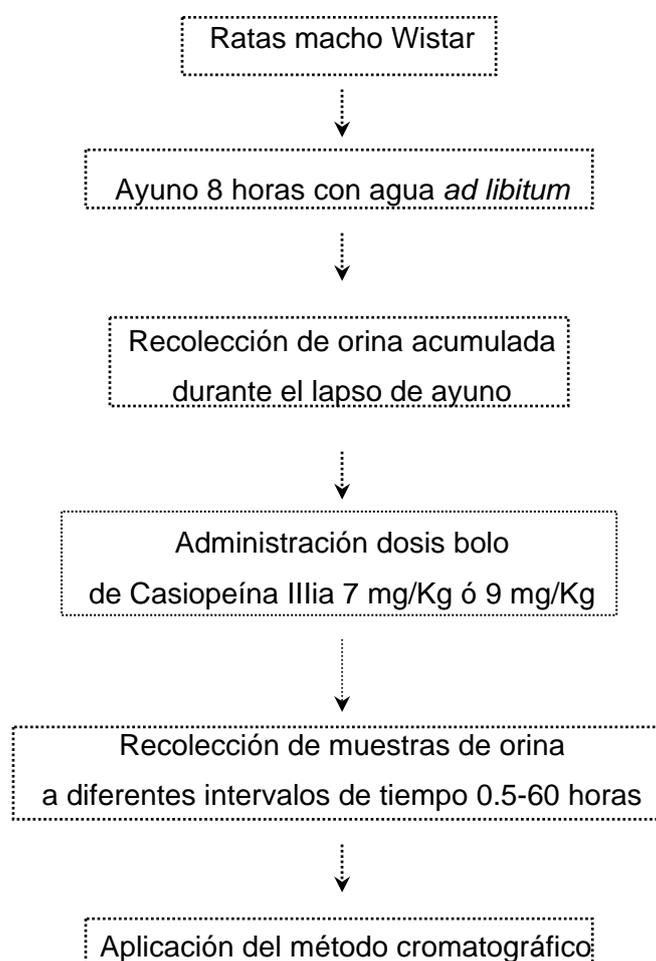
Posteriormente se llevó a cabo la administración de Casiopeína IIIia tomando en consideración el peso de cada una de las ratas y la dosis (tabla 5).

Se recolectaron muestras de orina a diferentes intervalos de tiempo (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 horas), las cuáles fueron almacenadas en refrigeración hasta su análisis.



**Figura 6.** Cajas metabólicas con los animales de experimentación durante el estudio.

Las muestras fueron recolectadas a cada intervalo de tiempo, tomando 1 mL de muestra de orina, para después someterla al método cromatográfico directo de Casiopeína Illia (figura 8).



**Figura 7.** Etapas del estudio.

A continuación se cita en la siguiente tabla la cantidad de Casiopeína IIIa administrada a cada una de las ratas de acuerdo su peso para cada una de las dos dosis.

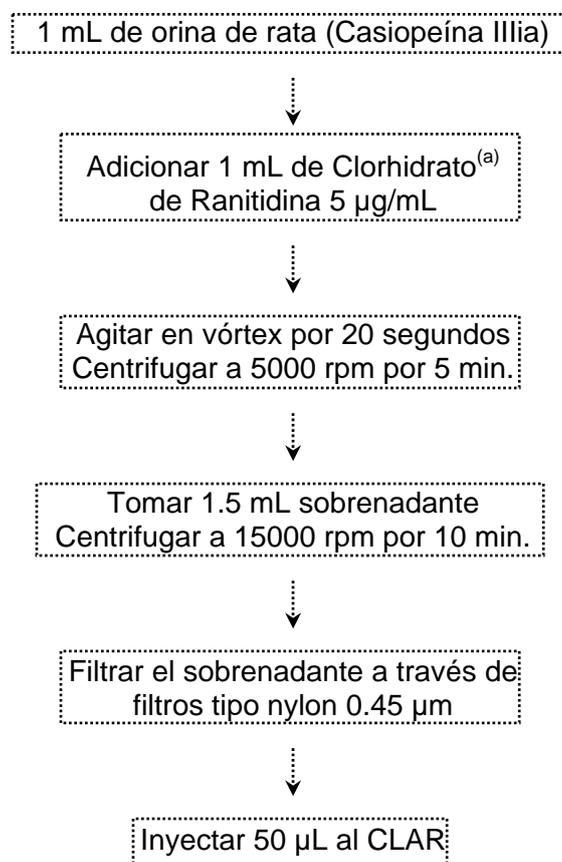
**Tabla 5.** Relación de la cantidad de Casiopeína IIIa a administrar para cada dosis.

Rata	Peso (g)	Volumen administrado de Casiopeína IIIa 6 mg/mL (mL)	Cantidad administrada de Casiopeína IIIa (mg)
10	367.6	0.42	2.52
11	391.3	0.46	2.76
12	366.4	0.42	2.52
13	385.7	0.44	2.64
14	361.5	0.42	2.52
15	341.2	0.40	2.40
16	385.4	0.44	2.64
17	371.4	0.44	2.64
18	392.5	0.46	2.76
Promedio	373.7	0.44	2.60
Rata	Peso (g)	Volumen administrado de Casiopeína IIIa 6 mg/mL (mL)	Cantidad administrada de Casiopeína IIIa (mg)
1	336.7	0.50	3.00
2	381.1	0.58	3.48
3	263.6	0.40	2.40
4	364.4	0.54	3.24
5	350.6	0.52	3.12
6	376.6	0.56	3.36
7	361.5	0.54	3.24
8	295.3	0.44	2.64
9	418.2	0.62	3.72
Promedio	349.8	0.50	3.13

■ Dosis 7 mg/Kg    □ Dosis 9 mg/Kg

### 3.8.3 Método cromatográfico directo de Casiopeína IIIa.

Se siguió el siguiente método para cada punto de la curva de Casiopeína IIIa en orina de rata (tabla 2) así como para cada muestra obtenida a cada intervalo de tiempo durante el estudio preclínico.



**Figura 8.** Diagrama de flujo del método cromatográfico.<sup>44</sup> (a) La concentración final de las muestras se diluye en una proporción 1:2, ver tabla 2.

### 3.9 Obtención de los parámetros farmacocinéticos a las dosis evaluadas.

La orina acumulada y recolectada antes de llevar a cabo la administración del fármaco, sirvió para la preparación del blanco y para la preparación de la curva de calibración, en la cual se interpolaron los valores asociados a la respuesta cromatográfica proveniente del analito (Casiopéina IIIa) y así poder obtener la concentración de fármaco en el fluido biológico a los distintos intervalos de tiempo (0.5-60 horas).

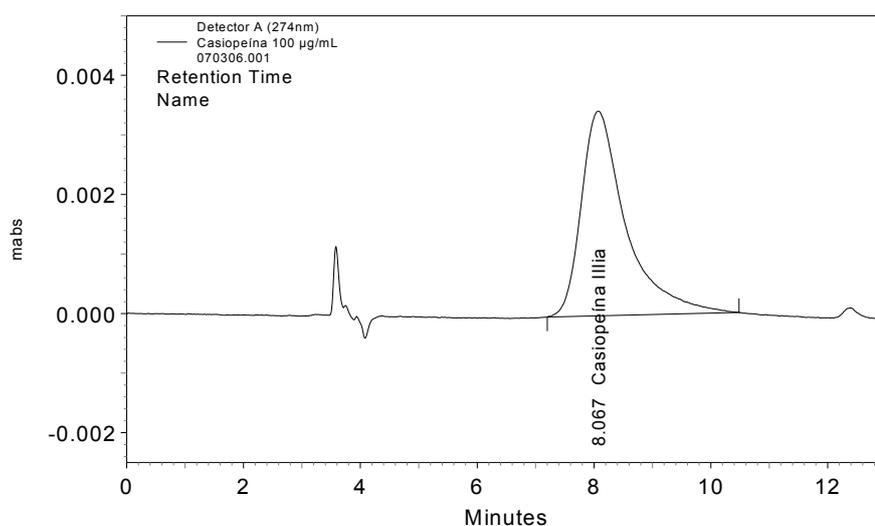
Se determinaron parámetros farmacocinéticos tanto de manera global como de manera individual de la cantidad de Casiopeína IIIa excretada a tiempo infinito, la constante de eliminación, y el tiempo de vida media.

# Capítulo 4

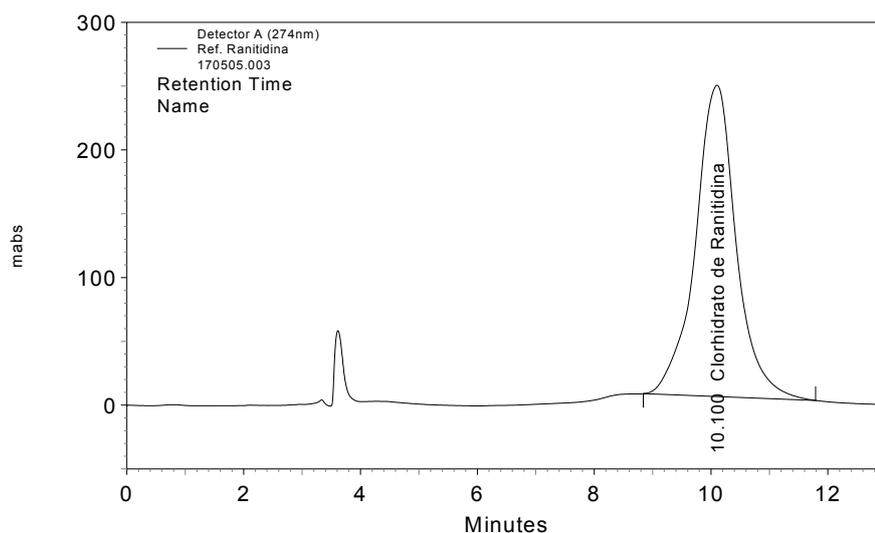
# Resultados

#### 4.1 Revalidación del método.

Especificidad. En las siguientes figuras se presentan cromatogramas en donde se observa la resolución cromatográfica tanto del analito de interés como del estándar interno en sistema, con  $t_R$  de 8.067 y 10.100 minutos y en orina de rata macho Wistar, con  $t_R$  de 8.717 y 11.642 minutos.



**Figura 9.** Cromatograma Casiopeína IIIia 100 µg/mL en agua.



**Figura 10.** Cromatograma Clorhidrato de Ranitidina 100 µg/mL en metanol.

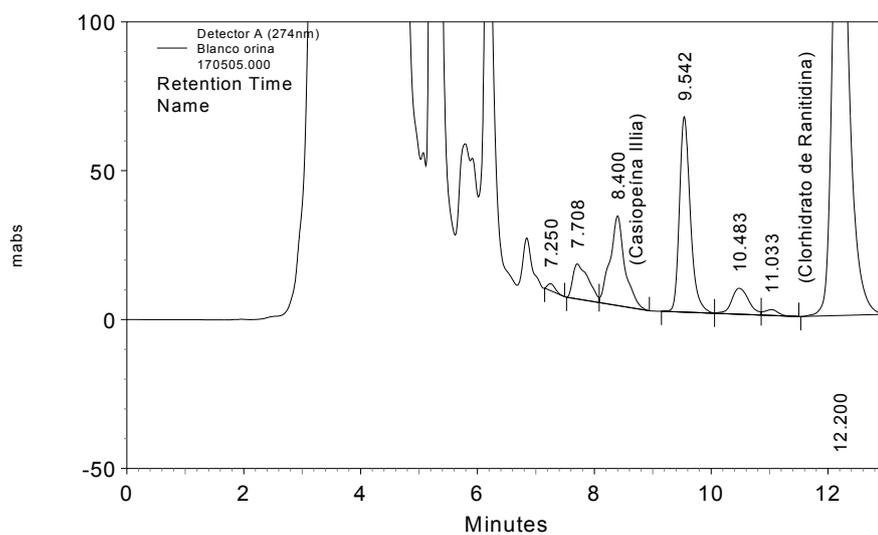


Figura 11. Cromatograma orina blanco de rata macho Wistar.

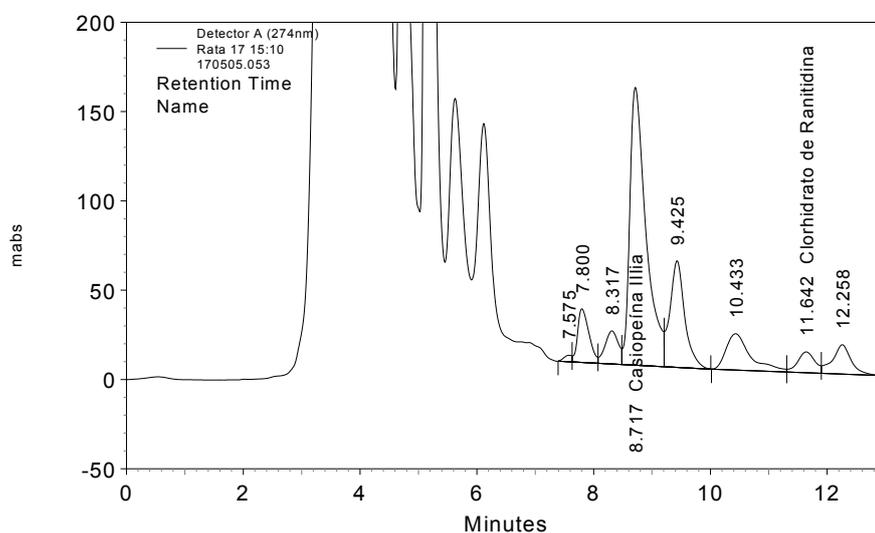


Figura 12. Cromatograma analito 100 µg/mL y estándar interno 5 µg/mL en orina de rata macho Wistar.

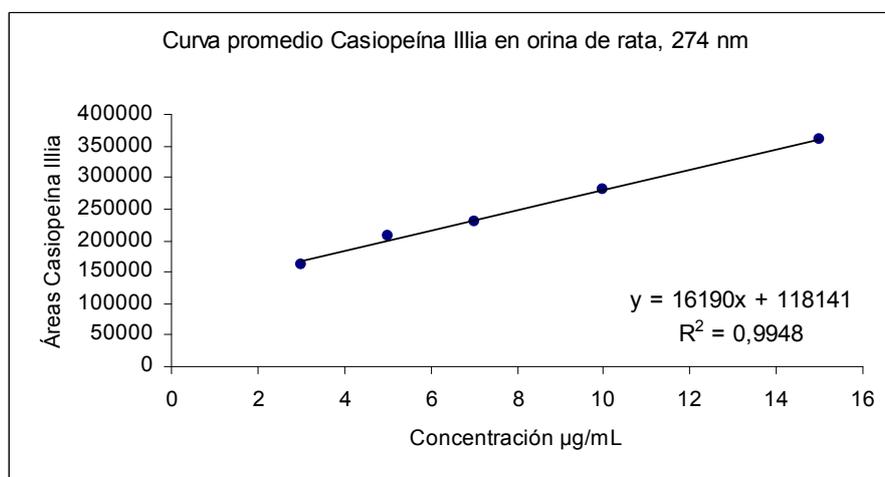
Las siguientes tablas muestran resultados correspondientes a la revalidación parcial del método bioanalítico.

**Tabla 6.** Linealidad y precisión del método, utilizando como respuesta el área de la Casiopeína Illia entre el área del estándar interno.

Concentración µg/mL	Curva 1 R áreas	Curva 2 R áreas	Curva 3 R áreas	Promedio	D.E.	% C.V.
3	0.6727	1.4269	1.3834	1.161	0.4234	36.47
5	2.0632	1.5933	1.3235	1.66	0.3744	22.55
7	1.8205	1.9312	1.4022	1.718	0.279	16.24
10	2.403	2.2472	1.6781	2.1095	0.3816	18.09
15	2.9847	2.7674	2.3071	2.6864	0.346	12.88

**Tabla 7.** Linealidad y precisión del método, utilizando como respuesta el área del analito de interés.

Concentración µg/mL	Curva 1 Área	Curva 2 Área	Curva 3 Área	Promedio	D.E.	%C.V.
3	107653	186817	186510	160326.667	45616.9917	28.45
5	221500	220382	181639	207840.333	22697.9048	10.92
7	254393	246424	189339	230052	35482.9187	15.42
10	310828	306380	223214	280140.667	49350.0781	17.62
15	383541	388585	307724	359950	45299.3023	12.58



**Figura 13.** Curva promedio de Casiopeína IIIa en orina de rata macho.

#### 4.2 Parámetros farmacocinéticos obtenidos a las dos dosis diferentes.

Tanto para la dosis de 7 mg/Kg como para la dosis de 9 mg/Kg, en el anexo I se citan los datos individuales que se relacionan con la excreción de la Casiopeína IIIa a diferentes intervalos de tiempo.

A continuación se cita el cálculo empleado para la obtención del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) del fármaco.

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}}$$

**Figura 14.** Fórmula utilizada para calcular el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ).

En las siguientes tablas se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos de manera individual para cada una de las dos dosis consideradas.

**Tabla 8.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos individualmente, considerando la administración de Casiopeína IIIa en una dosis bolo de 7 mg/Kg.

Rata	$K_{el}$ (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	$Aex^{\infty}$ (mg)	Dosis (mg)	Diferencia (Dosis - $Aex^{\infty}$ ) (mg)	% Dosis por eliminar
10	0.069	10.04	0.8	2.52	1.64	65.08
12	0.082	8.45	0.83	2.52	1.69	67.06
13	0.027	25.67	1.08	2.64	1.56	59.09
15	0.07	9.9	1.69	2.4	0.71	29.58
16	0.072	9.63	0.22	2.64	2.42	91.67
17	0.046	15.07	0.3	2.64	2.34	88.64
18	0.046	15.07	1.23	2.76	1.53	55.43
Promedio	0.059	13.4	0.88	2.59		
D.E.	0.019	6.03	0.52			
$K_{el}$	$0.059 \pm 0.019 \text{ h}^{-1}$					
$t_{1/2}$	$13.4 \pm 6.03 \text{ h}$					
$Aex^{\infty}$	$0.88 \pm 0.52 \text{ mg}$					

**Tabla 9.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos individualmente, considerando la administración de Casiopeína IIIa en una dosis bolo de 9 mg/Kg.

Rata	$K_{el}$ (1/h)	$t_{1/2}$ (h)	$Aex^{\infty}$ (mg)	Dosis (mg)	Diferencia (Dosis - $Aex^{\infty}$ ) (mg)	% Dosis por eliminar
2	0.033	21	1.08	3.48	2.4	68.97
4	0.925	0.75	0.67	3.24	2.57	79.32
5	0.037	18.73	0.98	3.12	2.14	68.59
6	0.081	8.56	0.21	3.36	3.15	93.75
7	0.071	9.76	0.67	3.24	2.57	79.32
8	0.067	10.34	0.18	2.64	2.46	93.18
Promedio	0.202	11.52	0.63	3.18		
D.E.	0.355	7.36	0.38			
$K_{el}$	$0.202 \pm 0.355 \text{ h}^{-1}$					
$t_{1/2}$	$11.52 \pm 7.36 \text{ h}$					
$Aex^{\infty}$	$0.63 \pm 0.38 \text{ mg}$					

#### 4.3 Análisis estadístico enfocado en la comparación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos a ambas dosis.

De acuerdo a uno de los objetivos planteados anteriormente, en donde se cita la evaluación de la farmacocinética de la Casiopeína IIIa a dos dosis diferentes.

Los promedios de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de manera individual (tablas 8 y 9) se comparan mediante la prueba de distribución estadística t de <<student>>.

Denotando primero las medias poblacionales  $\mu_1$  y  $\mu_2$  de la constante de eliminación del fármaco para la dosis de 7 mg/Kg y 9 mg/Kg respectivamente, se tiene que decidir entre las hipótesis:

- ✓  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  no hay diferencia significativa esencial entre los dos grupos.
- ✓  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$  hay diferencia significativa esencial entre los dos grupos.

A continuación se citan las fórmulas empleadas en la aplicación de dicho ensayo estadístico.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad \text{donde} \quad \sigma = \sqrt{\frac{N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

**Figura 15.** Fórmulas empleadas para poder calcular el valor de t.

Para la constante de eliminación, se tiene:

$$\sigma = \sqrt{\frac{7(0.019)^2 + 6(0.355)^2}{7 + 6 - 2}} = 0.263, \quad t = \frac{0.202 - 0.059}{0.263 \sqrt{\frac{1}{7} + \frac{1}{6}}} = 0.977$$

Con un ensayo bilateral a nivel de significancia del 0.01, se rechazará la hipótesis  $H_0$  si el valor de  $t$  se encuentra fuera del rango  $-t_{0.995}$  a  $t_{0.995}$  que para  $(N_1 + N_2 - 2) = (6 + 7 - 2) = 11$  grados de libertad es el rango -3.11 a 3.11, véase anexo II.

Con un ensayo bilateral a nivel de significancia del 0.05, se rechazará  $H_0$  si el valor de  $t$  se encuentra fuera del rango  $-t_{0.975}$  a  $t_{0.975}$  que para 11 grados de libertad es el rango -2.20 a 2.20

A manera de resumen a continuación se muestra en la siguiente tabla los valores de  $t$  así como su rango a los dos niveles de significación para cada uno de los parámetros farmacocinéticos a evaluar.

**Tabla 10.** Valores de  $t$  obtenidos, asociados con la comparación farmacocinética.

Parámetro farmacocinético	$t$	$-t_{0.995}$ a $t_{0.995}$ (0.01)	$-t_{0.975}$ a $t_{0.975}$ (0.05)
$K_{el}$	0.977	-3.11 a 3.11	-2.20 a 2.20
$t_{1/2}$	0.467	-3.11 a 3.11	-2.20 a 2.20
$Aex^\infty$	0.897	-3.11 a 3.11	-2.20 a 2.20

De acuerdo a los valores de  $t$  obtenidos, al encontrarse dentro de los rangos establecidos para los niveles de significancia del 0.01 y 0.05, se estaría aceptando la hipótesis  $H_0$ , por lo que se puede decir que no hay diferencia significativa esencial entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos a dos diferentes dosis.

# Capítulo 5

# Análisis de resultados

### **5.1 Método analítico aplicado en la cuantificación de Casiopeína IIIa en orina de rata por CLAR.**

El método bioanalítico revalidado fue lineal en el intervalo de 3 a 15 µg/mL, con un coeficiente de correlación,  $r = 0.997$  La ecuación correspondiente a la curva promedio del analito de interés en la orina de rata macho fue,  $y = 16190x + 118141$ , con un coeficiente de determinación,  $r^2 = 0.995$  En cuanto a la precisión el coeficiente de variación (%C.V.) para cada concentración probada varió de 12% a 28% (tabla 7 y figura 13), esto posiblemente debido a que la respuesta del analito de interés se está viendo afectada por la presencia de otros componentes propios de la orina de la rata y/o a la manipulación de las muestras.

### **5.2 Estudio preliminar de farmacocinética.**

Después de haber realizado con ambos grupos de ratas macho Wistar el estudio (figura 7) y aplicado el método cromatográfico (figura 8) a cada una de las muestras de orina recolectada a cada intervalo de tiempo, se llevó a cabo el análisis de los datos urinarios.

Las tablas que se muestran a continuación provienen de un análisis global, obteniendo así parámetros farmacocinéticos como la cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito, la constante de eliminación y el tiempo de vida media, tales parámetros también se obtuvieron a partir de un análisis individual (tablas 8 y 9).

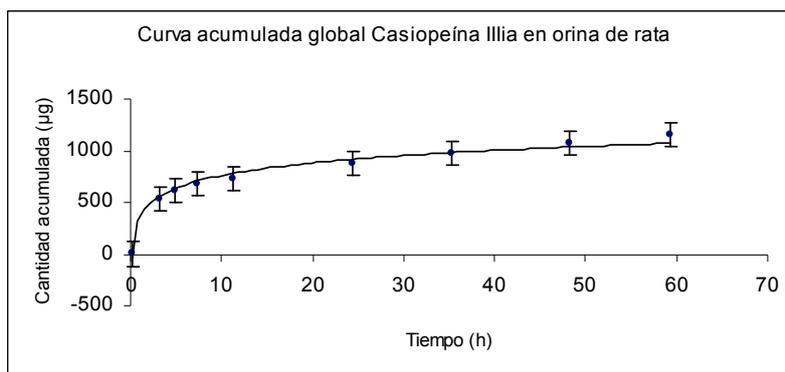
**Tabla 11.** Datos vinculados con la excreción de Casiopeína IIIia, obtenidos a partir del promedio de las concentraciones de las muestras de orina recolectadas en el intervalo de tiempo correspondiente, referido a una dosis bolo de 7 mg/Kg.

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	1148.7
3-4	3.13	278.57	1.93	537.65	537.65	611.05
4-6	4.96	30.58	2.52	76.91	614.56	534.14
6-8	7.38	47.43	1.48	70.1	684.66	464.04
8-12	11.3	29.69	1.3	38.59	723.25	425.45
12-24	24.38	48.9	3.26	159.41	882.66	266.05
24-36	35.21	42.9	2.19	93.88	976.53	172.17
36-48	48.21	26.44	3.78	99.93	1076.46	72.24
48-60	59.21	24.97	2.89	72.24	1148.7	0

**Tabla 12.** Datos vinculados con la excreción de Casiopeína IIIia, obtenidos a partir del promedio de las concentraciones de las muestras de orina recolectadas en el intervalo de tiempo correspondiente, referido a una dosis bolo de 9 mg/Kg.

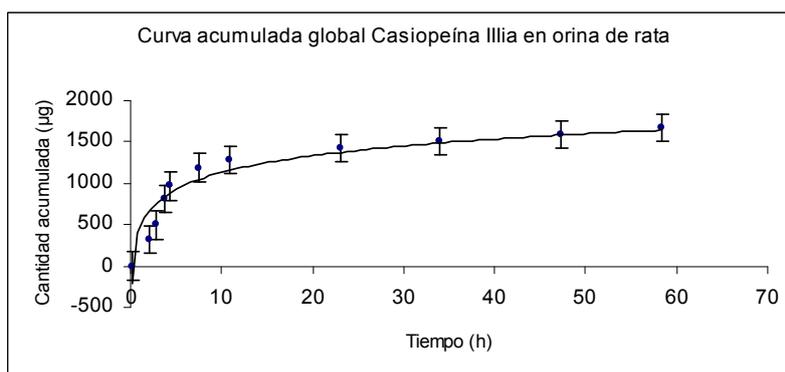
Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	1668.98
1-2	2.04	246.39	1.3	320.3	320.3	1348.67
2-3	2.87	144.74	1.21	175.62	495.92	1173.05
3-4	3.79	157.07	2	314.14	810.07	858.91
4-6	4.39	128.96	1.22	157.33	967.4	701.58
6-8	7.48	148.17	1.49	220.78	1188.17	480.8
8-12	10.97	68.86	1.45	99.51	1287.68	381.29
12-24	23.14	33.7	4.16	140.03	1427.71	241.27
24-36	33.97	28.23	2.97	83.83	1511.54	157.43
36-48	47.3	17.52	4.28	74.97	1586.52	82.46
48-60	58.32	35.65	2.31	82.46	1668.98	0

A continuación se observa la curva acumulada global de la Casiopeína IIIia. En este tipo de curvas se define una trayectoria ascendente a medida que va avanzando la excreción del fármaco, cuando ya no hay más fármaco por excretar, la curva se vuelve paralela al eje de las abscisas.



**Figura 16.** Curva acumulada global de Casiopeína IIIa en orina de rata macho, referida a una dosis bolo de 7 mg/Kg.

La cantidad promedio administrada de fármaco al inicio fue de 2.59 mg, por lo que de acuerdo al último intervalo de muestreo, el cuál equivale aproximadamente a las 59 horas, se encontraron 1.15 mg de Casiopeína IIIa acumulada en el fluido biológico, tal cantidad corresponde a un 44.40% de la cantidad administrada al inicio del estudio, por lo que el 55.60% de fármaco se pudiera pensar que aún no ha sido excretado o bien ya fue metabolizado.



**Figura 17.** Curva acumulada global de Casiopeína IIIa en orina de rata macho, referida a una dosis bolo de 9 mg/Kg.

De acuerdo a la dosis que fue de 9 mg/Kg, la cantidad promedio administrada al inicio del estudio fue de 3.18 mg. Considerando el último intervalo de muestreo, que corresponde aproximadamente a las 58 horas, la cantidad de fármaco acumulado en el fluido biológico fue de 1.67 mg, la cual equivale a un 52.52% de la cantidad administrada al inicio, por lo que el 47.48% se creería que aún no ha sido excretado o bien ya fue metabolizado.

Por lo que es importante mencionar que no todos los fármacos se eliminan totalmente por la orina, por lo cual, si se absorben por completo o se administran por vía intravenosa, aparecen en la orina al 100%, es decir, toda la dosis se excreta inalterada en orina.

Si el fármaco se elimina en parte por otros mecanismos (por ejemplo, metabolismo) o por otras vías (bilis, sudor), sólo se llegaría a recuperar en orina en condiciones de absorción completa, una fracción o porcentaje de la dosis administrada.

Haciendo referencia a la hipótesis planteada al inicio del estudio esta no se cumple, ya que solo para la dosis de 7 mg/Kg de Casiopeína IIIa, la cantidad de fármaco excretada a tiempo infinito es tal que corresponde a una excreción urinaria menor al 50%.

De acuerdo a un análisis de tipo individual, es significativo mencionar que la cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito obtenido (tablas 8 y 9) se presenta una excreción urinaria por debajo del 50% en ambas dosis. Por lo que considero importante el evaluar dos dosis más, siendo estas menores a las estudiadas.

En las siguientes tablas se citan los cálculos necesarios (método de sigma menos) para poder construir la gráfica de  $\ln$  de la cantidad remanente por excretar de Casiopeína III vs. tiempo, en donde a partir de la pendiente de la fase logarítmica-lineal se obtuvo la constante de eliminación ( $K_{el}$ ) y partiendo de este último parámetro farmacocinético se calculó el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ).

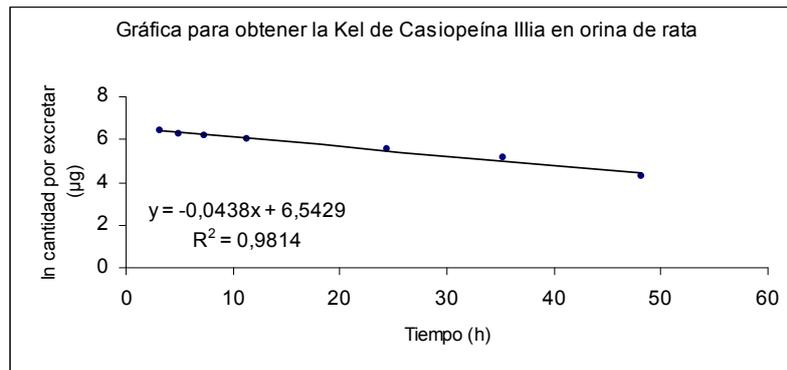
**Tabla 13.** Datos asociados con el cálculo de la constante de eliminación, relacionados a una dosis bolo de 7 mg/Kg.

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )	$\ln$ cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )
0	0	1148.7	
3-4	3.13	611.05	6.42
4-6	4.96	534.14	6.28
6-8	7.38	464.04	6.14
8-12	11.3	425.45	6.05
12-24	24.38	266.05	5.58
24-36	35.21	172.17	5.15
36-48	48.21	72.24	4.28
48-60	59.21	0	

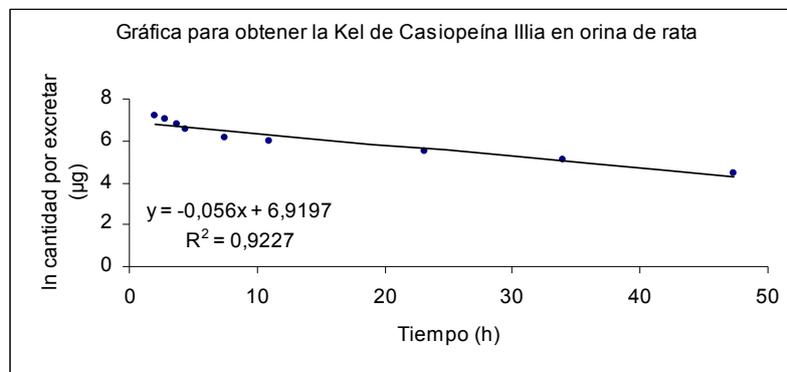
**Tabla 14.** Datos asociados con el cálculo de la constante de eliminación, relacionados a una dosis bolo de 9 mg/Kg.

Intervalo de tiempo (min)	Tiempo (h)	Cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )	$\ln$ cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )
0	0	1668.98	
1-2	2.04	1348.67	7.21
2-3	2.87	1173.05	7.07
3-4	3.79	858.91	6.76
4-6	4.39	701.58	6.55
6-8	7.48	480.8	6.18
8-12	10.97	381.29	5.94
12-24	23.14	241.27	5.49
24-36	33.97	157.43	5.06
36-48	47.3	82.46	4.41
48-60	58.32	0	

Al igual que las gráficas anteriores, las gráficas que se presentan a continuación provienen de un comportamiento global, mostrando así como se realizó el análisis de los datos urinarios individualmente.



**Figura 18.** Gráfica para obtener la  $K_{el}$  del fármaco en orina de rata, relacionado a una dosis bolo de 7 mg/Kg.



**Figura 19.** Gráfica para obtener la  $K_{el}$  del fármaco en orina de rata, relacionado a una dosis bolo de 9 mg/Kg.

Los valores de tiempo de vida media obtenidos, los cuales nos dan información acerca de la permanencia o fugacidad del fármaco en el organismo, fueron de 15.75 h bajo una dosis bolo de Casiopeína Illia de 7 mg/Kg y 12.38 h referido a una dosis bolo de Casiopeína Illia de 9 mg/Kg.

Los tiempos de vida media obtenidos de manera individual, fueron de 13.4 h a una dosis bolo de Casiopeína Illia de 7 mg/Kg y de 11.52 h bajo una dosis bolo de Casiopeína Illia de 9 mg/Kg.

De acuerdo a los valores de tiempo de vida media obtenidos, sería bueno recolectar muestras de orina durante un periodo de tiempo mayor, considerando que uno de los puntos a cubrir para poder realizar estudios de excreción urinaria es que es necesario recolectar muestras por un lapso de tiempo abarcando cuando menos siete vidas medias, asegurándonos así que la cantidad de fármaco excretado en la orina corresponda al 99.2% de la cantidad administrada.

Esto a reserva de saber mediante alguna otra metodología analítica, como por ejemplo cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas o mediante el empleo de la técnica de radiomarcado si en este caso la molécula de interés (Casiopeína Illia) se está cuantificando como fármaco inalterado o si estuviese sufriendo alguna modificación después de su administración.

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos con respecto a los parámetros farmacocinéticos, tomando en cuenta tanto la dosis de 7 mg/Kg como la dosis de 9 mg/Kg, al no haber diferencia significativa entre ambos grupos, se estaría observando una farmacocinética de tipo lineal en donde no se depende de la dosis administrada.

Con la finalidad de poder caracterizar mejor un estudio de farmacocinética a partir de datos urinarios sería importante tomar en cuenta que los primeros intervalos de muestreo al estar muy cercanos entre sí, fue sumamente necesario estar administrando agua vía oral, esto con el objetivo de provocar diuresis y obtener así las muestras correspondientes a las primeras horas de estudio.

Al encontrarse tal estudio dentro de una etapa preclínica, sería interesante considerar la variabilidad farmacocinética que pudiera o no presentarse entre ratas de distinto sexo.

Además es importante el contemplar si es viable o no la aplicación del método bioanalítico puntualizado anteriormente para un estudio de farmacocinética en ratas hembra o bien en otros modelos experimentales.

Debido a lo anterior se empezaron a realizar modificaciones en las condiciones cromatográficas, esto con la finalidad de poder observar el comportamiento cromatográfico tanto del analito de interés (Casiopeína IIIa) como del estándar interno (Clorhidrato de Ranitidina) en orina de rata hembra Wistar.

# Capítulo 6

# Conclusiones

### 6.1 Conclusiones.

- Se lograron determinar parámetros farmacocinéticos urinarios como  $A_{ex}^{\infty}$ ,  $K_{el}$ ,  $t_{1/2}$ , a partir de la administración de Casiopeína IIIa en ratas macho Wistar, aplicando un método bioanalítico anteriormente optimizado y validado.
  
- De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos, al no haber diferencia significativa entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos a dos dosis diferentes, se estaría presentando un comportamiento farmacocinético de tipo lineal.
  
- Considero que la hipótesis planteada anteriormente, en primera instancia tendría que ser rechazada, debido a que en una de las dos dosis evaluadas, se presenta una excreción urinaria por debajo del 50%, esto a reserva de ver lo que pasaría al considerar cuando menos una tercer dosis más.

Como sugerencia es importante que se consideren aspectos relacionados con la optimización del método bioanalítico y/o el realizar modificaciones en el método cromatográfico que se aplicó para la cuantificación del fármaco en orina de rata macho, esto con la finalidad de que se pueda aplicar tal método en un estudio de farmacocinética de Casiopeína IIIa en ratas hembras.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CLAR. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.  
K<sub>el</sub>. Constante de eliminación.  
t<sub>1/2</sub>. Tiempo de vida media del fármaco.  
Aex<sup>∞</sup>. Cantidad de fármaco acumulado a tiempo infinito.  
HeLa. Línea celular de carcinoma cérvico-uterino humana.  
CaLo. Línea celular de carcinoma epidermoide humana.  
SiHa. Línea celular de carcinoma cérvico-uterino humana.  
DL<sub>50</sub>. Dosis letal 50.  
DL<sub>90</sub>. Dosis letal 90.  
GC. Gas chromatography, en español CG.  
LC. Liquid chromatography, en español CL.  
TLC. Thin layer chromatography, en español CCF.  
HPLC. High performance liquid chromatography, en español CLAR.  
LSC. Liquid solid chromatography, en español CLS.  
LLC. Liquid liquid chromatography, en español CLL.  
GLC. Gas liquid chromatography, en español CGL.  
GSC. Gas solid chromatography, en español CGS.  
SEC. Size exclusion chromatography, en español CETM.  
BPC. Bond phase chromatography, en español CFL.  
IEC. Ion exchange chromatography, en español CII.  
GFC. Gel filtration chromatography, en español CFG.  
GPC. Gel permeability chromatography, en español CPG.  
LADME. Liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción.  
DEA. Desviación estándar absoluta.  
DE. Desviación estándar.  
%CV. Porcentaje de coeficiente de variación.

## ANEXO I

## Dosis de 7 mg/Kg

## Rata 10

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	799.21	
3-4	3.53	221.22	2.5	553.04	553.04	246.17	5.51
4-6	5.37	1.6	4.3	6.87	559.91	239.3	5.48
6-8	7.78	3.46	1.92	6.65	566.56	232.65	5.45
8-12	11.7	4.52	1.5	6.77	573.33	225.88	5.42
12-24	24.78	28.88	3.2	92.42	665.75	133.46	4.89
24-36	35.62	26.94	3.78	101.85	767.6	31.61	3.45
36-48	48.62	4.61	4.4	20.28	787.88	11.33	2.43
48-60	59.62	2.95	3.84	11.33	799.21	0	

## Rata 12

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	834.64	
3-4	3.47	107.61	1.22	131.28	131.28	703.35	6.56
8-12	11.63	33.87	1.26	42.68	173.96	660.67	6.49
12-24	24.72	81.07	3.46	280.51	454.48	380.16	5.94
24-36	35.55	38.9	1.36	52.91	507.39	327.25	5.79
36-48	48.55	66.85	4.74	316.89	824.28	10.36	2.34
48-60	59.55	13.81	0.75	10.36	834.64	0	

## Rata 13

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0.1	0	0	0	0.1	1080.64	
3-4	2.75	182.97	2.9	530.6	530.6	550.03	6.31
4-6	4.58	18.89	1.76	33.24	563.85	516.79	6.25
6-8	7	1.41	0.53	0.75	564.6	516.04	6.25
8-12	10.92	62.84	1.44	90.49	655.09	425.55	6.05
12-24	24	68.48	2.1	143.8	798.89	281.74	5.64
24-36	34.83	48.23	0.8	38.58	837.48	243.16	5.49
48-60	58.83	122.81	1.98	243.16	1080.64	0	



## Rata 15

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad acumulada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )	In cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )
0	0	0	0	0	0	1694.12	
3-4	3.1	352.02	3.16	1112.37	1112.37	581.75	6.37
4-6	4.93	54.82	2.18	119.51	1231.88	462.25	6.14
6-8	7.35	16.4	1.18	19.35	1251.23	442.9	6.09
8-12	11.27	23.36	1.18	27.56	1278.79	415.33	6.03
12-24	24.35	46.65	4.2	195.94	1474.73	219.39	5.39
24-36	35.18	58.24	1.85	107.74	1582.47	111.65	4.72
36-48	48.18	14.71	6.48	95.32	1677.79	16.33	2.79
48-60	59.18	4.51	3.62	16.33	1694.12	0	

## Rata 16

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad acumulada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )	In cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )
0	0	0	0	0	0	216.21	
3-4	3.05	213.16	0.28	59.68	59.68	156.53	5.05
8-12	11.22	23.84	1.12	26.7	86.39	129.83	4.87
24-36	35.13	28.58	3.94	112.59	198.98	17.23	2.85
48-60	59.13	3.68	4.68	17.23	216.21	0	

## Rata 17

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad acumulada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )	In cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )
0	0	0	0	0	0	295.16	
6-8	7.27	188.19	1.8	189.99	189.99	105.18	4.66
24-36	24.27	47.4	4	51.4	241.38	53.78	3.98
36-48	48.1	36.01	1.32	37.33	278.71	16.45	2.8
48-60	59.1	13.77	2.68	16.45	295.16	0	0

## Rata 18

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad acumulada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )	In cantidad por excretar ( $\mu\text{g}$ )
0	0	0	0	0	0	1232.29	
2-3	2.98	594.48	1.52	903.62	903.62	328.68	5.8
4-6	4.82	47.02	1.82	85.58	989.19	243.1	5.49
6-8	7.23	27.67	1.96	54.23	1043.42	188.87	5.24
12-24	24.23	20.9	2.6	54.35	1097.77	134.52	4.9
24-36	35.07	56.49	1.4	79.09	1176.86	55.43	4.02
36-48	48.07	10	1.96	19.6	1196.47	35.83	3.58
48-60	59.07	13.27	2.7	35.83	1232.29	0	



### Dosis 9 mg/Kg Rata 2

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	1080.32	
3-4	3.18	188.04	1.3	244.45	244.45	835.88	6.73
4-6	4.8	417.86	1	417.86	662.31	418.02	6.04
6-8	6.05	159.97	1.06	169.57	831.87	248.45	5.52
8-12	11.3	50.7	2.54	128.77	960.64	119.68	4.78
36-48	47.63	3.35	5.72	19.15	979.79	100.53	4.61
48-60	58.55	46.54	2.16	100.53	1080.32	0	

### Rata 4

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	666.93	
1-2	2.58	401.91	0.6	241.15	241.15	425.78	6.05
2-3	2.93	179.91	1.2	215.89	457.04	209.89	5.35
3-4	3.83	47.79	0.8	38.23	495.27	171.66	5.15
4-6	5	97.95	1.38	135.17	630.43	36.49	3.6
48-60	58.33	17.72	2.06	36.49	666.93	0	

### Rata 5

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	979.08	
6-8	7.33	229.52	1.98	454.45	454.45	524.64	6.26
12-24	23.25	21.11	7.2	151.98	606.43	372.66	5.92
24-36	34.08	26.01	4.64	120.7	727.13	251.95	5.53
36-48	47.42	35.57	3.82	135.87	863	116.09	4.75
48-60	58.33	42.68	2.72	116.09	979.08	0	



## Rata 6

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	213.78	
6-8	7.33	66.83	1	66.83	66.83	146.95	4.99
8-12	11.08	56.53	0.8	45.22	112.05	101.73	4.62
12-24	23.25	20.05	3.1	62.16	174.21	39.57	3.68
24-36	34.08	30.44	1.3	39.57	213.78	0	

## Rata 7

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	666.24	
1-2	1.5	90.87	2	181.73	181.73	484.51	6.18
2-3	2.5	66.28	1.14	75.56	257.29	408.95	6.01
8-12	10.42	115.04	1.4	161.06	418.35	247.89	5.51
12-24	22.58	72.91	3.4	247.89	666.24	0	

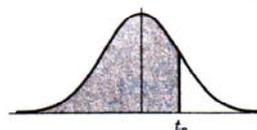
## Rata 8

Intervalo de tiempo (h)	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	Volumen orina (mL)	Cantidad excretada (µg)	Cantidad acumulada (µg)	Cantidad por excretar (µg)	In cantidad por excretar (µg)
0	0	0	0	0	0	184.26	
3-4	3.12	5.57	4.2	23.38	23.38	160.87	5.08
8-12	10.2	53.19	1.04	55.32	78.71	105.55	4.66
12-24	22.37	20.74	2.92	60.55	139.25	45	3.81
36-48	46.53	13.64	3.3	45	184.26	0	



ANEXO II

**PERCENTILES ( $t_p$ )  
DE LA  
DISTRIBUCION  $t$  DE STUDENT  
CON  $\nu$  GRADOS DE LIBERTAD  
(AREA SOMBREADA =  $p$ )**



$\nu$	$t_{0,995}$	$t_{0,99}$	$t_{0,975}$	$t_{0,95}$	$t_{0,90}$	$t_{0,80}$	$t_{0,75}$	$t_{0,70}$	$t_{0,60}$	$t_{0,55}$
1	63,66	31,82	12,71	6,31	3,08	1,376	1,000	0,727	0,325	0,158
2	9,92	6,96	4,30	2,92	1,89	1,061	0,816	0,617	0,289	0,142
3	5,84	4,54	3,18	2,35	1,64	0,978	0,765	0,584	0,277	0,137
4	4,60	3,75	2,78	2,13	1,53	0,941	0,741	0,569	0,271	0,134
5	4,03	3,36	2,57	2,02	1,48	0,920	0,727	0,559	0,267	0,132
6	3,71	3,14	2,45	1,94	1,44	0,906	0,718	0,553	0,265	0,131
7	3,50	3,00	2,36	1,90	1,42	0,896	0,711	0,549	0,263	0,130
8	3,36	2,90	2,31	1,86	1,40	0,889	0,706	0,546	0,262	0,130
9	3,25	2,82	2,26	1,83	1,38	0,883	0,703	0,543	0,261	0,129
10	3,17	2,76	2,23	1,81	1,37	0,879	0,700	0,542	0,260	0,129
11	3,11	2,72	2,20	1,80	1,36	0,876	0,697	0,540	0,260	0,129
12	3,06	2,68	2,18	1,78	1,36	0,873	0,695	0,539	0,259	0,128
13	3,01	2,65	2,16	1,77	1,35	0,870	0,694	0,538	0,259	0,128
14	2,98	2,62	2,14	1,76	1,34	0,868	0,692	0,537	0,258	0,128
15	2,95	2,60	2,13	1,75	1,34	0,866	0,691	0,536	0,258	0,128
16	2,92	2,58	2,12	1,75	1,34	0,865	0,690	0,535	0,258	0,128
17	2,90	2,57	2,11	1,74	1,33	0,863	0,689	0,534	0,257	0,128
18	2,88	2,55	2,10	1,73	1,33	0,862	0,688	0,534	0,257	0,127
19	2,86	2,54	2,09	1,73	1,33	0,861	0,688	0,533	0,257	0,127
20	2,84	2,53	2,09	1,72	1,32	0,860	0,687	0,533	0,257	0,127
21	2,83	2,52	2,08	1,72	1,32	0,859	0,686	0,532	0,257	0,127
22	2,82	2,51	2,07	1,72	1,32	0,858	0,686	0,532	0,256	0,127
23	2,81	2,50	2,07	1,71	1,32	0,858	0,685	0,532	0,256	0,127
24	2,80	2,49	2,06	1,71	1,32	0,857	0,685	0,531	0,256	0,127
25	2,79	2,48	2,06	1,71	1,32	0,856	0,684	0,531	0,256	0,127
26	2,78	2,48	2,06	1,71	1,32	0,856	0,684	0,531	0,256	0,127
27	2,77	2,47	2,05	1,70	1,31	0,855	0,684	0,531	0,256	0,127
28	2,76	2,47	2,05	1,70	1,31	0,855	0,683	0,530	0,256	0,127
29	2,76	2,46	2,04	1,70	1,31	0,854	0,683	0,530	0,256	0,127
30	2,75	2,46	2,04	1,70	1,31	0,854	0,683	0,530	0,256	0,127
40	2,70	2,42	2,02	1,68	1,30	0,851	0,681	0,529	0,255	0,126
60	2,66	2,39	2,00	1,67	1,30	0,848	0,679	0,527	0,254	0,126
120	2,62	2,36	1,98	1,66	1,29	0,845	0,677	0,526	0,254	0,126
$\infty$	2,58	2,33	1,96	1,645	1,28	0,842	0,674	0,524	0,253	0,126

Procedencia: R. A. Fisher y F. Yates, *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* (5.ª edición), Tabla III, Oliver and Boyd Ltd., Edimburgo, con permiso de los autores y editores.

# Capítulo 7

# Bibliografía

### 7.1 Referencias Bibliográficas.

1. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece los criterios y requisitos que deben observarse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, así como los requisitos a que se deberán sujetar los establecimientos que lleven a cabo dichas pruebas.
2. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. Métodos analíticos Guía de validación. Edición 2002.
3. Gómez Ramos Irma E. Optimización y validación de un método analítico para Casiopeína III en orina por HPLC. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2003.
4. Cruz Hernández Juan J. y cols. Lecciones de oncología clínica. Ediciones Arán S. A. 2ª edición. España 1999, p. 19-54.
5. López-Lara Martín Francisco, González San Segundo Carmen, Santos Miranda Juan Antonio, Sanz Rubiales Álvaro. Manual de oncología clínica. Gráficas Andrés Martín. Valladolid, España 1999, p. 13-28.
6. H. E. Lessner. Oncología médica. El manual moderno. México, 1980.
7. Bravo Ma. Elena, Tovar Tovar Araceli, Ruiz Magdalena, Ruiz Azuara Lena, Moreno Esparza Rafael. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 1-5.

8. Rico Morales Héctor A., Gracia Mora Isabel, Ruiz Ramírez Lena, Sumano López Héctor. Actividad antineoplásica de la Casiopeína Illia sobre diferentes líneas tumorales humanas xenotransplantadas al ratón desnudo. 5ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 20-25.
9. Márquez Adriana, Romero Laura, Marín Álvaro, Gómez Celedonio, Ruiz Lena, De la Rosa Ma. Esther, Gracia Isabel, Tinoco Mabel, Macías Lucía. Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopeínas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 4-9.
10. Rodríguez Aguilera Ernesto, Téllez Martínez Eloína Mireya, Macías Rosales Lucía, Cortés Martínez Leticia, Ortiz Muñoz Rocío, Ruiz Ramírez Lena, Gracia Mora Isabel. Estimación del porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis en células HeLa, inducido por cinco Casiopeínas de la familia III. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 49-55.
11. Ruiz Ramírez L., De la Rosa M. E., Gracia Mora I. , Mendoza A., Pérez G., Ferrer Sueta G., Tovar A., Breña M., Gutiérrez P., Cruces Martínez M. P., Pimentel E. y Natarajan A. T., Casiopeínas, metal-based drugs a new class of antineoplastic and Genotoxic Compounds. Journal of Inorganic Biochemistry, 51, 1-2, p. 406 (1993).
12. Rivera Huerta Marisol, Macías Rosales Lucía, Gracia Mora Isabel. Toxicidad aguda en rata y ratón de las Casiopeínas II-gly y Illia. 2º Congreso Nacional de Química Médica y Diabetes. Septiembre 2006.

13. Tovar Tovar Araceli, Ruiz Ramírez Lena, Campero Celis Antonio, Moreno Esparza Rafael. Correlaciones estructurales de varias Casiopeínas. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 10-14.
14. Círigo Landgrave Claudia, Moreno Esparza Rafael, Ruiz Ramírez Lena. Interacción entre complejos ternarios del tipo  $[Cu(N-N)(N-O)H_2O]^+$  con el ADN y sus constituyentes. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 135-140.
15. Tovar Tovar Araceli, Ruiz Ramírez Lena, Campero Celis Antonio. Interacción entre Casiopeínas y adenina. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 121-128.
16. Bravo Ma. Elena, Tovar Tovar Araceli, Ruiz Magdalena, Ruiz Azuara Lena, Moreno Esparza Rafael. Diseño, síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 1-5.
17. Reyes Velasco Leobardo. Farmacocinética preclínica de la Casiopeína II-gly en ratas. Tesis de Maestría en C. Químicas. Facultad de Química, UNAM 2003.
18. Viveros Alpízar A. Fuentes Noriega I. Determinación del pKa y coeficiente de partición de la Casiopeína IIIa. 3ª Jornada de trabajo de Casiopeínas. UNAM 1998.
19. Barrón Sosa L., Macías Rosales L., Gómez Ruiz C., Roldán Reyes E., Gracia Mora I. Evaluación citotóxica y genotóxica de Casiopeína IIIa. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 46-48.

20. Márquez Adriana, Romero Laura, Marín Álvaro, Gómez Celedonio, Ruiz Lena, De la Rosa Ma. Esther, Gracia Isabel, Tinoco Mabel, Macías Lucía. Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopeínas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 4-9.
21. Carballo Chaigneau Francisco, Gracia Mora Isabel, Constantino Casas Fernando, Roldán Reyes Elia, Macías Rosales Lucía. Efecto antitumoral *in vivo* de la Casiopeína IIIa en ratones desnudos xenotransplantados con HCT-15. 5ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 15-19.
22. Rodríguez Aguilera Ernesto, Téllez Martínez Eloína Mireya, Macías Rosales Lucía, Cortés Martínez Leticia, Ortiz Muñoz Rocío, Ruiz Ramírez Lena, Gracia Mora Isabel. Estimación del porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis en células HeLa, inducido por cinco Casiopeínas de la familia III. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 49-55.
23. Barrón Sosa L., Macías Rosales L., Gómez Ruiz C., Roldán Reyes E., Gracia Mora I. Evaluación citotóxica y genotóxica de Casiopeína IIIa. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 46-48.
24. Fuentes Noriega Inés. Farmacocinética preclínica de Casiopeína IIIa y su unión a proteínas plasmáticas. Tesis de Doctorado en C. Químicas. Facultad de Química, UNAM 2005.
25. Rivera Huerta Marisol, Macías Rosales Lucía, Gracia Mora Isabel. Toxicidad aguda en rata y ratón de las Casiopeínas II-gly y IIIa. 2º Congreso Nacional de Química Médica y Diabetes. Septiembre 2006.

26. Tovar Tovar A. Estudio electroforético del mecanismo de interacción de la familia de Casiopeínas I, II, III con el DNA. 1ª Jornada de trabajo Casiopeínas. UNAM 1994.
27. Fuentes Noriega Inés, Novelo Torres Alma Miriam, Ruiz Ramírez Lena, Macías Rosales Lucía. Cinética *in vitro* de un nuevo fármaco antineoplásico (Casiopeína IIIa) Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p.115-120.
28. Tovar Tovar Araceli, Ruiz Ramírez Lena, Campero Celis Antonio. Interacción entre Casiopeínas y adenina. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, p. 121-128.
29. De la Rosa Duque M. E. Recombinogenic effects induced by Casiopeína III as detected by reverse mutations in SPD8 cells. 3ª Jornada de trabajo de Casiopeínas. UNAM 1998, p. 37-39.
30. Marín Hernández A., Rodríguez Hernández S. Evaluación del efecto antineoplásico sobre el metabolismo energético en mitocondrias y células. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 59.
31. Jarquín Julia Antonio. Farmacocinética de Casiopeína III-i. Estudio preclínico en conejos. Tesis de Maestría en C. Químicas. Facultad de Química, UNAM 2001.
32. Fuentes Noriega Inés. Farmacocinética preclínica de Casiopeína IIIa y su unión a proteínas plasmáticas. Tesis de Doctorado en C. Químicas. Facultad de Química, UNAM 2005.

33. Márquez Adriana, Romero Laura, Marín Álvaro, Gómez Celedonio, Ruiz Lena, De la Rosa Ma. Esther, Gracia Isabel, Tinoco Mabel, Macías Lucía. Evaluación antineoplásica *in vitro* de nuevos fármacos (Casiopeínas) empleando líneas tumorales humanas y murinas. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 4-9.
34. Gracia Mora Isabel, Sumano López Héctor, Ruiz Azuara Lena. Evaluación preclínica de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas. Diciembre 2000, p. 18-24.
35. Doménech Berrozpe José, Martínez Lanao José, Plá Delfina José María. Biofarmacia y Farmacocinética, Volumen I y II. Editorial síntesis. Vallehermoso, Madrid 2001. p. 53-85, p. 17-37.
36. Doménech Berrozpe José, Martínez Lanao José, Plá Delfina José María. Biofarmacia y Farmacocinética, Volumen I y II. Editorial síntesis. Vallehermoso, Madrid 2001. p. 53-85, p. 17-37.
37. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece los criterios y requisitos que deben observarse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, así como los requisitos a que se deberán sujetar los establecimientos que lleven a cabo dichas pruebas.
38. Cárdenas Rodríguez Hilda L., Cortés Arroyo Alma R. Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco 1996. p. 151-160.

39. Murray R. Spiegel, Ph. D. Estadística. Mc. Graw Hill De México. 1ª edición, 1970. p. 188-195.
40. McNair M. Harold, Esquivel H. Benjamín. Cromatografía Líquida de Alta Presión. Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia, Estados Unidos 1973, p. 1-2.
41. Quattrocchi Oscar Alberto, Abelaira Sara Inés, Laba Raúl Felipe. Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina 1992, p. 3-36.
42. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. Métodos analíticos Guía de validación. Edición 2002.
43. Gómez Ramos Irma E. Optimización y validación de un método analítico para Casiopeína IIIi en orina por HPLC. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM 2003.
44. Fuentes Noriega Inés. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína IIIia in rat plasma. Journal of Chromatography B., 772 (2002) 115-121.