

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

***INFLUENCIA DEL POR CIENTO DE COMPRESIÓN PARA LOGRAR  
UNA LESIÓN DE MEDULA ESPINAL SOBRE LA  
FARMACOCINÉTICA DE CIPROFLOXACINA ADMINISTRADA POR  
INFUSIÓN INTRAVENOSA EN PRIMATES NO HUMANOS  
(PAPIIT IN 221706-3)***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**FERNANDO ESPARGO HILARIO**

**DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS**

**Dra. en C. LETICIA CRUZ ANTONIO**

**Septiembre de 2008**



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.

# **AGRADECIMIENTOS**

## ***A mi padre Ignacio F. Espargo C.:***

Por todos sus consejos día a día, por llegar a ser algún día como él, por dejarme valores positivos como responsabilidad, honestidad, perseverancia, etc. La estimulación que me brinda para cumplir con los sueños que me voy planteando.

## ***A mi madre Martha M. Hilario M.:***

Por darme la vida, por todo su amor y sus cuidados durante toda mi existencia. Porque gracias a ella no me olvido de mis raíces, de las cuales me siento feliz y orgulloso. “Eternamente agradecido”.

## ***A mis hermanos Tania y Nestor:***

Por mantenerme al igual que ellos, como un profesionalista digno y competente.

## ***A la Dra. Leticia Cruz Antonio:***

Por brindarme todo su apoyo incondicional y motivación durante y después de terminar mi carrera. Por su paciencia y atención para que éste proyecto finalizara. Por motivarme a ser un profesionalista ambicioso en aprendizaje y compartirlo hacia las generaciones futuras y para beneficio de la investigación y ciencia.

## ***A mis sinodales:***

Por todas sus enseñanzas, experiencia, consejos y tiempo dedicado en mi trabajo de tesis y durante todos los semestres compartidos.

***A mis profesores de la FES-Zaragoza:***

De los cuales recibí conocimiento y consejos durante todos los semestres de la carrera de Química Farmacéutica Biológica.

A mis **AMIGOS** de la generación 2001 (**Esteban, Silvano, Moisés, Zaire**) y demás personas importantes (**Leticia, Vianey, Nery, Jorge, Gilberto**, etc.) con los cuales compartí vivencias, aventuras y aprendizaje durante toda la estancia en la FES-Zaragoza.

***Al Centro de investigación Proyecto Camina A. C.:***

Al **Dr. Guizar-Sahagún, Braulio** y demás personas, por todo su apoyo al facilitar las instalaciones, recursos, etc. para que éste proyecto de investigación se llevara a cabo.

***A Farmacos Especializados:***

A **Magdalena, Sr. Mauro y Juan**, quienes me dieron la oportunidad de seguir trabajando y de forma alterna seguir estudiando, además de otras personas maravillosas que conocí (**Angeles, Lola, Guadalupe 02, Adela, Luz y alberto**), de las cuales recibí motivación para continuar con mi sueño.

Con mucho cariño para **Irma, Nancy, Guadalupe 01, Elena y Violeta**, doquiera que se encuentren. Soy afortunado de haberlas conocido. También con mucho cariño para **Lin** mi presente futuro esencial.

***“A la vida, que te da la oportunidad en cada instante de ser un mejor ser humano, no importando si se tiene triunfos ó fracasos”.***

**ÉSTE PROYECTO DE TESIS FUÉ  
DESARROLLADO EN EL LA BORATORIO  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PROYECTO  
CAMINA A. C. Y SOPORTADO POR EL  
PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE  
INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN  
TECNOLÓGICA.**

**PAPIIT IN 221706-3**

# Abreviaturas:

**Aclaramiento (Cl):** Es el volumen de plasma ó fluido biológico que a su paso por un órgano ó por el organismo completo, queda libre de una sustancia por unidad de tiempo.

**Área bajo la curva (ABC<sub>0-t</sub>):** Cantidad de fármaco que esta presente en la circulación sanguínea, y se registra del tiempo 0 al tiempo t.

**Constante de eliminación (K<sub>elim</sub>):** Representa la velocidad de eliminación del fármaco en estudio por unidad de tiempo.

**Concentración máxima (C<sub>max</sub>):** Representa la concentración más alta de fármaco en el plasma.

**Modelo monocompartimental abierto (MCA):** Representa cuando el fármaco entra en el cuerpo, se distribuye instantáneamente entre la sangre y otros fluidos ó tejidos corporales.

**Modelo bicompartimental abierto (MBA):** Representa cuando el fármaco entra en el cuerpo, pero su distribución entre la sangre y otros fluidos ó tejidos corporales no es instantánea.

**Tiempo de vida media (T<sub>1/2</sub>):** Representa el tiempo necesario para que la cantidad de fármaco presente en el cuerpo se reduzca a la mitad.

**Tiempo máximo (t<sub>max</sub>):** Representa el tiempo en el cual se obtiene la concentración máxima de fármaco en plasma.

**Via intravenosa (IV):** El fármaco se administra directamente en el torrente sanguíneo y alcanza el lugar de acción, donde actúa sin sufrir alteraciones.

**Volumen de distribución (Vd):** Es el volumen aparente del cuerpo, en el cual el fármaco está disuelto.

## ÍNDICE

	Páginas.
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. MARCO TEÓRICO.	4
2.1. Introducción a la farmacocinética.	4
2.2. Fases de la farmacocinética.	8
2.2.1. Absorción.	8
2.2.2. Distribución.	9
2.2.3. Biotransformación.	10
2.2.4. Eliminación.	11
2.3. Infusión intravenosa.	13
2.3.1. Generalidades.	13
2.3.2. Dosis de carga.	17
2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).	17
2.4.1. Generalidades.	17
2.5. Validación de métodos bioanalíticos.	22
2.5.1. Generalidades.	22
2.5.1.1. Linealidad.	23
2.5.1.2. Precisión.	24
2.5.1.3. Exactitud.	24
2.5.1.4. Especificidad.	25
2.5.1.5. Estabilidad de la muestra.	25
2.5.1.6. Limite de cuantificación.	25
2.5.1.7. Limite de detección.	25

2.6.	Ciprofloxacina.	26
2.6.1.	Generalidades.	26
2.6.1.1.	Efectos adversos.	27
2.6.1.2.	Precauciones.	28
2.6.1.3.	Interacciones.	28
2.6.1.4.	Acción antimicrobiana.	28
2.6.1.5.	Farmacocinética.	29
2.6.1.6.	Usos y administración.	30
2.7.	Lesión traumática de la medula espinal (LTME).	31
2.7.1.	Generalidades de la medula espinal en condición normal.	31
2.7.2.	Importancia e incidencia de una LTME.	34
2.7.3.	Fenómenos fisiopatológicos posterior a una LTME.	36
2.7.4.	Alteraciones farmacocinéticas posterior a una LTME.	45
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	48
IV.	OBJETIVOS.	50
V.	HIPÓTESIS.	51
VI.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.	52
6.1.	Material.	53
6.2.	Reactivos.	54
6.3.	Equipo e instrumentación.	54
6.4.	Parte experimental.	55
6.4.1.	Manejo de los primates sometidos a investigación.	55
6.4.1.1.	Antes del tratamiento quirúrgico.	55



6.4.1.2.	Después del tratamiento quirúrgico.	56
6.4.2.	Preparación de la curva de calibración previo al estudio farmacocinético.	57
6.4.2.1.	Preparación de la solución de ciprofloxacina.	58
6.4.2.2.	Preparación de la solución estándar interno.	58
6.4.2.3.	Preparación del ácido perclórico al 6%.	59
6.4.3.	Método bioanalítico utilizado para el análisis cromatográfico.	59
6.4.3.1.	Sistema cromatográfico.	59
6.4.3.2.	Preparación de la fase móvil.	59
6.4.4.	Estudio farmacocinético.	60
6.4.4.1.	Manejo y análisis de las muestras biológicas de los primates sometidos al estudio.	60
VII.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	61
7.1.	Curva de calibración estándar.	61
7.2.	Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos previo a la LTME (fase preoperatoria).	66
7.3.	Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos 24 hrs. después de una LTME (fase aguda).	69
7.4.	Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos 15 días después de una LTME (fase subaguda).	77
7.5.	Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos 2 meses después de una LTME (fase crónica).	84
VIII.	CONCLUSIONES.	94
IX.	APLICACIÓN DEL PROYECTO.	95
X.	BIBLIOGRAFÍA.	97

## I. INTRODUCCIÓN.

Una lesión traumática de medula espinal (LTME) es una aflicción devastadora con consecuencias extremadamente significativas tanto a nivel funcional como a nivel psicológico. No solamente produce una alteración ó perjuicio en la actividad sensitiva y actividad motora por debajo del sitio de la lesión en el sujeto, también provoca alteraciones sistémicas y metabólicas importantes asociadas con complicaciones en el tratamiento que sigue el paciente, demorando su rehabilitación y provocando una inadecuada farmacoterapia, ya que el efecto farmacológico del fármaco muchas veces no se consigue.<sup>(12)</sup>

La disfunción del sistema nervioso autónomo provocada por una LTME induce alteraciones ó cambios hemodinámicos en el organismo, los cuales pueden influir en la disposición de los fármacos<sup>(12)</sup>. Una LTME parece modificar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de casi todos los fármacos, aunque los mecanismos fisiopatológicos involucrados todavía son escasamente comprendidos.<sup>(16)</sup>

Los efectos de una LTME parecen depender del tipo, nivel, intensidad, tiempo de la lesión y de la vía de administración del fármaco, una LTME puede ser clasificada como completa ó incompleta. Una LTME completa significa que no hay sensibilidad ni función motora por debajo del nivel de la lesión y los cambios sistémicos y metabólicos son más severos que en una LTME incompleta.<sup>(14)</sup>

Se han reportado alteraciones farmacocinéticas en algunos fármacos en sujetos con una LTME crónica en comparación con sujetos sanos,<sup>(32,34)</sup> pero debido a la enorme variabilidad interindividual observada en el marco clínico y las condiciones éticas que implican éstos estudios, el acceso a un mayor conocimiento de éstas alteraciones sobre todo en etapa aguda de la lesión está limitado. De esta forma,

los modelos experimentales en animales parecen ser una alternativa conveniente para estudios sistemáticos de alteraciones farmacocinéticas debidos a una LTME, como también entender los mecanismos fisiopatológicos involucrados.<sup>(12)</sup>

En el presente trabajo se realizó un estudio experimental evaluando la influencia del por ciento de compresión (severa 100 %, moderada 75 % y leve 50 %) para lograr una LTME por medio del método de Contusión utilizando un Globo Epidural sobre la farmacocinética de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa en primates no humanos (monos Rhesus *Macaca Mulata*) en diferentes estados de la lesión: Etapa aguda (24 horas posteriores a la lesión), etapa subaguda (15 días posteriores a la lesión) y la etapa crónica (2 meses después de la lesión).

La ciprofloxacina, un antibiótico del grupo de las quinolonas de segunda generación, es un agente efectivo en contra de bacterias gram negativas y gram positivas y es un fármaco que debido a su amplio espectro de primera elección y baja resistencia, es utilizado para la infección de vías urinarias, condición que se presenta comúnmente en individuos con LTME.

La cuantificación de las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacina en plasma de primate, se efectuó utilizando la técnica analítica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) acoplado a espectrofotometría UV por medio de un mecanismo secundario de fase reversa.

La LTME modifica los mecanismos de distribución y eliminación alterando las cinéticas de disposición del antibiótico ciprofloxacina en los primates no humanos, de forma evidente a las 24 horas posteriores a la lesión (etapa aguda ó etapa conocida como choque espinal), donde los parámetros farmacocinéticos determinados tales como el área bajo la curva ( $ABC_{0-t}$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), aclaramiento (Cl) y volumen de distribución (Vd) se ven modificados de forma proporcional a medida que se incrementa la intensidad de contusión ó compresión sobre la medula espinal.

En la etapa subaguda de la LTME se observó una reversión de los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina comparándolo con la etapa aguda, sugiriendo que en la etapa subaguda pudieran existir mecanismos compensatorios para contrarrestar la disfunción del sistema nervioso autónomo, el cual provoca el desbalance de las actividades simpática y parasimpática que lleva hacia una inestabilidad en la presión arterial caracterizada por una hipotensión postural ó de reposo y a la presencia de una hipertensión episódica (evento conocido como hiperreflexia ó disreflexia autonoma), estimulando una inestabilidad en la perfusión sanguínea de diferentes órganos y tejidos corporales de los primates no humanos.

En la etapa crónica de la LTME provoca un cambio significativo en la distribución y eliminación del antibiótico como consecuencia de un desequilibrio entre el líquido extra vascular con respecto al líquido intra vascular característico de una LTME en estado crónico y alteraciones en la función renal respectivamente.

Con la información anterior, el equipo de salud (Medico, Q.F.B., Enfermera) deberá ser más consciente en el manejo integral del paciente con una LTME, desde el momento del accidente, hasta que el sujeto es rehabilitado. Por otro lado poder diseñar un régimen de dosificación adecuado, dependiendo del tipo, nivel, intensidad y tiempo elapsado posterior al traumatismo medular, y así de ésta manera se logre el efecto terapéutico y se evite alguna toxicidad del fármaco utilizado en cualquier situación particular del paciente, y así contribuir a la disminución de los porcentajes de morbilidad y mortalidad en sujetos con lesión medular .

## II. MARCO TEÓRICO.

### 2.1. Introducción a la farmacocinética.

La farmacocinética es parte de la farmacología que estudia la evolución temporal del fármaco en el organismo. Es decir, comprende las etapas de absorción, distribución, metabolismo ó biotransformación y la eliminación del fármaco del organismo. Cuando es una forma farmacéutica sólida como una tableta, comprende desde la liberación del fármaco de la forma farmacéutica, conocido el proceso en forma global como LADME.<sup>(9)</sup>

Estudios farmacocinéticos en fármacos y productos farmacéuticos son útiles en el entendimiento de la relación entre las propiedades fisicoquímicas y el efecto farmacológico ó clínico del producto farmacéutico. La farmacocinética involucra las cinéticas de absorción, distribución y eliminación (excreción y metabolismo) del fármaco. La descripción de la distribución y eliminación del fármaco es a menudo definido como disposición del fármaco.<sup>(36)</sup>

En una administración oral, la curva del nivel de plasma versus tiempo es generada por medición de la concentración de fármaco en muestras de plasma tomadas en un intervalo de tiempo después de que el producto farmacéutico es administrado. Cuando el fármaco alcanza la circulación general (sistémica), la concentración de fármaco en plasma aumenta hasta un máximo. Usualmente la absorción de un fármaco es más rápido que la eliminación. Como el fármaco está siendo absorbido en la circulación sistémica, el fármaco es distribuido hacia todos los tejidos del cuerpo y simultáneamente esta siendo eliminado.<sup>(36)</sup>

A continuación se presenta una curva característica del perfil plasmático después de administrar un fármaco por vía oral:

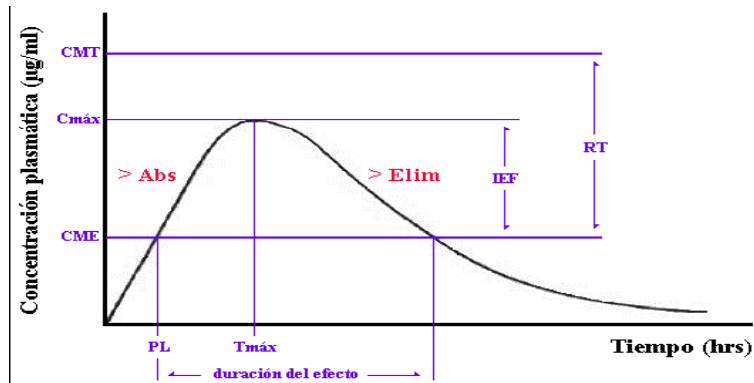


Figura A. Curva de la concentración de fármaco en plasma versus tiempo después de una administración oral.<sup>(9)</sup>

Después de una administración oral, el fármaco ingresa al torrente circulatorio a una velocidad y en cantidad desconocida. Esto significa que la dosis administrada puede experimentar un cierto número de alteraciones antes de entrar a la circulación sistémica.<sup>(9)</sup>

La curva del nivel plasmático versus tiempo también puede describir términos tales como, la concentración máxima ( $C_{max}$ ) de fármaco en plasma, el tiempo ( $t_{max}$ ) para alcanzar la  $C_{max}$  de fármaco en plasma, el área bajo la curva (ABC), entre otros parámetros, como puede observarse en la figura A. El tiempo para alcanzar la  $C_{max}$  de fármaco en plasma, es el tiempo en el cual se da la concentración más alta de fármaco en el plasma y es aproximadamente proporcional a la velocidad de absorción promedio del fármaco. La  $C_{max}$  del fármaco en plasma, usualmente está relacionada con la dosis y las constantes de velocidad de absorción y eliminación del fármaco. El ABC esta relacionada con la cantidad de fármaco absorbido sistémicamente.<sup>(36)</sup>

La medición de la concentración de fármaco en la sangre, suero ó plasma es la aproximación más directa para valorar la farmacocinética del fármaco en el organismo. Los fármacos están en un estado dinámico en el cuerpo. Varios

modelos matemáticos pueden ser diseñados para simular la velocidad de los procesos de absorción, distribución y eliminación del fármaco. Estos modelos matemáticos hacen posible el desarrollo de ecuaciones para describir las concentraciones del fármaco en el organismo en función del tiempo.<sup>(36)</sup>

Cuando un fármaco es administrado por medio de una inyección intravenosa rápida (bolus IV), la dosis completa del fármaco entra en el cuerpo inmediatamente. En la mayoría de los casos, el fármaco se distribuye vía circulación sistémica hacia todos los tejidos del cuerpo y llega a un equilibrio rápido en el cuerpo. Un modelo monocompartimental abierto supone, que cualquier cambio que ocurra en la concentración de fármaco en plasma refleja cambios proporcionales en los niveles plasmáticos del fármaco en el tejido. Sin embargo, éste modelo no supone que la concentración del fármaco en cada tejido sea la misma en algún momento dado. Por lo tanto, el fármaco en el cuerpo (Dd) no puede ser determinado directamente; solamente fluidos corporales accesibles (tal como la sangre) pueden ser muestreados para determinar la concentración del fármaco. El termino volumen de distribución aparente (Vd), es el volumen aparente del cuerpo, en el cual el fármaco está disuelto.<sup>(36)</sup> A continuación se presentan dos graficas características del perfil plasmático obtenido posterior a la administración de un fármaco por vía intravenosa:

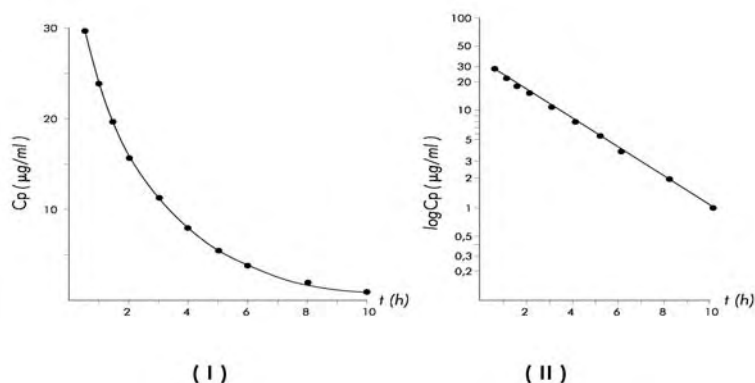


Figura B. Curva de la concentración de un fármaco en plasma versus tiempo después de una administración intravenosa (I). Curva semilogarítmica de la concentración de un fármaco en plasma versus tiempo después de un bolus intravenoso (II).<sup>(9)</sup>

La velocidad de eliminación para la mayoría de los fármacos sigue una tendencia de primer orden. La constante de velocidad de eliminación ( $K_{elim}$ ), es una constante de primer orden con unidades de tiempo inverso ( $\text{min}^{-1}$ ,  $\text{hrs}^{-1}$ ). En general, solamente el fármaco activo es medido en el compartimento vascular. La remoción ó eliminación total del fármaco de éste compartimento es efectuado por metabolismo (biotransformación) y excreción.<sup>(36)</sup>

Íntimamente relacionado con la  $K_{elim}$  se encuentra la vida media biológica, periodo de semieliminación ó tiempo medio de eliminación ( $t_{1/2}$ ), que representa el tiempo necesario para que la cantidad de fármaco presente en el cuerpo se reduzca a la mitad. La relación entre la  $K_{elim}$  y el  $t_{1/2}$  sigue un proceso cinético de primer orden.<sup>(9)</sup>

El  $V_d$  representa un factor que debe ser tomado en cuenta para estimar la cantidad de fármaco en el cuerpo a partir de la concentración del fármaco encontrado en el compartimento muestreado. Se establece usualmente que el fármaco se equilibra rápidamente en el cuerpo, además cada tejido individual puede contener una concentración de fármaco distinta debido a las diferencias de afinidad del fármaco hacia el tejido. El  $V_d$  es útil para relacionar la concentración de fármaco en el plasma ( $C_p$ ) y la cantidad de fármaco en el cuerpo ( $D_b$ ). El cuerpo puede ser considerado como un sistema de volumen constante. Por lo tanto, el  $V_d$  para un fármaco dado es generalmente una constante. Si se conoce la concentración del fármaco en el plasma y el  $V_d$ , entonces la cantidad total del fármaco en el cuerpo (en el tiempo en el cual la muestra de plasma fue obtenida) puede calcularse.<sup>(36)</sup>



## **2.2. Fases de la farmacocinética.**

### **2.2.1. Absorción.**

La absorción del fármaco se refiere al pasaje de un fármaco desde su sitio de administración hasta la circulación sistémica. En el intestino, pulmones y piel, los fármacos deben primeramente ser absorbidos a través de las capas de las células epiteliales que tienen conexiones muy estrechas entre una y otra. Los fármacos que son inyectados en el tejido subcutáneo y músculo evitan la barrera epitelial y son más fácilmente absorbidos.<sup>(6)</sup>

El proceso de absorción que sigue la mayoría de los fármacos es por difusión pasiva hasta la circulación general. El fármaco puede ser absorbido pasivamente por difusión lipídica ó por difusión acuosa. La difusión lipídica es facilitada por un alto grado de solubilidad en lípidos. La difusión acuosa ocurre al pasar a través de poros acuosos en la membrana celular y es limitado únicamente a fármacos con un peso molecular bajo. Con respecto a otros mecanismos de absorción, muy pocos fármacos son absorbidos por transporte activo ó por difusión facilitada.<sup>(6)</sup>

Con respecto al efecto del pH sobre la absorción de los fármacos, podemos comentar, que la mayoría de los fármacos son ácidos y bases débiles que existen tanto en su forma ionizada y no ionizada en el cuerpo. Solamente la forma no ionizada será suficientemente soluble en los lípidos de la membrana para ser fácilmente transferido a través de la membrana celular. La proporción de las dos formas en un sitio en particular influirá en el porcentaje de absorción, distribución y eliminación del fármaco.<sup>(6)</sup>

### 2.2.2. Distribución.

Las moléculas del fármaco son distribuidas en todos los sectores del cuerpo por medio de la circulación sistémica. El volumen sanguíneo total (cerca de 6 L) es bombeado a través del corazón cada minuto, inmediatamente después de que un fármaco se encuentra en la circulación general, éste es diluido en el volumen sanguíneo total. Un fármaco que es limitado únicamente al espacio vascular y puede libremente penetrar a los eritrocitos tiene un volumen de distribución de 6 L. Si el fármaco no puede permear a los eritrocitos, el espacio disponible es reducido aproximadamente a 3 L (volumen plasmático).<sup>(20)</sup>

Casi todos los fármacos fácilmente cruzan los capilares y son rápidamente diluidos hacia un volumen mucho más grande, el espacio extracelular. Los capilares excepto los del cerebro, son más parecidos a filtros que a membranas lipídicas, hablando en términos de permeabilidad. Un fármaco con un peso molecular de hasta 500 ó 600 daltons rápidamente se difunde fuera del sistema vascular y alcanza el fluido intersticial de las células. La concentración del fármaco en los fluidos corporales también depende del grado de unión del fármaco con componentes endógenos en el fluido.<sup>(20)</sup>

La penetración del fármaco en las células depende de muchos factores similares a lo que ocurre en el proceso de absorción a nivel gastrointestinal. Iones y moléculas pequeñas e hidrosolubles se difunden a través de canales o poros acuosos en la membrana celular. Moléculas liposolubles por sí mismas penetran en la membrana celular. Moléculas e iones hidrosolubles de tamaño moderado (peso molecular de 50 daltons ó más) no pueden entrar fácilmente a la célula, excepto por un mecanismo de transporte especial. La penetración de ácidos o bases débiles en la célula depende del pH del fluido extracelular. A diferencia del tracto gastrointestinal, la sangre y fluido extracelular mantienen un pH uniforme.<sup>(20)</sup>

### 2.2.3. Biotransformación.

La biotransformación ó metabolismo del fármaco se refiere a la conversión bioquímica (enzimática) de un fármaco a otra forma química. La mayoría de los tejidos del cuerpo son capaces de metabolizar a los fármacos, pero la mayoría de los fármacos son principalmente metabolizados en el hígado por enzimas localizadas en el microsoma hepático, una fracción celular derivada del retículo endoplásmico. Los compuestos que metabolizan a los fármacos son enzimas que pueden llevar a cabo procesos de oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación.<sup>(20)</sup>

Las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (fase 1 ó biotransformación) resultan de metabolitos con grupos funcionales (hidroxilo, amino y carboxilo) que pueden ser conjugados (fase 2 ó conjugación). En el hombre la conjugación más común del fármaco ó metabolito ocurre con acetato, sulfato, glicina y ácido glucurónico.<sup>(20)</sup>

La mayoría de los procesos oxidativos toma lugar en los microsomas hepáticos, éstos requieren de fosfato de nicotinamida reducida (NADPH), oxígeno molecular y un complejo de enzimas en el retículo endoplásmico, la enzima oxidativa terminal es el citocromo P-450, una hemoproteína. La mayoría de los fármacos, como también hormonas esteroideas, son oxidados por el sistema microsomal.<sup>(20)</sup>

La reducción es una ruta relativamente menos común en el metabolismo del fármaco. Éste proceso se lleva a cabo en el hígado y por la flora intestinal. La hidrólisis de ésteres y amidas es una ruta común en el metabolismo del fármaco. Los microsomas hepáticos contienen estererasas no específicas, como también en otros tejidos y en plasma.<sup>(20)</sup>

La formación de glucurónidos es el proceso de conjugación más común en el metabolismo del fármaco. Éste involucra la reacción entre el ácido glucurónico difosfato uridina (UDPG) y el fármaco conteniendo un grupo amino, hidroxilo ó carboxilo. La reacción es mediada por la enzima microsomal glucuroniltransferasa. Los glucurónidos son ácidos solubles en agua que son fácilmente excretados en la orina y bilis. Algunos esteres de glucurónidos son lábiles y pueden ser hidrolizados en la orina ó el plasma al fármaco madre.<sup>(20)</sup>

Ácidos aromáticos son algunas veces convertidos a conjugados de glicina. Los ácidos son activados en combinación con el ATP para formar derivados de la coenzima A antes de conjugarse con glicina. La mayoría de los compuestos con grupos amino son metabolizados a su forma derivativa acetil por acetilcoenzima A y acetiltransferasa.<sup>(20)</sup>

La conjugación con sulfato es una ruta común en el metabolismo de fármacos con un grupo hidroxilo, particularmente esteroides. El donador sulfato, es 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato (PAPS). Los conjugados de sulfato, semejante a los glucurónidos, tienen un alto aclaramiento renal.<sup>(20)</sup>

#### **2.2.4. Eliminación.**

Los fármacos son eliminados del cuerpo por metabolismo y excreción. Los riñones juegan un rol principal en la excreción de los fármacos y sus metabolitos. Algunos fármacos son excretados en la bilis y pueden ser eliminados en las heces. Los fármacos utilizados en anestesia son a menudo excretados por los pulmones. Incluso cuando la eliminación del fármaco del cuerpo involucra solamente biotransformación, los metabolitos correspondientes del fármaco son usualmente aclarados por el riñón.<sup>(20)</sup>

La excreción renal del fármaco es un fenómeno complejo el cual involucra uno ó más de los siguientes procesos: Filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción tubular pasiva. Dependiendo de cual de éstos procesos es el dominante, el aclaramiento renal puede ser un componente importante ó insignificante en la eliminación del fármaco.<sup>(20)</sup>

Los riñones reciben cerca del 25 % del gasto cardiaco ó 1.2 a 1.5 L de sangre por minuto. Cerca del 10 % de éste volumen es filtrado por el glomérulo. Por lo tanto, cerca de 130 mL de plasma acuoso es filtrado cada minuto. Aunque los poros de los capilares glomerulares son suficientemente grandes para permitir el pasaje de muchas moléculas del fármaco, el glomérulo restringe selectivamente el pasaje de células sanguíneas y proteínas plasmáticas. Por consiguiente, solamente el fármaco libre (fármaco que no está unido a proteínas plasmáticas) puede ser filtrado.<sup>(20)</sup>

Aunque aproximadamente 180 L de filtrado libre de proteínas pasa a través del glomérulo cada día, solamente 1.5 L es excretado como orina, el sobrante es reabsorbido en los túbulos renales. Sin embargo muchos fármacos son reabsorbidos eficientemente en la porción distal de la nefrona. La reabsorción tubular de los fármacos es un fenómeno pasivo. Fármacos no ionizados, liposolubles son extensivamente y rápidamente reabsorbidos, mientras que iones y compuestos polares son incapaces de difundirse a través del epitelio renal y son excretados en la orina.<sup>(20)</sup>

Se ha sugerido el efecto restrictivo de la unión del fármaco a proteínas plasmáticas, sobre la filtración glomerular y la enorme capacidad de la nefrona para reabsorber ciertos solutos. Una unión a proteínas plasmáticas en porcentaje elevado, fármacos con gran liposolubilidad, pudiesen persistir en el organismo por periodos de tiempo más largos después de la administración, al menos que, una ruta de eliminación alterna estuviese disponible. Otros fármacos son sometidos a una secreción tubular activa en la porción proximal de la nefrona. La fracción de

fármaco en la sangre que no es filtrada puede ser efectivamente aclarada por transporte tubular activo. La velocidad de secreción tubular, es una función de la concentración total de fármaco, además de la concentración libre, en sangre ó plasma y es independiente de la unión a proteínas plasmáticas.<sup>(20)</sup>

## **2.3. Infusión Intravenosa.**

### **2.3.1. Generalidades.**

Una infusión intravenosa (IV) es un método directo por el cual el fármaco es administrado sistemáticamente dentro del cuerpo. Soluciones farmacéuticas IV pueden ser administradas, ya sea como una dosis por medio de un bolus ó infundida lentamente a una velocidad constante (velocidad de orden cero). La principal ventaja de administrar un fármaco por infusión intravenosa es el control preciso de la concentración del fármaco en el plasma adecuada a las necesidades individuales del paciente. Para fármacos con un índice terapéutico estrecho, la infusión IV mantiene una concentración efectiva constante del fármaco en el plasma eliminando las fluctuaciones entre la concentración máxima del fármaco en el plasma y la concentración que pudiera cumplir con el efecto terapéutico (concentración mínima efectiva).<sup>(36)</sup>

Además, la infusión IV de fármacos tales como antibióticos puede ser administrado con fluidos de forma IV, incluyendo electrolitos ó nutrientes. Por lo tanto, la duración de la farmacoterapia puede ser mantenida ó detenida como sea requerida y adecuada a las necesidades del paciente utilizando una infusión IV.<sup>(36)</sup>

Ya que el fármaco no está presente en el cuerpo en el tiempo cero, se debe a que los niveles del fármaco aumentan a partir de la concentración del fármaco en el tiempo cero y gradualmente llega a ser constante cuando una concentración del

fármaco en estado estacionario es obtenida. En un estado estacionario, la velocidad del fármaco que sale del cuerpo (velocidad de eliminación) es igual a la velocidad de entrada del fármaco al cuerpo (velocidad de infusión). Basándose en ésta relación de balance de masas, una ecuación farmacocinética para la infusión puede ser derivada dependiendo de, si el fármaco sigue una cinética mono ó bicompartimental.<sup>(36)</sup>

A continuación se presenta una curva característica después de administrar un fármaco por infusión intravenosa a una velocidad constante:

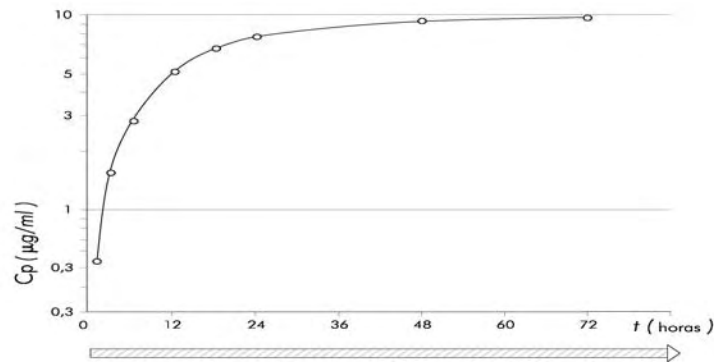


Figura C. Concentración de un fármaco en plasma durante y después de una infusión intravenosa prolongada a velocidad constante.<sup>(36)</sup>

La farmacocinética de un fármaco administrado por infusión IV a una velocidad constante sigue una tendencia de orden cero, en el cual el fármaco es directamente infundido dentro de la circulación sistémica sanguínea. Para la mayoría de los fármacos, la eliminación del fármaco del plasma sigue un proceso de primer orden. Por lo tanto, en un modelo monocompartimental abierto, el fármaco infundido sigue una entrada de orden cero y una salida del organismo de primer orden. La modificación de la cantidad de fármaco en el cuerpo en

cualquier tiempo ( $dDf/dt$ ) durante la infusión, es la velocidad de entrada menos la velocidad de salida del fármaco.<sup>(36)</sup>

$$dDf/dt = R - KDf \quad (\text{Ec.1})$$

donde  $Df$  es la cantidad de fármaco en el cuerpo,  $R$  es la velocidad de infusión (orden cero) y  $K$  es la constante de velocidad de eliminación (primer orden). Integrando la ecuación anterior da la siguiente ecuación:

$$Cp = (R/VdK)(1 - e^{-Kt}) \quad (\text{Ec. 2})$$

La ecuación anterior nos da la concentración de fármaco en plasma en cualquier tiempo durante la infusión IV. Si la infusión es detenida antes de llegar a un estado estacionario, la pendiente de la curva de eliminación sigue siendo la misma. Desde un punto de vista matemático, todas las infusiones son detenidas antes de que un estado estacionario verdadero sea obtenido, ya que un estado estacionario teórico es solamente alcanzado después de un tiempo de infusión infinitamente largo. A medida que un fármaco es infundido, el valor del tiempo ( $t$ ) incrementa. En un tiempo infinito,  $t = \infty$ ,  $e^{-Kt}$  se aproxima a cero y la (Ec.2) se reduce a la siguiente ecuación:

$$C_{ss} = R / VdK \quad (\text{Ec. 3})$$

El tiempo requerido para obtener una concentración de fármaco en plasma en estado estacionario es dependiente de la vida media de eliminación del fármaco. En teoría, un tiempo infinito es necesario después de comenzar una infusión IV para que el fármaco alcance una concentración plasmática en estado estacionario, ya que la eliminación del fármaco es exponencial (primer orden). Así de ésta manera, la concentración del fármaco en plasma llega a ser asintótica en un estado estacionario teórico.<sup>(36)</sup>



En la práctica clínica, la actividad del fármaco será observada cuando la concentración del fármaco alcance ó se aproxime a una concentración en plasma deseada, la cual es usualmente la concentración del fármaco en estado estacionario. El tiempo para alcanzar 90, 95 y 99 % de la concentración de fármaco en plasma en estado estacionario puede ser calculada. Para propósitos terapéuticos, el tiempo necesario para lograr que más del 95 % de la concentración del fármaco en plasma en estado estacionario sea obtenida, es a menudo estimado. Por lo tanto, el tiempo para que un fármaco cuyo  $t_{1/2}$  es 6 horas y pueda alcanzar más del 95% de la concentración de éste en plasma en estado estacionario será de  $5 t_{1/2}$  ó  $5 \times 6$  hrs. = 30 horas.<sup>(36)</sup>

Un incremento en la velocidad de infusión no acortará el tiempo necesario para obtener una concentración de fármaco en estado estacionario. Si el fármaco es administrado a una velocidad de infusión muy rapida, el nivel de concentración del fármaco más elevada estado estacionario será obtenido, ya que el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario será el mismo. En un estado estacionario, la velocidad de infusión equivale a la velocidad de eliminación. Por lo tanto, la velocidad de modificación de la concentración del fármaco en plasma es igual a cero.<sup>(36)</sup>

Recordemos que la (Ec.3) nos muestra que la concentración del fármaco en estado estacionario es dependiente del volumen de distribución, la constante de velocidad de eliminación y de la velocidad de infusión. Alterando cualquiera de los parámetros farmacocinéticos anteriores se puede afectar la concentración del fármaco en estado estacionario. Cuando la constante de velocidad de eliminación disminuye, la velocidad de infusión se debe disminuir proporcionalmente para mantener la misma concentración de fármaco en estado estacionario. La infusión IV puede ser utilizada para determinar el aclaramiento corporal total, si la velocidad de infusión y el nivel de concentración del fármaco en estado estacionario son conocidos.<sup>(36)</sup>

$$Cl_T = R / C_{SS} \quad (\text{Ec. 4})$$

### **2.3.2. Dosis de carga.**

Una dosis de carga ( $D_L$ ) ó una dosis inicial del fármaco por medio de un bolus, es utilizado para obtener una concentración en estado estacionario más rápidamente. Suponiendo que una  $D_L$  del fármaco por medio de un bolus IV es administrado y una infusión IV es iniciada al mismo tiempo, la concentración total  $C_{pT}$  a  $t$  horas después de comenzar la infusión será igual a  $(C_1 + C_2)$ , debido a la suma de las contribuciones del bolus y de la infusión. Entonces, la  $D_L$  equivale a la cantidad de fármaco en el cuerpo en un estado estacionario. Resumiéndose a la siguiente ecuación:

$$C_{SS} = R / VdK \quad (\text{Ec. 5})$$

Por lo tanto, si una  $D_L$  administrada de forma IV mantiene una relación  $R/K$ , seguida por una infusión IV, concentraciones del fármaco en plasma en estado estacionario son obtenidas y mantenidas inmediatamente.<sup>(36)</sup>

## **2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).**

### **2.4.1. Generalidades.**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) fue desarrollada en los años de 1960 y 1970, hoy es una técnica de separación ampliamente aceptada tanto para análisis y purificación de muestras en una gran

variedad de áreas, incluyendo industrias como la farmacéutica, biotecnología, medio ambiente, de polímeros y de alimentos. Algunas áreas recientes incluyen miniaturización de sistemas HPLC, análisis de ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas intactas y digeridas y por último quírales.<sup>(7)</sup>

La cromatografía es una técnica en la cual los solutos son separados por velocidades de elusión de forma diferencial a medida, que éstos pasan a través de una columna cromatográfica. Su separación está basada en su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Ésta requiere de la combinación correcta de una variedad de condiciones de operación, tales como el tipo de fase móvil y empaque de la columna, longitud y diámetro de la columna, velocidad de flujo de la fase móvil, temperatura de la columna y tamaño de muestra. La instrumentación de HPLC se conforma de ocho componentes básicos: reservorio de la fase móvil, sistema de reparto del solvente, mecanismo de introducción de la muestra, columna, detector, reservorio de desechos, tubo conectivo, una computadora e integrador ó registrador.<sup>(7)</sup>

El reservorio de la fase móvil puede ser algún contenedor limpio e inerte, tal como un frasco de laboratorio ó reservorio comercial. Éste usualmente contiene de 1 a 2 L de solvente. Es importante desgasificar los solventes antes de su uso, debido a que pequeñas burbujas de gas presentes en la fase móvil pueden colectarse en otros componentes, particularmente el cabezal de la bomba y el detector, y así de esta manera modifica el análisis. La fase móvil debe ser filtrada antes de utilizarla, así se elimina partículas pequeñas que pudieran colectarse en la columna ó en el tubo conector provocando una obstrucción.<sup>(7)</sup>

El propósito de la bomba ó sistema de reparto del solvente, es asegurar el reparto de flujo preciso, reproducible, constante y libre de pulsos de la fase móvil. Hay dos clases de bombas de HPLC, bombas de presión constante y bombas de flujo constante. La mayoría de las separaciones pueden llevarse a cabo utilizando una elusión isocrática, la cual utiliza un sistema de proporción de solvente que no

cambia durante el análisis. Para análisis más complejos, una elusión por gradiente es más conveniente, éste se lleva a cabo modificando la composición ó concentración de la fase móvil durante el análisis.<sup>(7)</sup>

Un gradiente puede ser una secuencia lineal, convexa, cóncava ó compleja hasta alcanzar la separación deseada. Un mezclado a presión baja es menos costoso debido a que ésta requiere solamente una bomba, pero es más susceptible a que se formen burbujas de gas porque los solventes son mezclados a presión atmosférica. La mayoría de los sistemas de alta presión operan seguramente sin desgasificación porque los solventes son mezclados a presiones suficientemente altas para mantener el gas en solución.<sup>(7)</sup>

Una variedad de mecanismos de introducción de la muestra, éstos pueden ser manual ó automático, se utiliza principalmente un mecanismo por válvula, ya que da una precisión excelente y es más fácilmente de utilizar. Generalmente se llena con un volumen de 10 a 50  $\mu\text{L}$  de muestra.<sup>(7)</sup>

La columna es el corazón del instrumento HPLC, porque la separación ocurre en ésta, y es generalmente fabricada ó hecha de acero inoxidable grado 316, la cual es relativamente inerte a la corrosión química y es empacada con la fase estacionaria deseada. Las dimensiones comunes para columnas de escala analítica están en el rango de 10 a 25 cm de longitud y de 3 a 9 mm de diámetro interno.<sup>(7)</sup>

El rol importante del detector de HPLC es el monitoreo de los solutos a medida que éstos son eluidos a través de la columna. El detector genera una señal eléctrica que es proporcional al nivel de alguna propiedad de la fase móvil ó de los solutos. Los detectores pueden ser divididos en dos categorías: detectores basándose en la propiedad de la fase móvil y detectores basándose en la propiedad de los solutos, éstos últimos son más sensibles. Un detector de índice de refracción mide ambas propiedades y se le considera un detector basándose

en la propiedad de la fase móvil. Un detector de UV mide una propiedad del soluto únicamente, y se le considera un detector basándose en la propiedad del soluto.<sup>(7)</sup>

El tubo conector en un sistema HPLC está fabricado de un material que es inerte a los solventes de la fase móvil. Es fabricado usualmente de acero inoxidable ó plástico inerte. Las conexiones entre el tubo y los diferentes componentes en el sistema son fijados con uniones que son diseñados para minimizar el volumen muerto ó nulo. El diámetro interno del tubo debe ser mantenido hacia un mínimo, para reducir los efectos del ensanchamiento de banda. Para cromatografía de escala analítica, generalmente el tubo previo a la inyección debe estar en el rango de 0.030 pulgadas, y posterior a la inyección, el tubo no debe exceder de 0.010 pulgadas.<sup>(7)</sup>

Un recurso de cómo obtener los datos tal como en una computadora, un integrador ó un registrador es adaptado a un detector. Éste toma la señal electrónica producida por el detector y lo grafica como un cromatograma, el cual puede ser evaluado por el usuario. Tanto los integradores y computadoras pueden integrar los picos de los cromatogramas.<sup>(7)</sup>

A continuación se presenta un sistema simple de cromatografía líquida de alta resolución y los componentes que lo integran:

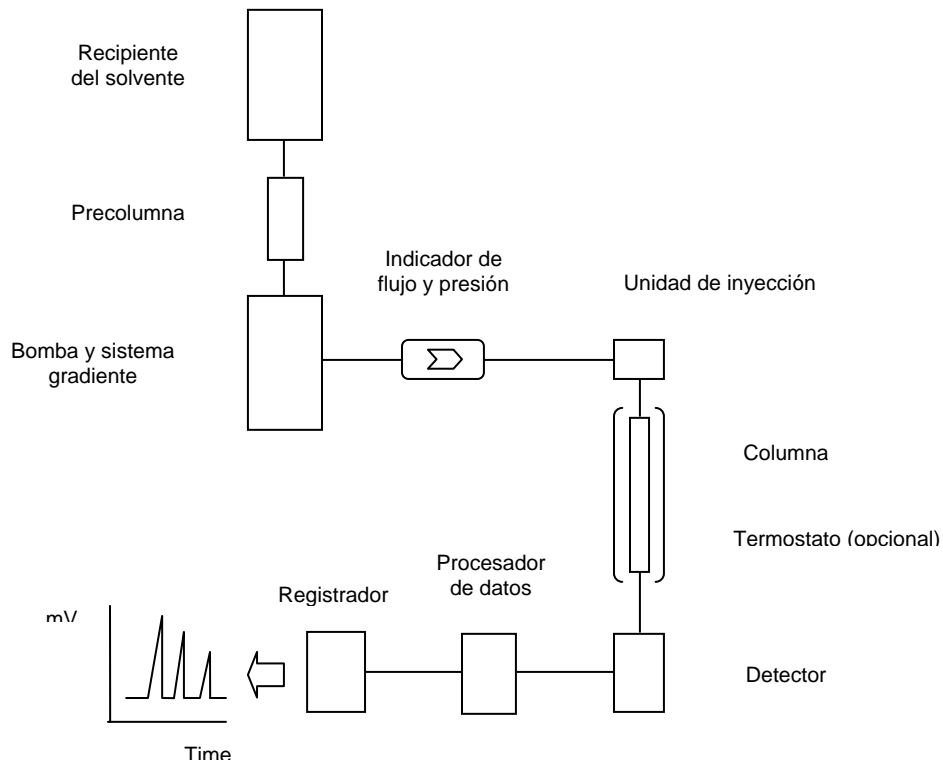


Figura D. Componentes y aditivos esenciales de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

El estado físico de la muestra debe estar en forma líquida para inyectarla dentro del instrumento, las muestras sólidas deben ser disueltas en un solvente compatible con la fase móvil y estacionaria. El rango de la cantidad inyectada de muestra abarca de 1-100  $\mu\text{L}$ . Las cantidades de muestra inyectada varía, dependiendo del rango de sensibilidad y dinamismo del detector para el análisis. La preparación de la muestra puede incluir alguna de las siguientes técnicas: dilución, preconcentración, filtración, extracción, ultrafiltración ó derivatización. El tiempo de análisis está en un rango de 5 minutos a 2 hrs. (generalmente de 10-25 min). La preparación de la muestra difiere de la naturaleza de ésta misma, puede requerir más tiempo la preparación que el análisis de la muestra.<sup>(7)</sup>

La cromatografía puede llevarse a cabo en una gran variedad de formas, la mejor forma para una separación dada, depende de las características estructurales de

los solutos a ser separados y los requerimientos de análisis. Frecuentemente las formas más utilizadas son la: cromatografía de partición (incluyendo cromatografía de par iónico), cromatografía de absorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por afinidad y cromatografía quiral.<sup>(7)</sup>

## **2.5. Validación de métodos bioanalíticos.**

### **2.5.1. Generalidades.**

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que durante ésta secuencia de pruebas y análisis, es donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.<sup>(10)</sup>

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método. El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.<sup>(10)</sup>

Los métodos analíticos selectivos y sensibles para la evaluación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos (analitos) son críticos para la conducción sucesiva de

estudios farmacológicos preclínicos, clínicos y biofarmacéuticos. La validación de métodos bioanalíticos incluye a todos los procedimientos que demuestren particularmente que el método utilizado para la medición cuantitativa de analitos contenidos en una matriz biológica tal como sangre, plasma, suero y orina, sea seguro y reproducible para el uso destinado. Los parámetros fundamentales para ésta validación incluye: exactitud, precisión, selectividad, especificidad ó sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. La validación involucra la documentación, a través de la utilización de investigaciones específicas de laboratorio, y así demostrar las características de presentación ó realización del método, las cuales son convenientes y seguras para las aplicaciones analíticas deseadas. La aceptabilidad de los datos analíticos corresponde directamente al criterio utilizado para validar el método.<sup>(22)</sup>

Métodos de análisis publicados en revisiones científicas, son a menudo modificados para adaptar los requerimientos de la realización de la valoración ó análisis en el laboratorio. Éstas modificaciones deben ser validadas para asegurar de forma conveniente la realización del método analítico. Durante el curso temporal de un programa de desarrollo de un fármaco típico, un método bioanalítico definido sufre muchas modificaciones. En forma resumida la validación asegura que un proceso ó método cumple eficientemente el objetivo para el que fue creado, por lo cual se debe cumplir con los parámetros analíticos que a continuación definiremos:<sup>(22)</sup>

#### **2.5.1.1. Linealidad.**

La linealidad de un sistema ó método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos los cuales pueden ser obtenidos directamente ó por medio de una transformación matemática bien definida son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.<sup>(10)</sup>



### **2.5.1.2. Precisión.**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar ó coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.<sup>(10)</sup>

Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).<sup>(10)</sup>

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).<sup>(10)</sup>

### **2.5.1.3. Exactitud.**

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.<sup>(10)</sup>

#### **2.5.1.4. Especificidad.**

Es la habilidad de un método analítico para obtener y cuantificar una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.<sup>(10)</sup>

#### **2.5.1.5. Estabilidad de la muestra.**

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.<sup>(10)</sup>

#### **2.5.1.6. Limite de cuantificación.**

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.<sup>(10)</sup>

#### **2.5.1.7. Limite de detección.**

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.<sup>(10)</sup>

## 2.6. Ciprofloxacina.

### 2.6.1. Generalidades.

La ciprofloxacina es un antibacteriano de la clase de las fluoroquinolonas de segunda generación con un amplio espectro de actividad en contra de microorganismos aeróbicos gram negativos y tiene actividad en microorganismos gram positivos. Ésta actividad es debido a la presencia de un átomo de fluor en el sexto carbono y debido a la presencia del anillo piperazínico en el séptimo carbono es también efectivo en contra de muchas cepas de *Pseudomona aeruginosa*. La ciprofloxacina es caracterizada por su alta potencia, ya que la mayoría de los microorganismos tienen un valor de concentración mínima inhibitoria por debajo de 1 µg/mL. La ciprofloxacina posee una farmacocinética más favorable a diferencia de otras fluoroquinolonas permitiendo su uso en infecciones sistémicas. <sup>(2, 19, 38, 39)</sup>

Nombre químico: 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-piperazin-1-quinolina-3-ácido carboxílico. <sup>(38)</sup>

Formula condensada: C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Peso molecular: 331.3 g/mol <sup>(38)</sup>

A continuación se presenta la estructura química del antibiótico ciprofloxacina:

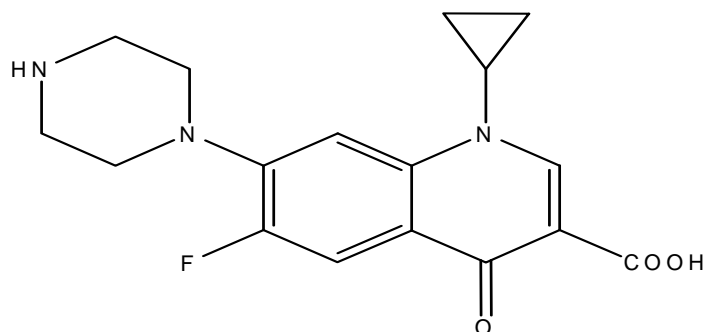


Figura E. Estructura química del antibiótico ciprofloxacina utilizado en el estudio farmacocinético.

La ciprofloxacina es un polvo cristalino casi blanco ó amarillo pálido ligeramente higroscópico. Prácticamente insoluble en agua, muy ligeramente soluble en alcohol dehidratado y diclorometano. Almacenar en contenedores herméticos a temperatura ambiente y proteger de la luz.<sup>(38)</sup>

#### **2.6.1.1. Efectos adversos.**

Disturbios gastrointestinales incluyen: náuseas, vomito, diarrea, dolor abdominal y dispepsia. Se ha reportado raramente colitis pseudomembranosa. Alteraciones sobre el SNC incluyen: dolor de cabeza, mareo y ansiedad. Parestesia y neuropatía periférica han ocurrido ocasionalmente. Anafilaxis ha sido asociada con ciprofloxacina y algunas otras quinolonas antibacterianas.<sup>(2, 19, 39)</sup>

Otros efectos adversos reportados para ciprofloxacina incluye: un incremento transitorio de creatinina sérica y nitrógeno ureico en sangre. Alteraciones hematológicas incluye: eosinofilia, leucopenia, trombocitopenia y muy raramente pancitopenia, anemia hemolítica y agranulocitosis. Efectos cardiovasculares incluye: taquicardia, edema, síncope, ruborización y sudoración.<sup>(2, 19, 39)</sup>

### **2.6.1.2. Precauciones.**

La ciprofloxacina debe ser utilizada con precaución en pacientes con epilepsia ó con antecedentes de desordenes en el SNC (sistema nervioso central), así como en pacientes con una función renal ó hepática alterada. Información autorizada en la unión europea afirma que las quinolonas no deben ser utilizadas en niños, adolescentes, mujeres embarazadas ó en etapa de lactancia. Un daño a nivel de tendón puede ocurrir raramente con el uso de las quinolonas y glucocorticoides, particularmente en la poblacion geriátrica, y el tratamiento debe ser suspendido si el paciente experimenta dolor, inflamación ó ruptura en tendón.<sup>(2, 38)</sup>

### **2.6.1.3. Interacciones.**

Se conoce que las fluoroquinolonas inhiben el metabolismo hepático de fármacos y puede también interferir en el aclaramiento de éstos, tal como la teofilina que es metabolizada por el hígado. Cationes tales como aluminio, magnesio y hierro reducen la absorción de la ciprofloxacina. Cambios en la farmacocinética de las fluoroquinolonas ha sido reportada con el uso de antagonistas de la histamina (H<sub>2</sub>), posiblemente debido a cambios en el pH gástrico, pero no parece ser de gran significancia clínica.<sup>(38, 39)</sup>

### **2.6.1.4. Acción antimicrobiana.**

La ciprofloxacina es un bactericida y actúa inhibiendo la subunidad A de la enzima DNA girasa (topoisomerasa) la cual es esencial en la reproducción del DNA bacteriano. La ciprofloxacina tiene una actividad de amplio espectro y es más

potente *in vitro* que las quinolonas que no contienen un grupo fluor, como el ácido nalidíxico. La actividad puede verse reducida en medio ácido.<sup>(2, 38)</sup>

#### **2.6.1.5. Farmacocinética.**

La ciprofloxacina es rápidamente y bien absorbida en el tracto gastrointestinal. La biodisponibilidad oral es aproximadamente del 70 % y una  $C_{max}$  en plasma cercano a 2.5  $\mu\text{g/mL}$  se alcanza de 1 a 2 hrs después de una dosis de 500 mg por vía oral. La absorción puede ser demorada por la presencia de alimentos, pero no es afectada sustancialmente. El  $t_{1/2}$  en plasma se encuentra en el rango de 3.5 a 4.5 hrs y hay evidencia de una acumulación modesta.<sup>(2, 19, 38 y 39)</sup>

La vida media puede ser prolongada por una alteración renal, un valor de 8 hrs ha sido reportada en una enfermedad renal en etapa terminal y en algunos casos, en ancianos. Hay información limitada sobre el efecto de un daño hepático, la vida media de ciprofloxacina ha sido reportada que es ligeramente prolongada en pacientes con una cirrosis severa en hígado. Con una ó dos excepciones, muchos estudios han mostrado que la farmacocinética de la ciprofloxacina no es afectada marcadamente por una fibrosis cística.<sup>(2, 19, 38 y 39)</sup>

La unión a proteínas plasmáticas se encuentra en el rango de un 20 a 40 %. La ciprofloxacina es ampliamente distribuida en el cuerpo y la penetración tisular es generalmente buena. Ésta aparece en el fluido cerebro espinal, donde la concentración es cerca del 10 % de aquella obtenida en plasma y también cuando las meninges no están inflamadas. La ciprofloxacina cruza la barrera placentaria y también es distribuida en leche. Concentraciones altas son encontradas en bilis.  
<sup>(2, 19, 38 y 39)</sup>

La ciprofloxacina es eliminada principalmente por excreción urinaria, pero el aclaramiento renal no toma en cuenta que cerca de la tercera parte que se elimina incluye metabolismo hepático, excreción biliar y posiblemente secreción transluminal a través de la mucosa intestinal. Al menos 4 metabolitos activos han sido identificados. Oxociprofloxacina parece ser el metabolito mayoritario en orina y sulfociprofloxacina el metabolito principal en heces.<sup>(2, 19, 38 y 39)</sup>

La excreción urinaria de la ciprofloxacina es por secreción tubular activa y por filtración glomerular y es afectada por el Probenecid, disminuyendo virtualmente a 24 hrs. Cerca del 40 al 50 % de una dosis oral es excretada sin cambios en la orina y cerca del 15 % como metabolitos. Por arriba del 70 % de una dosis parenteral puede ser excretada sin cambios en 24 hrs y el 10 % como metabolitos. Solamente cantidades pequeñas de ciprofloxacina son removidas por hemodiálisis ó por diálisis peritoneal.<sup>(2, 19, 38 y 39)</sup>

La disposición de ciprofloxacina después de una administración intravenosa en pollos utilizando una dosis de 5 mg/kg, determinó un  $t_{1/2}$  de 3.11 $\pm$ 0.25 hrs, un  $ABC\alpha$  de 5.67 $\pm$ 0.52  $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ , un CI de 15.45 $\pm$ 1.63 mL/min/kg y un Vd de 4.04 $\pm$ 0.69 L/kg.<sup>(19)</sup>

Por otro lado la disposición de ciprofloxacina posterior a una administración intravenosa en gatos utilizando una dosis de 10 mg/kg estimó, un  $t_{1/2}$  de 4.53 $\pm$ 0.74 hrs, un  $ABC\alpha$  de 17.20 $\pm$ 5.13  $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ , un CI de 0.64 $\pm$ 0.28 L/hr\*kg y un Vd de 3.85 $\pm$ 1.34 L/kg.<sup>(2)</sup>

#### **2.6.1.6. Usos y administración.**

La ciprofloxacina ha sido utilizada en el tratamiento de un amplio rango de infecciones, incluyendo: ántrax, infecciones en el tracto biliar, infecciones en

huesos y articulaciones, exacerbaciones de una fibrosis cística, gastroenteritis. También en el tratamiento de Gonorrea, otitis externa y media, peritonitis, fiebre Q, infecciones en el tracto respiratorio bajo, septicemia, infecciones en piel, fiebre tifoidea y paratifoidea, tifus e infecciones en el tracto urinario, entre varias otras.<sup>(38)</sup>

La ciprofloxacina es administrada por vía oral como clorhidrato ó como base, por infusión intravenosa como lactato, en gotas ó ungüento para los ojos como clorhidrato. La dosis oral usual de ciprofloxacina en adultos abarca de 250 a 750 mg, dos veces al día, dependiendo de la severidad y naturaleza de la infección. La dosis usual intravenosa en adultos es de 100 a 400 mg, dos veces al día, a una velocidad de infusión de 30 a 60 minutos, conteniendo el equivalente de 1 a 2 mg/mL. La dosis de ciprofloxacina debe ser reducida en pacientes con un daño renal severo.<sup>(38)</sup>

## **2.7. Lesión traumática de la medula espinal (LTME).**

### **2.7.1. Generalidades de la medula espinal en condición normal.**

La médula espinal es una parte uniformemente organizada del SNC, aunque muchos principios de función medular se aplican a otros niveles del sistema nervioso. En ella se encuentran todas las motoneuronas que inervan los músculos que utilizamos para mover nuestro cuerpo, así como también la mayor parte de las vías eferentes autónomas. También recibe todas las aferencias sensitivas procedentes del cuerpo y parte de la cabeza y lleva a cabo las operaciones del procesamiento inicial de la mayor parte de estas aferencias.<sup>(26)</sup>

La médula espinal de un ser humano adulto tiene una longitud aproximada de sólo 42 a 45 cm y un diámetro alrededor de 1 cm en su punto más ancho, pesa unos



35 g. En la médula espinal humana hay 31 segmentos: 8 cervicales, 12 dorsales, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coxígeo. La médula espinal presenta dos dilataciones, la cervical y la lumbar, la primera que inerva las extremidades superiores, se extiende desde el quinto segmento cervical hasta el primero dorsal (C5 a D1). La segunda también llamada lumbosacra que inerva las extremidades inferiores, se extiende desde el segundo segmento lumbar hasta el tercer segmento sacro (L2 a S3).<sup>(26)</sup>

A continuación se presenta la estructura anatómica de la medula espinal y los distintos sectores que la conforman:

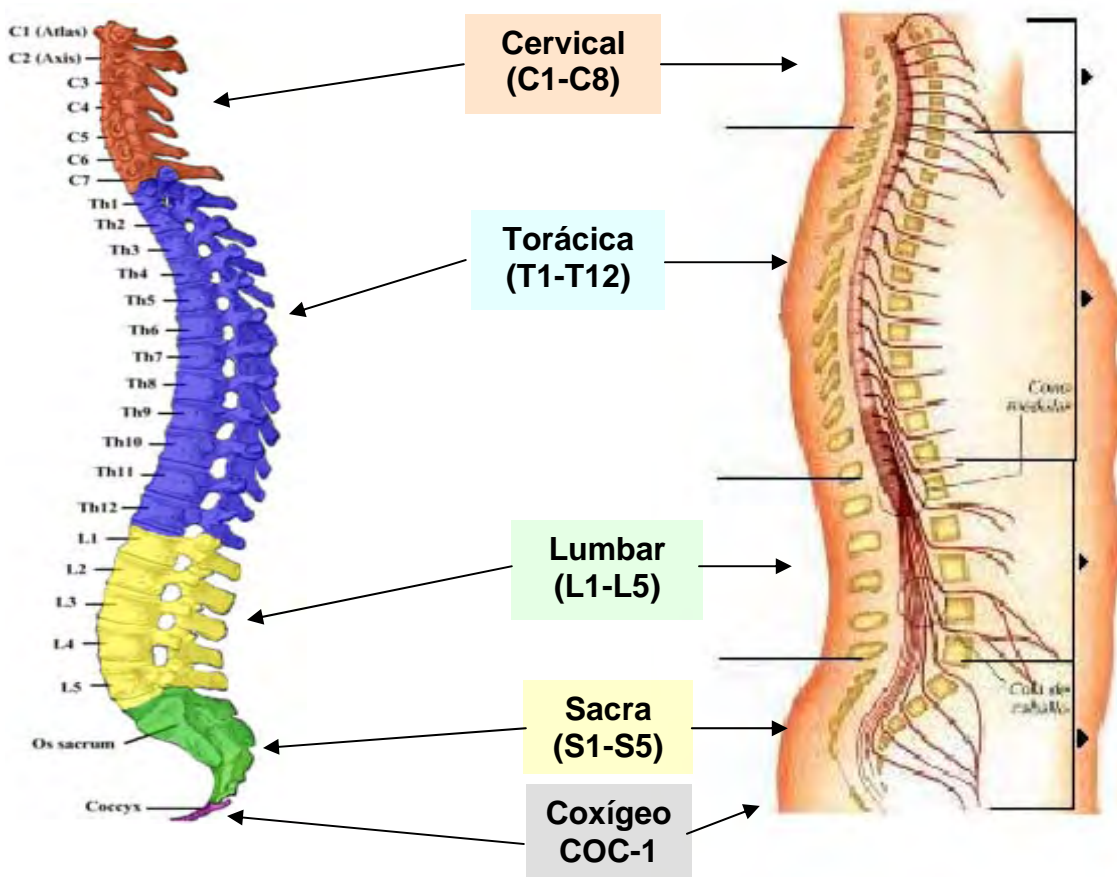


Figura F. Estructura y componentes principales de la medula espinal en condición normal.

La organización interna de la médula espinal permite que muchas funciones operen de modo automático ó reflejo. Además, se establecen extensas conexiones con el encéfalo mediante tractos ascendentes y descendentes de fibras nerviosas que llevan información aferente a centros superiores, mediante los cuales se controlan los mecanismos medulares. La médula espinal ocupa el conducto vertebral ó raquídeo de la columna vertebral, que le proporciona soporte y protección.<sup>(11, 37)</sup>

La médula espinal participa en el procesamiento sensitivo, salidas motoras y reflejos. La médula espinal está conformada por una sustancia gris y una sustancia blanca. La sustancia gris esta conformada por el asta posterior y el asta inferior, la primera, la cual está formada principalmente por interneuronas. Ésta área de la sustancia gris está formada por dos partes principales, la sustancia gelatinosa y el cuerpo del asta posterior, presentes en todos los niveles medulares. La sustancia gelatinosa está relacionada principalmente con fibras sensitivas finamente mielinizadas y no mielinizadas que transportan información del dolor y de la temperatura. El cuerpo del asta posterior está formado principalmente por interneuronas y por células fasciculares que transmiten muchos tipos de información sensitiva somática y visceral.<sup>(26)</sup>

El asta anterior está formada por los cuerpos celulares y las grandes motoneuronas que inervan el músculo esquelético. Éstas motoneuronas alfa, también llamadas motoneuronas inferiores, son el único medio que tiene el sistema nervioso para controlar los movimientos corporales, ya sean voluntarios ó involuntarios, pero únicamente éstas pueden efectuar la contracción muscular. La destrucción de las motoneuronas inferiores que inervan un músculo ó la interrupción de los axones provocan, por lo tanto, una parálisis completa de dicho músculo. Las lesiones de las motoneuronas inferiores producen un tipo de parálisis llamado parálisis flácida, indicando que el miembro está flácido y no contraído. Ya no es posible desencadenar contracciones reflejas, y lentamente el músculo se va atrofiando, esto sucede por ejemplo, en la Poliomielitis.<sup>(26)</sup>

La mayoría de las neuronas sensitivas primarias en el cuerno dorsal liberan glutamato como un neurotransmisor excitatorio de acción rápida sin importar la modalidad sensorial que conduzcan las fibras aferentes. Además de glutamato, muchas neuronas de pequeño calibre en el cuerno dorsal también liberan transmisores neuropeptídicos, en especial sustancia P, somatostatina y péptido intestinal vasoactivo. Se cree que llevan a cabo una transmisión sináptica lenta. Otros neurotransmisores y neuromoduladores (neurotransmisores peptídicos) en la medula espinal incluyen noradrenalina, serotonina, encefalinas, neuropéptido Y, péptido histidil-isoleucina y colecistocinina. Los neuropéptidos son más abundantes en el cuerno dorsal, seguidos en intensidad decreciente por la zona intermedia y el cuerno ventral. La región lumbosacra tiene más neuropéptidos al compararla con otras regiones de la medula espinal.<sup>(1)</sup>

### **2.7.2. Importancia e incidencia de una LTME.**

Una lesión traumática de medula espinal (LTME) es la principal causa de discapacidad, y actualmente no hay un tratamiento aceptado de manera global para éste padecimiento. El decline funcional seguido por una LTME está contribuido tanto, por una lesión mecánica directa y por los mecanismos fisiopatológicos secundarios los cuales son inducidos por el trauma inicial. Éstos mecanismos inicialmente involucran una hemorragia general en el sitio de lesión y una necrosis de los componentes celulares del sistema nervioso central.<sup>(30)</sup>

Una LTME ocurre en la mayoría de los países en un porcentaje anual de 20 a 40 personas por millón. En los Estados Unidos, aproximadamente la suma está por arriba de 10 000 nuevos casos por año, lo cual continuamente se agrega a la nación un estimado de 200 000 cuadriplégicos ó tetraplégicos. Las principales causas del trauma medular son accidentes automovilísticos, deportes y actividades recreacionales de alto riesgo, accidentes relacionados con el trabajo y

caídas de gran altura. La mayoría de las víctimas que sufren una LTME son jóvenes.<sup>(30)</sup>

La manifestación de una LTME tiene grados de variación y es totalmente dependiente de la severidad y del nivel donde se produzca la lesión de la medula espinal. La regla de Thumb es aquella la cual, determina que a medida que se incrementa el nivel de la lesión, las consecuencias son más severas. En el caso de una lesión cervical a un nivel alto, los pacientes requieren de respiración artificial para seguir viviendo. Éste tipo de lesión también conduce a una tetraplejía, alterando la función de los órganos pélvicos y a una pérdida de la función motora y sensitiva de los brazos, tronco y piernas. Lesiones a un nivel medular más bajo, dependiendo otra vez del nivel exacto, puede quedar alguna función de los miembros superiores con una alteración limitada en los miembros más bajos. Éste fenómeno de paraplejía es limitado a lesiones de la medula espinal a un nivel torácico ó lumbar.<sup>(30)</sup>

Las secuelas patológicas seguidas de una LTME en etapa aguda son divididas en dos amplios eventos de manera cronológica, la lesión primaria y la lesión secundaria. La lesión primaria comprende la destrucción focal del tejido neural causado por un traumatismo mecánico directo. Ésta agresión inicial, provoca entonces una señal progresiva a una lesión secundaria, la cual es vía de la activación de una descarga de mecanismos fisiopatológicos dañinos que exacerban la lesión de la medula espinal. Como ésto conduce a la destrucción axonal de los tractos intactos por el trauma inicial, éste es un principal impedimento para recuperar la funcionalidad después de una LTME.<sup>(30)</sup>

### 2.7.3. Fenómenos fisiopatológicos después de una LTME.

La LTME ha capturado el interés de diferentes disciplinas científicas y sociales, como tal la lesión en humanos representa problemas médicos y socioeconómicos de gran magnitud. Su manejo integral es complejo, requiriendo la intervención de equipos multidisciplinarios y tecnología especializada, esto es a partir del momento del accidente, hasta que el sujeto es rehabilitado, generalmente con secuelas neurológicas serias y permanentes. Los porcentajes de morbilidad y mortalidad son considerablemente altos, incluso en centros especializados para tratar una LTME.<sup>(23)</sup>

Algunas alteraciones metabólicas incluyendo aquellas relacionadas con la composición corporal y con el balance de fluidos y electrolitos han sido asociadas a una parálisis a nivel motor y a una subsecuente atrofia muscular. La mayoría de las alteraciones sistémicas y metabólicas son asociadas con disturbios en las funciones reguladas por el sistema nervioso autónomo, y ocurre en la mayoría de los casos como una consecuencia de lesiones severas por arriba de la actividad simpática, es decir, a un nivel T6 y raramente ocurre en aquellas lesiones por debajo de un nivel torácico 10 (T10).<sup>(23)</sup>

Las alteraciones provocadas por la lesión difieren entre las distintas etapas, es decir, aguda, subaguda y la crónica. Aparentemente, las alteraciones iniciales pudieran estar relacionadas con la pérdida de la actividad espinal refleja por debajo e inmediatamente por arriba del nivel de la lesión, en la etapa conocida como choque espinal. En la etapa posterior, es decir crónica, la disfunción podría estar asociada con cambios plásticos en la medula espinal y otros tejidos.<sup>(23)</sup>

Inmediatamente después de la lesión, hay una pérdida progresiva del peso corporal, con un balance de nitrógeno negativo obligatorio, el cual no es modificado con una administración proteica, incluso ni con una toma calórica

agresiva. En ésta etapa de la lesión hay también un incremento relativo del volumen del fluido extracelular con respecto al volumen del fluido intracelular. En la etapa crónica, la masa corporal magra, es decir, libre de grasas disminuye e incrementa la masa grasa, y en la mayoría de los casos una hiponatremia crónica persiste. La principal consecuencia de desconexión de los centros espinales autónomos partiendo del control cerebral, incluye entre otros, una disfunción de los sistemas cardiovascular, gastrointestinal, renal, endocrino e inmune.<sup>(23)</sup>

De las alteraciones cardiovasculares iniciales, se presenta bradicardia e hipotensión. Éstas han sido atribuidas al desbalance autónomo agudo debido a la predominancia de la actividad parasimpática (vagal) y a una pérdida del tono simpático. En la etapa posterior de la lesión, la bradicardia usualmente persiste, asociada con una inestabilidad en la presión sanguínea y caracterizada por una hipotensión postural y una hipertensión episódica. Lo anterior es conocido como disreflexia ó hiperreflexia autónoma, un síndrome que es iniciado por estímulos dañinos por debajo del nivel de la lesión.<sup>(23)</sup>

Ya que los pacientes con una LTME a un nivel alto son usualmente hipotensivos, la presión sanguínea alta que desarrollan durante la disreflexia autónoma, representa cambios en la presión sanguínea de una magnitud que pudiera causar un accidente cerebrovascular y muerte. Adicionalmente, la progresión y severidad de una enfermedad arterial coronaria, ocurre en sujetos con una LTME en edades más tempranas comparándolos con sujetos sanos, probablemente por una disminución en el nivel de la actividad y por los cambios adversos en la composición corporal asociados con las alteraciones metabólicas profundas.<sup>(23)</sup>

La disfunción del tracto gastrointestinal es una de las muchas alteraciones que resultan de una LTME. Durante la etapa de choque espinal, la principal alteración está relacionada con una motilidad muy baja del tracto, que en muchos casos llega a ser paralizado (ileon). En la etapa crónica cerca del 30% de los pacientes tienen problemas gastrointestinales de forma significativa, lo cual la calidad de

vida está alterada; todo relacionado con un tránsito gastrointestinal prolongado y un vaciamiento gástrico mucho más lento. Los principales síntomas son: malestar abdominal, distensión abdominal, constipación y dificultad para evacuar. Los síntomas derivados de una esofagitis y gastritis (acidez, dolor torácico esofágico y una disfagia intermitente) también tienen una incidencia más alta.<sup>(23)</sup>

En una lesión aguda, el flujo plasmático renal significativamente decreta de manera efectiva. Generalmente es disminuido en personas con una lesión a nivel cervical que en sujetos parapléjicos, y es más grave en mujeres y pacientes en edad más avanzada que en hombres y pacientes más jóvenes. La depuración renal incrementa significativamente durante los dos primeros años posterior a la lesión y después disminuye significativamente. En conjunto, hay un pequeño cambio en la función renal en etapas posteriores a la lesión. La función renal es preservada adecuadamente en la mayoría de las personas. Solo cerca del 10 % de los pacientes tienen algún deterioro de moderado a severo en la función renal, frecuentemente asociado con patologías concomitantes incluyendo un reflujo vesicouretral, cálculos renales, pielonefritis recurrente y una úlcera en decúbito recurrente.<sup>(23)</sup>

A continuación se presenta dos cuadros resumidos de todas las alteraciones metabólicas y sistémicas que se suscitan posteriores a una LTME:

<b>Sistema alterado</b>	<b>Etapa inicial de la lesión (choque espinal)</b>	<b>Etapa posterior de la lesión (etapa crónica)</b>
<b>Composición corporal</b>	Perdida progresiva del peso corporal con balance de nitrógeno negativo obligatorio	Disminuye la masa corporal magra e incrementa la masa grasa
<b>Balance de fluidos y electrolitos</b>	Incremento relativo del volumen del fluido extracelular con respecto al volumen del fluido intracelular	Hiponatremia

Cuadro A. Principales cambios metabólicos asociados a una parálisis motora y atrofia muscular después de una lesión de la médula espinal.<sup>(23)</sup>

<b>Sistema alterado</b>	<b>Etapa inicial de la lesión (choque espinal)</b>	<b>Etapa posterior de la lesión (etapa crónica)</b>
<b>Cardiovascular</b>	Bradycardia e hipotensión	Bradycardia, hipotensión postural, hipertensión episódica (disreflexia autónoma) y enfermedad arterial coronaria en edad más temprana con relación a la población sana
<b>Gastrointestinal</b>	Motilidad muy baja del tracto gastrointestinal (ileon)	Transito gastrointestinal prolongado (distensión abdominal, constipación), dificultad en la evacuación intestinal, esofagitis y gastritis
<b>Renal</b>	Decremento en el flujo plasmático renal efectivo, incremento del aclaramiento renal	Aclaramiento renal disminuido, fallo renal asociado con patologías concomitantes
<b>Endocrino y Metabólico</b>	Niveles disminuidos en plasma : hormona paratiroidea, hormonas tiroideas, albúmina y vitamina D	Niveles de plasma disminuidos: hormonas tiroideas, noradrenalina, hormona lutenizante y estimulante del folículo
	Niveles incrementados en plasma : fósforo, prolactina, hormona antidiurética, ACTH y enzimas hepáticas	Desordenes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en edad más temprana con respecto a la población sana e incluye: hiperinsulinemia (estado acentuado de resistencia a la insulina, disminución del gasto hepático de la glucosa, depresión de lipoproteínas de alta densidad y elevación de lipoproteínas de baja densidad
<b>Inmune</b>	Inmunodepresión: Disminución de las respuestas inmunes natural (células NK) y adaptiva (células T) Alteración de la función fagocítica de Neutrófilos circulantes	Niveles de plasma elevados: IL-6, IL-2R y ICAM-1 (pacientes con una cicatrización lenta en ulceración en decúbito

Cuadro B. Principales consecuencias de desconexión de los centros espinales autónomos a partir del control supraespinal después de una lesión de la medula espinal.<sup>(23)</sup>



Un traumatismo mecánico de la médula espinal conlleva a que se presente una necrosis tisular y pérdida de la función. Muchos axones son dañados directamente por la deformación física de la medula espinal, conocido el evento como lesión primaria. Sin embargo un gran número de axones son perdidos como resultado de una variedad de eventos químicos y celulares que son iniciados por el traumatismo mecánico inicial, conocido el evento como lesión secundaria.<sup>(3)</sup>

Los cambios químicos y celulares secundarios que ocurren en un tejido traumatizado de la médula espinal incluye una hidrólisis lipídica enzimática con una producción resultante de eicosanoides, una peroxidación lipídica, una pérdida de calcio en el espacio extracelular y una elevación de calcio en el espacio intracelular, una acumulación de potasio en el espacio extracelular, un incremento de sodio y un decremento de magnesio tisular total, una disminución de la actividad de la bomba sodio-potasio ATPasa, un incremento de la actividad neutral de proteasas, una acumulación de aminoácidos excitatorios, quininas, serotonina y dinorfinas, una isquemia con una declinación resultante de la tensión de oxígeno tisular, que resulta de un metabolismo energético disminuido y por tal una acidosis láctica, un incremento en la permeabilidad vascular, que da por resultado edema, y por último una inflamación con neuronofagia por leucocitos polimorfonucleares (PMN).<sup>(3)</sup>

Como ya se dijo una hipotensión ocurre inmediatamente después de una LTME experimental y ha sido atribuido a una pérdida del manejo excitatorio supraespinal tónico de las neuronas simpáticas espinales. Sin embargo, éste fenómeno puede ser no solamente el mecanismo involucrado en las alteraciones hemodinámicas iniciales después de una LTME, ya que una entrada colinérgica potente conduce a una liberación de óxido nítrico y la vasodilatación que se presenta parece explicar la hipotensión. La influencia autónoma en la frecuencia cardíaca es de tal naturaleza que hay una predominancia  $\beta$ -adrenérgica más fuerte que la actividad muscarínica.<sup>(4)</sup>

Sin embargo, una bradicardia ha sido registrada en humanos después de una LTME en intervalos de tiempo muy variados. Varios disturbios cardiovasculares han sido reportadas en diferentes especies incluyendo, perros y primates, después de una LTME en la fase inicial.<sup>(4)</sup>

Se ha mencionado, que probablemente un pretratamiento con un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, como lo es el éster metil N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina, completamente suprime los efectos de la presión arterial y frecuencia cardíaca producidos por una LTME. El estudio ha sugerido que después de una LTME la disminución de la presión arterial promedio y la frecuencia cardíaca es probablemente debido a la liberación de acetilcolina de las fibras parasimpáticas y a la síntesis de óxido nítrico de la fuente endotelial, posiblemente por una estimulación colinérgica. Adicionalmente la presión arterial promedio se incrementa debido factiblemente a una vasoconstricción refleja compensatoria.<sup>(4)</sup>

Por lo tanto, después de una LTME hay tanto una disminución de la descarga simpática y un incremento en la estimulación de la actividad parasimpática. Éste efecto resulta de una presión arterial promedio disminuida inicialmente, seguido por un incremento de larga duración (cerca de 20 minutos), probablemente de naturaleza refleja. Así de este modo, éste mecanismo se debe a que las glándulas adrenales liberan catecolaminas en la circulación, produciendo una vasoconstricción y estimula al miocardio resultando en una elevación de la presión arterial promedio inducida por una LTME.<sup>(5)</sup>

En la vasculatura, el óxido nítrico liberado de las células endoteliales, parece ser principalmente un resultado de una afluencia de los niveles de Ca<sup>+2</sup> intracelular. Así de ésta manera, cualquier agente ó estímulo capaz de estimular una afluencia de Ca<sup>+2</sup> en la célula, por ejemplo, acetilcolina, bradicininas, corriente eléctrica ó una fuerza de corte, pueden provocar una activación de la biosíntesis de óxido nítrico y estar involucrado en la vasodilatación. Recientes encuentros han demostrado que el óxido nítrico es el segundo mensajero más importante

involucrado en la mediación de las acciones neurotransmisoras en el sistema cardiovascular y sistema nervioso central.<sup>(5)</sup>

Las lesiones por arriba del segmento medio-torácico ocasionan una disfunción tanto del control simpático tónico y reflejo de la presión arterial promedio. El control cardiovascular es anormal e inestable después de una LTME. Es bien conocido que la frecuencia cardíaca está bajo un control neural dual simpático y parasimpático. Una hipotensión ocurre inmediatamente después de una lesión y ha sido atribuido a un desbalance autónomo agudo debido a la predominancia de la actividad parasimpática y pérdida del tono simpático. Una hipertensión episódica a menudo se desarrolla posteriormente como parte de la condición definida como disreflexia autónoma. Ésta hipertensión es causada por estimulación aferente por debajo del nivel de la lesión y puede ser severa, algunas veces conduce a una hemorragia cerebral, ataques y muerte.<sup>(4, 5)</sup>

Una LTME no es un estado estático. La lesión primaria debido a un traumatismo mecánico es seguida por una lesión secundaria, la cual incrementa el daño neural original. Ésta lesión secundaria ha sido atribuida a la presencia de múltiples sustancias endógenas tóxicas liberadas por las neuronas lesionadas dentro del área afectada como también una disfunción de la microcirculación.<sup>(13)</sup>

La presión sanguínea inestable del paciente tetrapléjico es expuesta por ciertos estímulos que causan hipertensión refleja, perfusión facial y riesgo de infarto. Ésta reacción es efectuada a través de la constricción de la microvasculatura tan evidenciada por una disminución en la temperatura corporal por debajo del nivel de la parálisis. Similarmente, la inestabilidad es evidente como una hipotensión postural, complicada por una función cerebral y renal comprometida. Se tiene la hipótesis de que la interrupción del tracto simpático de la medula espinal a nivel cervical, como en una tetraplejía severa, provoca un control vasomotor inestable de la microcirculación, incluso en ausencia de estímulos dañinos y cambios en la

composición corporal. Es cierto que el flujo sanguíneo microvascular es menos inestable cuando la lesión cervical es incompleta.<sup>(13)</sup>

Una LTME provoca cambios severos dentro de los miembros afectados. Con varios meses de lesión, la masa muscular esquelética y el tamaño de la fibra muscular representan una disminución en comparación con sujetos sanos. Estas adaptaciones en la circulación periférica y músculo esquelético, pueden contribuir a una enfermedad de riesgo cardiovascular incrementado en pacientes con LTME. En pacientes que presentan una lesión incompleta en la medula espinal, retienen alguna función motora y de sensibilidad en los miembros afectados.<sup>(28)</sup>

Las lesiones incompletas están asociadas con una estabilización más rápida después del trauma medular y se tiene una mayor probabilidad de recuperación que en una lesión completa. Importante decir que muy pocas investigaciones se han aplicado en individuos con lesiones incompletas. Se puede predecir, que individuos que presentan una LTME incompleta, mostrarán, déficits similares en el flujo sanguíneo, al igual que individuos que tienen una LTME completa, aunque tal vez, de menor magnitud. Finalmente pacientes con una LTME incompleta tendrán dificultad de ejercer una intensidad adecuada para estimular el flujo sanguíneo máximo.<sup>(28)</sup>

Hay varias consecuencias que dan como resultado un control vascular anormal en pacientes con una LTME incompleta. La primera, que ésta puede contribuir a una insensibilidad a la insulina y a una hipertensión. La segunda, que ésta puede disminuir la distribución ó reparto de oxígeno y contribuir a una fatiga muscular. Sin embargo, se ha sugerido que pacientes con una LTME incompleta no muestran una alteración en la capacidad de flujo tan visualizada como en pacientes con una LTME completa, sugiriendo que las anormalidades cardiovasculares son menos significativas. El control vascular alterado puede actuar como limitante en la capacidad de ejercicio y puede contribuir a una enfermedad cardiovascular incrementada.<sup>(28)</sup>

La isquemia es un mecanismo terminal, común en la mayoría de las lesiones de la medula espinal y cambios vasculares están directamente involucrados en éste proceso. En varios modelos experimentales en humanos con LTME, la administración inicial de nimodipino, redujo la presión arterial promedio con un incremento en el flujo sanguíneo de la medula espinal en la proximidad de la lesión comparándolo con un placebo, pero el beneficio en términos de recuperación neurológica sigue aún sin ser demostrada.<sup>(29)</sup>

Como se ha mencionado una lesión traumática de medula espinal (LTME) es una aflicción catastrófica que resulta no solamente un perjuicio ó alteración de la sensibilidad y la actividad motora por debajo del sitio de lesión, también produce alteraciones metabólicas y sistémicas importantes. La disfunción del sistema nervioso autónomo resulta de cambios hemodinámicos, los cuales pueden influir en la disposición del fármaco, y particularmente podría ser importante éste evento, durante la fase aguda de una LTME, donde los pacientes reciben un número importante de fármacos incluyendo agentes neuroprotectores, tales como la metilprednisolona, anticoagulantes, agentes vasopresores y vasodilatadores y fármacos para disminuir los niveles de glucosa y los niveles de lípidos. Como se mencionó previamente en la etapa conocida como choque espinal, se presenta un volumen de circulación bajo, alteraciones cardiovasculares y una disminución importante en la distribución del flujo sanguíneo hacia órganos vitales, incluyendo al hígado, conduciendo de igual forma a cambios significativos en la distribución y eliminación del fármaco, particularmente para fármacos de alta extracción.<sup>(12)</sup>

Finalmente se puede mencionar que las principales causas de trauma en la médula espinal son accidentes automovilísticos, por actividades deportivas ó recreativas de alto riesgo y por caídas bruscas, también otra proporción de lesiones en médula espinal surgen de la fractura ó dislocación de la columna vertebral, más comúnmente ésta surge debido a la compresión con flexión de la médula torácica e hiperextensión ó flexión de la medula cervical. De manera más importante se puede decir que la mayoría de las victimas que sufren una LTME

son gente joven y otros considerados como sanos, siendo el costo del tratamiento considerablemente costoso.<sup>(30)</sup>

#### **2.7.4. Alteraciones farmacocinéticas posterior a una LTME.**

Hay evidencia de que la biodisponibilidad oral de algunos fármacos esta alterada en presencia de una LTME, para analgésicos antiinflamatorios no esteroídeos (AINES), tal como el paracetamol, cuya biodisponibilidad oral está reducida en pacientes en etapa crónica con lesión medular<sup>(17, 18)</sup>. Los resultados anteriores no se contradicen con los obtenidos utilizando un modelo experimental de LTME en ratas, sugiriendo que la reducción en la biodisponibilidad oral del paracetamol es probablemente debido a una alteración en el vaciamiento gástrico. Hay evidencia de que el vaciamiento gástrico es alterado en una LTME, probablemente a una estimulación en la liberación de óxido nítrico, resultando en una inhibición de la motilidad gastrointestinal.<sup>(14, 15)</sup>

No solamente cambios en la biodisponibilidad de AINES se han observado en pacientes con lesión medular, para otro tipo de fármacos, tales como la teofilina, dantroleno, aminoglucósidos, y lorazepam, también se reportan significantes alteraciones en pacientes con LTME en comparación con sujetos sanos, también se ha documentado una reducción significativa en la depuración del lorazepam en pacientes que presentan una LTME, sugiriendo una alteración en la capacidad metabólica del hígado ó cambios en el flujo sanguíneo del hígado. Además, estudios experimentales han documentado que la vida media de eliminación de la ciclosporina, acetaminofén, y diclofenaco puede ser prolongada en una LTME en estado agudo.<sup>(12)</sup>

La farmacocinética de un agente inmunosupresivo como la ciclosporina-A (CsA) utilizado en medicina clínica en pacientes con lesión medular, fue estudiada en

ratas sometidas a una LTME. En la etapa aguda (24 hrs después de una LTME) la biodisponibilidad (F) de CsA por vía intraperitoneal fue incrementada, y la vida media se prolongó, sin embargo la F por vía oral fue disminuida. Siete semanas después de la LTME (etapa crónica) la F de CsA en ambas rutas de administración no fue significativamente diferente con respecto a los valores de los controles. Los resultados indicaron que la F parenteral se incrementa probablemente por una alteración en la eliminación del fármaco en tanto la disminución de la F oral se atribuye a una reducción de la absorción de CsA a nivel gastrointestinal que predominó sobre los mecanismos alterados en la distribución y eliminación del fármaco.<sup>(24)</sup>

La influencia de una LTME en etapa crónica sobre la disposición de amikacina fue estudiada en humanos, mostrando que el Vd en estado estacionario, la vida media y el tiempo medio de residencia de la amikacina fueron incrementados con respecto a su valor control.<sup>(32)</sup>

Por otro lado la biodisponibilidad de gentamicina administrada por vía intramuscular presentó una absorción demorada y una  $C_{max}$  disminuida en suero de sujetos con una LTME, probablemente causado por una disminución en el flujo sanguíneo muscular, dado que la disminución del flujo sanguíneo es característico de un músculo paralizado, lo cual da por resultado una eficacia baja del fármaco administrado por ésta vía.<sup>(35)</sup>

Utilizando métodos experimentales por sección y compresión para provocar una LTME, se observaron alteraciones ligeras en la biodisponibilidad de salicilato después de una administración oral de aspirina a un nivel T8. La velocidad, pero no la cantidad de absorción de la aspirina parece ser significativamente afectada después de una LTME. El efecto de una LTME sobre la absorción de la aspirina en el tracto gastrointestinal es alterada en menor grado con respecto a la absorción del paracetamol. Es por lo tanto probable que los procesos fisiopatológicos resultantes en la biodisponibilidad del salicilato durante la fase

aguda de la LTME dependa solamente de la disfunción de la transmisión nerviosa a través de la medula espinal.<sup>(14)</sup>

Por último los estudios anteriores evidencian el hecho que una LTME puede cambiar la cinética de absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco. No obstante, los estudios realizados en el efecto de una LTME sobre la farmacocinética de fármacos tanto en clínica como en modelos experimentales en animales, no ha sido suficientemente estudiado para entender y comprender adecuadamente los mecanismos involucrados en tales alteraciones <sup>(12)</sup>, de tal forma que pese a la evidencia significativa en los cambios farmacocinéticos en una LTME, el criterio y estrategias para optimizar la terapia en éste tipo de pacientes son rara vez basados en principios racionales. Las estrategias del tratamiento son extrapoladas, a menudo sin criterio documental, basándose en la experiencia clínica con personas sanas.<sup>(12, 14, 16)</sup>



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Una lesión traumática de medula espinal (LTME) es un padecimiento importante en materia de salud que pone en riesgo la vida de los pacientes, sobre todo en fase aguda. Los pacientes que llegan a sobrevivir llevan a cabo una serie de secuelas incapacitantes con devastadoras repercusiones personales, familiares, sociales y económicas. Alrededor del 40% de las lesiones son consideradas como completas, lo cual produce pérdida de las funciones motora, sensitiva y autónoma por debajo del sitio de la lesión. El resto de las lesiones son incompletas y se caracterizan por presentar grados variables de sensibilidad y movimiento por debajo del sitio afectado.<sup>(28)</sup>

Una LTME completa provoca alteraciones sistémicas, metabólicas, cardiovasculares, respiratorias, gastrointestinales, renales, deprime el sistema inmunológico e induce una disfunción del sistema nervioso autónomo promoviendo cambios hemodinámicos, los cuales pueden influir en la disposición de algunos fármacos. Así de éste modo, una LTME parece modificar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco, dependiendo no solamente de las características fisicoquímicas del fármaco y vía de administración, también dependerá del nivel, intensidad y tiempo posterior a la lesión, tal como lo reportan varios autores en estudios clínicos experimentales.<sup>(12,14 y 16)</sup>

La ciprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro utilizado para infecciones urinarias, una complicación que se presenta con mayor frecuencia en pacientes que sufren una LTME. Debido a esto, es el interés del estudio, el conocer si una LTME, con diferentes intensidades (diferentes porcentajes de compresión medular) y diferentes estados de la misma (tiempo transcurrido posterior a una LTME), modifica la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa a primates no humanos utilizando una dosis de 10 mg/kg a una velocidad de 30 mL/min.

Los estudios clínicos reportando la farmacocinética de algunos fármacos en presencia de una LTME han sido realizados sólo en la etapa crónica de la lesión con dificultad extrema y de forma poco sistemática. Ésta dificultad importante, es debido a la variabilidad interindividual de los pacientes con respecto a la intensidad y al nivel de la lesión, así como también, del tiempo transcurrido posterior al traumatismo. Por lo tanto, el uso de modelos experimentales en animales parece ser una estrategia conveniente para tener un mayor entendimiento de las alteraciones farmacocinéticas y mecanismos fisiopatológicos involucrados, debidos a una LTME. <sup>(12, 14 y 16)</sup>

Hasta el momento en el Centro de Investigación Proyecto Camina, el estudio de las alteraciones farmacocinéticas atribuidas a una lesión medular se han realizado de forma sistematizada en un modelo experimental de LTME aplicado en ratas, <sup>(12, 14, 16-18 y 24)</sup> con la finalidad de ampliar las expectativas de contribución al conocimiento y el impacto de los resultados sobre la farmacoterapia en pacientes con lesión medular.

Debido a que varias de las maniobras terapéuticas empleadas hasta el momento han resultado prometedoras en los animales de experimentación (ratas). El presente proyecto se desarrolló usando primates no humanos (Monos Rhesus *Macaca Mulata*), y se espera que en un futuro no muy lejano algunas de éstas estrategias puedan aplicarse directamente a pacientes que presentan una LTME y por ende, establecer los regímenes de dosificación adecuados para cada fármaco utilizado por éstos individuos, y lo más importante que se cumpla con el objetivo terapéutico deseado y se disminuya cualquier riesgo de toxicidad del fármaco en el individuo. El presente estudio farmacocinético clínico se realizó en los Laboratorios de Proyecto Camina cuyo objetivo es la investigación de las alteraciones fisiopatológicas posterior a una LTME y por ende mejorar la calidad de vida del individuo que presenta éste padecimiento.

#### **IV. OBJETIVOS.**

##### **Objetivo General:**

Evaluar la influencia del porcentaje de compresión para generar una lesión de medula espinal y el tiempo transcurrido posterior al traumatismo mecánico sobre la farmacocinética de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa en primates no humanos.

##### **Objetivos Particulares:**

- Determinar la influencia de la Intensidad de compresión medular (por ciento de inflación del globo epidural) sobre los posibles mecanismos fisiopatológicos que provocan una farmacocinética alterada de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa en primates no humanos.
  
- Determinar la influencia del tiempo posterior a la lesión traumática de medula espinal sobre los eventos químicos y celulares que conllevan a una alteración en la farmacocinética de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa primates no humanos.

## **V. HIPÓTESIS.**

La alteración de la farmacocinética de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa a primates no humanos con LTME dependerá de la intensidad de la lesión (por ciento de inflación del globo epidural: 100 % Severa, 75 % Moderada y 50 % Leve) como del tiempo transcurrido (24 hrs, 15 Días y 2 Meses) posterior al traumatismo medular.

## VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### **Tipo de Estudio:**

Experimental, Prospectivo y Longitudinal.

### **Población:**

Se utilizaron tres primates, tipo mono Rhesus *Macaca Mulata*, machos que pesaron entre 5 y 7 Kg, y cuyas edades estuvieron en el rango de 3 a 10 años.

### **Criterios de Inclusión:**

Primates no humanos sanos, de la especie requerida, en el intervalo de peso y edad mencionados previamente, física y clínicamente sanos.

### **Criterios de Exclusión:**

Reacciones adversas al medicamento en el momento de su administración en los primates durante las distintas fases de estudio. Que el porcentaje de compresión medular aplicado no sea el idóneo y no provoque una lesión completa y permanente después del proceso quirúrgico en los primates no humanos en estudio.

### **Variable Independiente:**

#### Tipo de lesión:

Lesión completa a un nivel de la vértebra torácica 9 (T9).

## **Variables Dependientes ó de respuesta:**

### Grado ó Intensidad de lesión:

Severa (100% de compresión medular).

Moderada (75% de compresión medular).

Leve (50% de compresión medular).

### Tiempo de la lesión:

24 horas post-lesión.

15 días post-lesión.

2 meses post-lesión.

## **6.1. Material:**

- ✓ Vasos de precipitado de 250, 500 y 1000mL.
- ✓ Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL.
- ✓ Matraces volumétricos de 10, 50 y 1000 mL.
- ✓ Probetas graduadas de 100, 500 y 1000 mL.
- ✓ Pipetas semiautomáticas Eppendorf.
- ✓ Tubos Eppendorf.
- ✓ Papel glassin.
- ✓ Espátula de acero inoxidable.
- ✓ Frascos de plástico opalescentes de 20 mL.
- ✓ Jeringas de 10 mL.
- ✓ Gradilla.

## 6.2. Reactivos:

- ✓ Acetonitrilo, J. T. Baker, grado HPLC, varios lotes.
- ✓ Ciprofloxacina Clorhidrato, estándar secundario Lote 6700047004.
- ✓ Enrofloxacin, estándar secundario, lote 04-02-6017.
- ✓ Trietanolamina, productos químicos monterrey lote 005136.
- ✓ Ácido perclórico, Baker analizado, fecha de caducidad, enero 2007.
- ✓ Metanol, J. T. Baker, grado HPLC, varios lotes.
- ✓ Ácido fosfórico 85%, grado HPLC, Fischer Scientific, lote 872923.
- ✓ Heparina, varios lotes.
- ✓ Tiras indicadoras de pH, Merck, lote OC317128.
- ✓ Plasma de tres primates no humanos antes y después de la LTME.

## 6.3. Equipo e instrumentación:

- ✓ Balanza analítica Ohaus.
- ✓ Bomba para vacío.
- ✓ Equipo de filtración Millipore.
- ✓ Membranas de filtración Millipore con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Parrilla de agitación (Vortex).
- ✓ Centrífuga Fischer Scientific Maratón 26 KM.
- ✓ Equipo desionizador de agua System Milli-Q Water Millipore.
- ✓ Cromatógrafo de líquidos Waters:
- ✓ Detector Waters 486.
- ✓ Bomba Waters 510.
- ✓ Precolumna Waters.

- ✓ Inyector Manual.
- ✓ Columna Zorbax SB-C18 4.6 x 75 mm 3.5  $\mu$ m.
- ✓ Silla de contención para los primates sometidos al estudio.
- ✓ Catéter Fogarty Edwards para embolectomía de doble lumen, calibre 6 FR, longitud 80 cm con capacidad de inflado de balón de 1.4 mL de líquido.
- ✓ Catéteres de polietileno del No. 20.
- ✓ Equipo de Venoclisis.
- ✓ Cronómetro.

#### **6.4. Parte experimental.**

##### **6.4.1. Manejo de los primates sometidos a investigación.**

###### **6.4.1.1. Antes del tratamiento quirúrgico.**

a) Confinamiento: Los primates previamente adiestrados para el estudio (dos semanas antes), con un ayuno de 12 horas, se colocaron en una silla de contención para el estudio farmacocinético. Se canalizaron, para la toma de muestra y administración del fármaco, en una de las venas de cada una de las extremidades superiores, usando un catéter de polietileno del No. 20.

b) Administración del fármaco: La ciprofloxacina se administró por infusión intravenosa a una dosis de 10 mg/Kg de peso, por un intervalo de 30 minutos, a través de un equipo de venoclisis.

c) Toma de muestra: Se tomaron dos muestras (normal y bis) de 1.0 a 1.5 mL de sangre, antes de la administración del fármaco y a los tiempos de 7.5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480 y 600 minutos después de la administración de la ciprofloxacina. Las muestras fueron recibidas en tubos



ependorf con 100 µL de heparina previamente adicionada para separar el plasma respectivo por centrifugación y una vez obtenido, mantenerlo en congelamiento a -20 °C hasta el momento de su análisis.

#### **6.4.1.2. Después del tratamiento quirúrgico.**

® Anestesia: La anestesia general inhalatoria utilizada para cirugías mayores, consistió en la utilización de tiletamina-zolacepam (Zoletil®) como inductor para intubación endotraqueal (3mg/Kg) y se mantuvo con isofluorano al 2%. Se monitorearon sus constantes fisiológicas (frecuencia cardiaca F.C., frecuencia respiratoria F.R., tensión arterial T.A., temperatura y saturación de oxígeno) a través de un monitor cardiaco.

b) Cirugía con lesión y cuidados: Bajo condiciones estériles se realizó una incisión longitudinal a nivel de la vértebra torácica T11, hasta exponer la médula a través de una laminectomía. Se insertó un catéter Fogarty calibre 6 FR, con una guía rígida y se dirigió hacia la vértebra torácica T9 a través del espacio epidural. De esta manera el catéter quedó en el espacio epidural, en posición dorso-central respecto a la médula espinal y con el globo desinflado en la porción central de la vértebra torácica T9, mismo que se infló de manera súbita con el volumen de líquido determinado, de tal manera que su diámetro fuera igual a la distancia antero-posterior del canal raquídeo (medido en cada animal con tomografía) para producir el porcentaje de compresión medular establecido para cada primate. Se dejó inflado durante 5 minutos, posteriormente se desinfló, se retiró el catéter y se suturó la incisión por planos anatómicos. Cada primate fue colocado en jaulas individuales, la vejiga y el intestino se vaciaron en forma manual. Se alimentaron con *pellets*, frutas y semillas dos veces al día, así como con agua *ad libitum*.

C) Confinamiento: Los primates ya intervenidos quirúrgicamente y con un ayuno de 12 horas, se colocaron en una silla de contención para el estudio. Se canalizaron para la toma de muestra y administración del fármaco, de la misma forma que antes de la lesión pero tomando los cuidados necesarios debido a su estado físico.

d) Administración del fármaco: La ciprofloxacina se administró por infusión intravenosa utilizando una dosis de 10 mg/Kg de peso, por 30 minutos, a través de un equipo de venoclisis.

e) Toma de muestra: Se tomaron dos muestras (normal y bis) de 1.0 a 1.5 mL de sangre, antes de la administración del fármaco y a los tiempos de 7.5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480 y 600 minutos después de la administración de la ciprofloxacina. Las muestras fueron recibidas en tubos eppendorf con 100  $\mu$ L de heparina para separar el plasma respectivo por centrifugación, mismo que se congeló a  $-20$  °C hasta el momento de su análisis.

#### **6.4.2. Preparación de la curva de calibración previa al estudio farmacocinético.**

El intervalo de concentraciones del estudio farmacocinético de ciprofloxacina para la curva de calibración constó de seis puntos: 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 1.2 y 2.4  $\mu$ g/mL y la concentración del estándar interno fue de 4.0  $\mu$ g/mL.

A seis tubos eppendorf se adicionaron 100  $\mu$ L de plasma de primate (Libre de fármaco), a cada tubo se le adicionaron 20  $\mu$ L de solución estándar interno (Enrofloxacin), posteriormente se adicionaron a cada tubo alícuotas de 50, 100 y 200  $\mu$ L procedentes de la tercera dilución de ciprofloxacina para los tres puntos más bajos de la curva, y para los tres niveles de concentración más altos 30, 60, y

120  $\mu\text{L}$  procedentes de la segunda dilución de la solución de ciprofloxacina. Por último, a cada tubo se adicionó el volumen necesario de ácido perclórico al 6.0 % para obtener 500  $\mu\text{L}$  como volumen total. Todos los tubos se agitaron en un vórtex durante tres minutos y se separaron las fases (Acuosa y Sedimento) por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, se tomó de la fase líquida 20  $\mu\text{L}$  y se inyectaron directamente al cromatógrafo.

#### **6.4.2.1. Preparación de la solución de ciprofloxacina.**

Solución de ciprofloxacina: Se pesaron 10 mg de ciprofloxacina estándar secundario y se colocó en un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió y aforó con fase móvil, para obtener una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De ésta solución se tomó una alícuota de 0.5 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con fase móvil, de ésta última solución se tomaron 0.75 mL y se colocó en un matraz de 10 mL y se aforó con fase móvil, ésta última dilución fue necesaria para las primeras tres concentraciones de la curva estándar (0.075, 0.15 y 0.3), mientras que los tres últimos puntos partieron de la segunda dilución (0.6, 1.2 y 2.4). Así, la segunda y tercera diluciones tuvieron una concentración de 10 y 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

#### **6.4.2.2. Preparación de la solución estándar interno.**

Solución Estándar Interno: Se pesaron 5 mg de enrofloxacin estándar secundario y se colocó en un matraz de 50 mL, se disolvió y aforó con fase móvil. Esta solución tuvo una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **6.4.2.3. Preparación de la solución de ácido perclórico al 6 %.**

Solución de ácido perclórico al 6.0 %: Se midieron 5.1 mL de ácido perclórico (al 70 % de pureza) y se colocó en un matraz de 50 mL diluyendo hasta el aforo con agua filtrada y libre de impurezas, posteriormente se agitó.

### **6.4.3. Método bioanalítico utilizado para el análisis cromatográfico.**

#### **6.4.3.1. Sistema Cromatográfico.**

- Columna: Zorbax SB-C18 7.6 X 75 mm, 3.5  $\mu$ m.
- Precolumna Hardware Kit.
- Longitud de onda: 278 nm.
- Velocidad de flujo: 1.4 mL/min.
- Volumen de inyección: 20  $\mu$ L.

#### **6.4.3.2. Preparación de la fase móvil.**

Se preparó una solución de ácido fosfórico 0.025 M de la siguiente manera: Se midieron 1.71 mL de ácido fosfórico (al 85 % de pureza), se colocó en un matraz volumétrico de 1000 mL y se aforó con agua filtrada y libre de impurezas.

Posteriormente se preparó una solución de Acetonitrilo – Ácido fosfórico 0.025 M en una proporción de 13:87 v/v misma que se ajustó posteriormente a un pH de 3 con trietanolamina, ajustando con un pHmetro.

#### **6.4.4. Estudio farmacocinético.**

Los parámetros farmacocinéticos  $V_d$ ,  $Cl$ ,  $ABC_{0-t}$ , y  $t_{1/2}$  se calcularon a partir de los datos del perfil plasmático, se obtuvieron de forma directa con la ayuda del programa computacional WinNonlinPro versión 2.1<sup>30</sup> a través de un análisis no compartimental (infusión constante) y por medio de un modelo lineal. El análisis farmacocinético se realizó para cada primate en las distintas fases del estudio farmacocinético clínico.

##### **6.4.4.1. Manejo y análisis de las muestras biológicas de los primates sometidos al estudio.**

Las muestras de sangre obtenidas a diferentes tiempos (0-600 min) de los primates en estudio antes de la LTME, 24 hrs, 15 días y 2 meses después de la LTME, fueron recibidas en tubos eppendorf con 100  $\mu$ L de heparina previamente adicionada (bien etiquetados) y centrifugadas posteriormente para separar el plasma y almacenarlo en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis que consistió de lo siguiente:

A tubos eppendorf previamente etiquetados con los tiempos de muestreo (0-600 min), con nombre del primate y fase de la lesión, se adicionaron 100  $\mu$ L del plasma de primate tomado en cada tiempo, a cada tubo se le adicionaron 20  $\mu$ L de la solución estándar interno (enrofloxacin), adicionando por último el volumen necesario de ácido perclórico al 6.0 % para llegar a 500  $\mu$ L como volumen total. Todos los tubos se agitaron en un vórtex durante tres minutos y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos para separar las fases (acuosa y sedimento), posteriormente se tomaron de la fase líquida 20  $\mu$ L y se inyectaron directamente al sistema cromatográfico.

## VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 7.1. Curva de calibración Estándar.

La curva de calibración utilizada en el estudio farmacocinético consistió de seis niveles de concentración: 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.4  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de una solución stock de 200  $\mu\text{g/mL}$  de ciprofloxacina disuelta en fase móvil. Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, para así poder determinar la ecuación de la recta.

Se debe comentar además, que se realizó la curva de calibración estándar por triplicado previo al análisis farmacocinético de cada cinética experimental y en las distintas fases de estudio (aguda, subaguda y crónica) para así determinar la concentración de ciprofloxacina en plasma de primate. A continuación se presenta una curva de calibración estándar representativa:

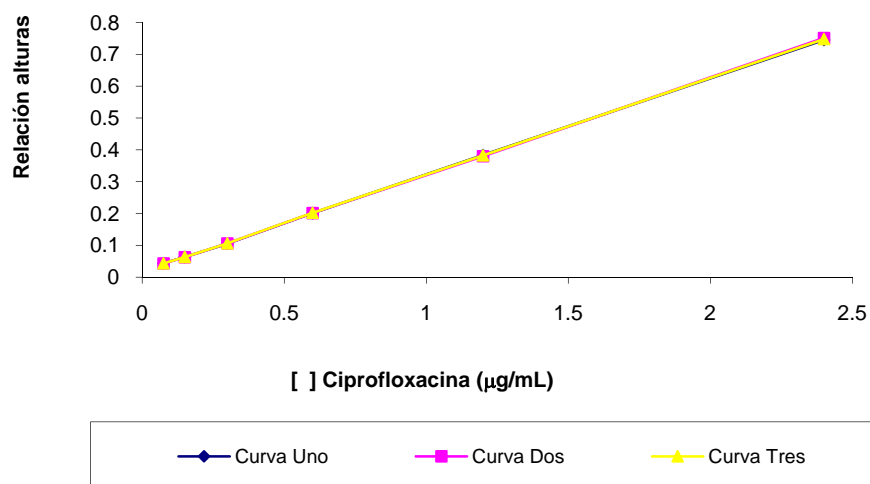


Figura 1. Curva de calibración estándar representativa de ciprofloxacina en plasma de primate previo al análisis farmacocinético.

En la figura 1, se puede observar que los resultados obtenidos siguen un comportamiento lineal donde la respuesta obtenida es proporcional a las concentraciones de ciprofloxacina en plasma de primate, visualizándose mediante la ecuación de la recta obtenida:

$$y = m x + b$$

$$y = 0.3041 x + 0.0176$$

El coeficiente de determinación obtenido fue igual a  $r^2 = 0.9999$ , el cual está por encima de la especificación ( $r^2 = \text{mayor ó igual a } 0.98$ ) <sup>(27)</sup>, confirmando que la relación entre las dos variables fue lineal en todo el intervalo de concentración.

A continuación se presenta un cuadro con los resultados de dispersión obtenidos en cada nivel de concentración de la curva de calibración.

[ ] $\mu\text{g/mL}$	Relación de Alturas (Promedio)	Desviación Estándar Obtenida	C. V. (%) Obtenido	C. V. (%) Especificación
2.4	0.7478	0.003016	0.4034	15
1.2	0.3817	0.001723	0.4514	15
0.6	0.2012	0.000736	0.3659	15
0.3	0.1056	0.000565	0.5353	15
0.15	0.0628	0.000396	0.6312	15
0.075	0.0431	0.000313	0.7198	20

Cuadro 1. Resultados de dispersión de una curva de calibración representativa elaborada previo al análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de primate.

Con lo anterior se puede confirmar que los coeficientes de variación obtenidos en cada nivel de concentración, los cuales no exceden del 1%, cumplen con la especificación de la normatividad vigente<sup>(27)</sup>, así de ésta manera, se cumple con el parámetro linealidad. Por otro lado se determinó la exactitud y la precisión para cada nivel de concentración, los cuales se pueden apreciar en el siguiente cuadro:

[ ] μg/mL Teórica	[ ] μg/mL Experimental	Exactitud Recobro (%) Obtenido	Exactitud Recobro (%) Especificación	Precisión C. V. (%) Obtenido	Precisión C. V. (%) Especificación
2.4	2.4012	100.0493	85-115	0.8726	15
1.2	1.1975	99.7885	85-115	1.0768	15
0.6	0.6059	100.9786	85-115	1.2010	15
0.3	0.2873	95.7715	85-115	1.1937	15
0.15	0.1484	98.9202	85-115	2.8320	15
0.075	0.0848	113.0527	80-120	4.5944	20

Cuadro 2. Resultados estadísticos de exactitud y precisión de ciprofloxacina en plasma de primate para cada nivel de concentración de la curva de calibración estándar representativa.

Con lo anterior se puede confirmar que los parámetros obtenidos para exactitud se encuentran dentro de las especificaciones de la normatividad oficial<sup>(27)</sup> a lo largo del intervalo de concentraciones estudiado.

La exactitud para cada nivel de concentración, fue calculada como el porcentaje de recobro con respecto al valor nominal ó verdadero. De igual manera se visualiza que los valores resultantes para precisión dados en coeficientes de variación no



sobrepasan del 5 %, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos en la normatividad<sup>(27)</sup>. Éstos parámetros son de importancia y críticos en validación de métodos bioanalíticos los cuales involucran la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

Por otro lado, previo a la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate, tanto la corrida analítica de la curva de calibración, como del análisis farmacocinético para cada fase de estudio (agudo, subagudo y crónico), se inyectaba al sistema cromatográfico una muestra blanco (plasma de primate no humano sin fármaco) para comprobar que no hubiese interferencia alguna por productos endógenos de la matriz biológica.

A continuación se presenta un cromatograma típico de una muestra blanco que se inyectaba previo a la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate no humano:

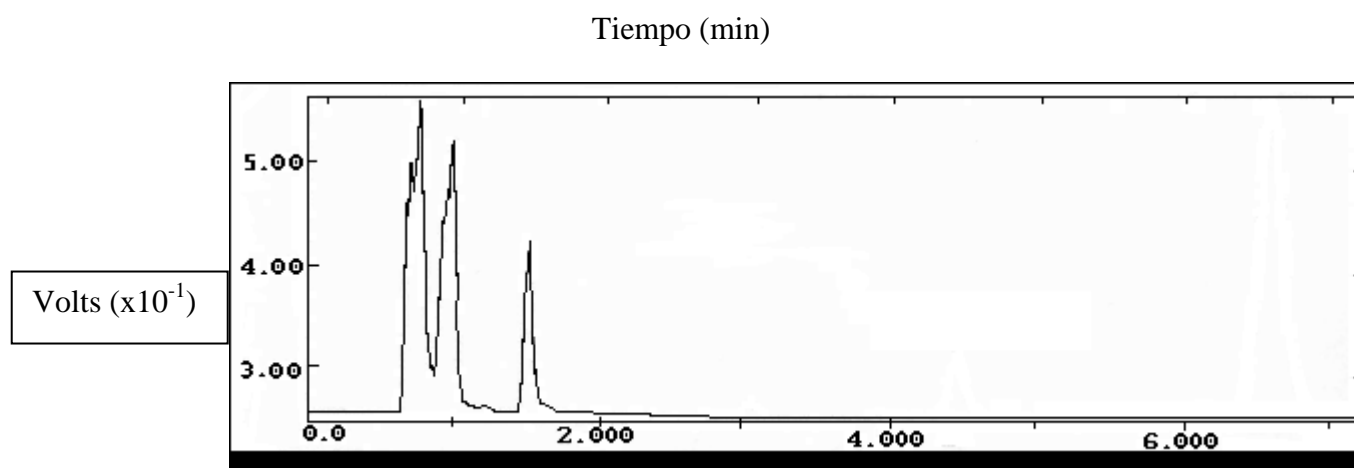


Figura 2. Cromatograma típico de una muestra blanco de plasma de primate previo al análisis farmacocinético de ciprofloxacina.

Con el cromatograma típico de una muestra blanco obtenido durante los análisis, que se presenta en la figura 2, se concluye que no hubo interferencia por posibles metabolitos, componentes endógenos de la matriz, productos de degradación ó de descomposición, algún medicamento que estuviese administrado de forma concomitante, en éste caso acetaminofén, u otros xenobióticos exógenos en la fase móvil, demostrando así que el método bioanalítico utilizado en el análisis farmacocinético para la cuantificación ciprofloxacina en plasma de primate es selectivo y específico, y además confiable para el objetivo deseado.

## **7.2. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos previo a la LTME (Fase Pre-operatoria).**

Con el fin de valorar el efecto que tiene la intensidad de compresión para provocar una LTME en primates no humanos utilizando el método de contusión por medio de un globo epidural y el tiempo transcurrido después de una LTME sobre los parámetros farmacocinéticos del antibiótico ciprofloxacina manejando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa.

Para cada uno de los primates en estudio, se analizó en primer lugar la etapa de pre-lesión ó pre-operatoria, es decir, se realizó el estudio farmacocinético del fármaco antes de someter al primate no humano a un daño medular, empleando la dosis de fármaco antes mencionada. Todos los primates sometidos al estudio farmacocinético antes de cualquier tratamiento quirúrgico, presentaron una locomoción motora normal, la cual prevaleció al finalizar la toma de muestras del estudio farmacocinético (duración 10 horas).

Los cursos temporales de concentración plasmática de ciprofloxacina en función del tiempo obtenidos en los primates no humanos sin procedimiento quirúrgico alguno se presentan en la Figura 3, donde se puede observar un comportamiento similar en la disposición del fármaco posterior a su administración.

Los parámetros farmacocinéticos derivados de éstos perfiles plasmáticos se presentan, en el cuadro 3, en tanto el promedio (Figura 4; cuadro 4) de éstos comportamientos muestran que los parámetros farmacocinéticos de la ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa en monos rhesus no difieren de lo reportado para humanos y/o otra especie animal. <sup>(2, 19, 25, 39 y 40)</sup>

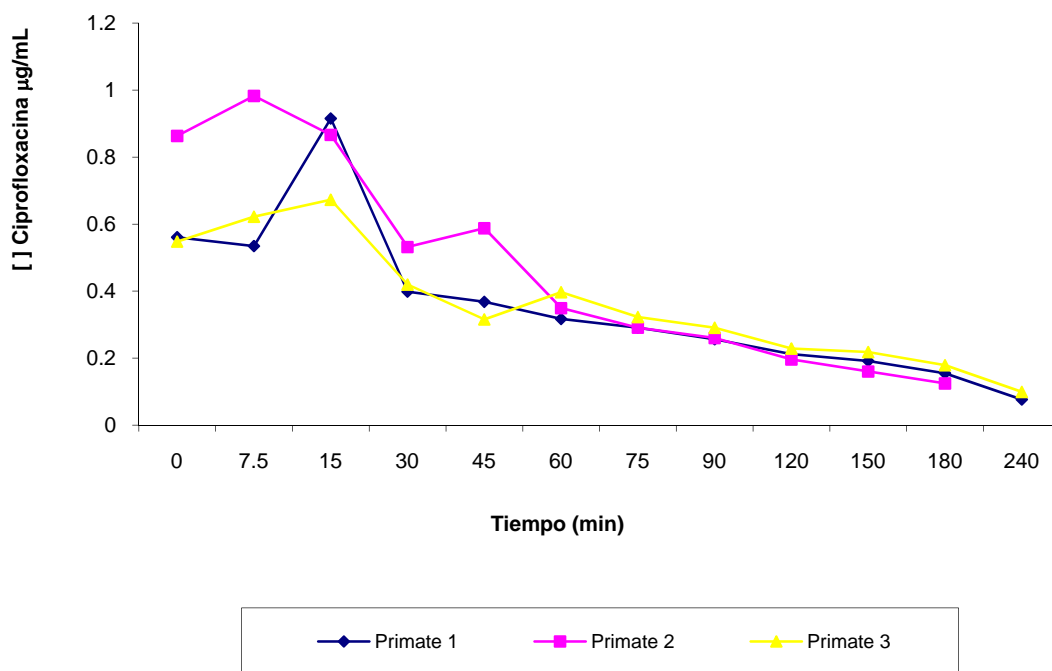


Figura 3. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV de los tres primates no humanos en estudio utilizando una dosis de 10 mg/kg a una velocidad de 30 mL/min en fase pre-operatoria.

FASE PRE-LESIÓN ó PRE-OPERATORIA				
PRIMATE	ABC <sub>0-t</sub>	t <sub>1/2</sub>	Cl	Vd
No.	(µg*min/mL)	(min)	(L/kg*min)	(L/kg)
1	103.66	142.77	0.10	19.87
2	118.56	110.42	0.08	13.44
3	115.19	155.63	0.09	19.49

Cuadro 3. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina administrada por infusión IV obtenidos de los tres primates en estudio en fase pre-operatoria.

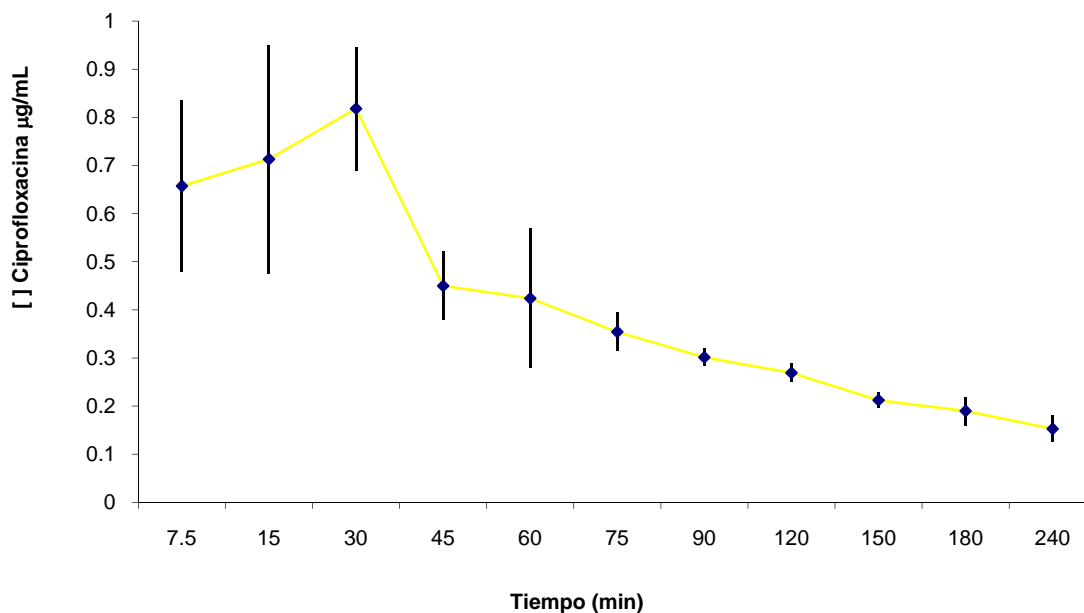


Figura 4. Perfil plasmático promedio de ciprofloxacina administrada por infusión IV en primates no humanos utilizando una dosis de 10mg/kg a una velocidad de 30 mL/min en etapa pre-operatoria. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  su error estándar.

FASE	ABC <sub>0-t</sub> (µg*min/mL)	t <sub>1/2</sub> (min)	Cl (L/kg*min)	Vd (L/kg)
<b>Pre-operatoria</b>	112.47+/-0.075	136.28+/-0.224	0.09+/-0.004	17.60+/-2.084

Cuadro 4. Parámetros farmacocinéticos promedio y error estándar del antibiótico ciprofloxacina obtenidos de los tres primates en la fase preoperatoria.

### **7.3. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos 24 hrs después de una LTME (Fase Aguda).**

Posteriormente al estudio farmacocinético del fármaco en los primates sin intervención quirúrgica alguna, a cada primate se le sometió a una cirugía a un nivel de la vértebra torácica 9, para provocar en diferentes intensidades una lesión medular experimental a través de la aplicación de un porcentaje diferente de compresión sobre la médula espinal en cada primate: 50 %, 75 % y 100 %, clasificada dentro de nuestro estudio como una lesión medular leve, moderada y severa respectivamente. Para realizar los estudios farmacocinéticos respectivos a 24 horas posterior a la lesión como primer lapso de tiempo después de la lesión, llamado en nuestro estudio como el estado agudo, 15 días y 2 meses después de la contusión como los estados subagudo y crónico de la lesión respectivamente.

En la figura 5, 6 y 7 se presentan los perfiles plasmáticos de ciprofloxacina administrada por una infusión intravenosa a una dosis de 10 mg/kg de peso obtenidos en cada primate con lesión medular leve, moderada y severa respectivamente, en la etapa aguda de la lesión (24 horas después de provocar el daño medular).

Los parámetros farmacocinéticos  $ABC_{0-t}$ ,  $t_{1/2}$ , CL y Vd generados de éstos comportamientos comparados contra su valor antes del daño medular se presentan en los cuadros 5, 6 y 7.

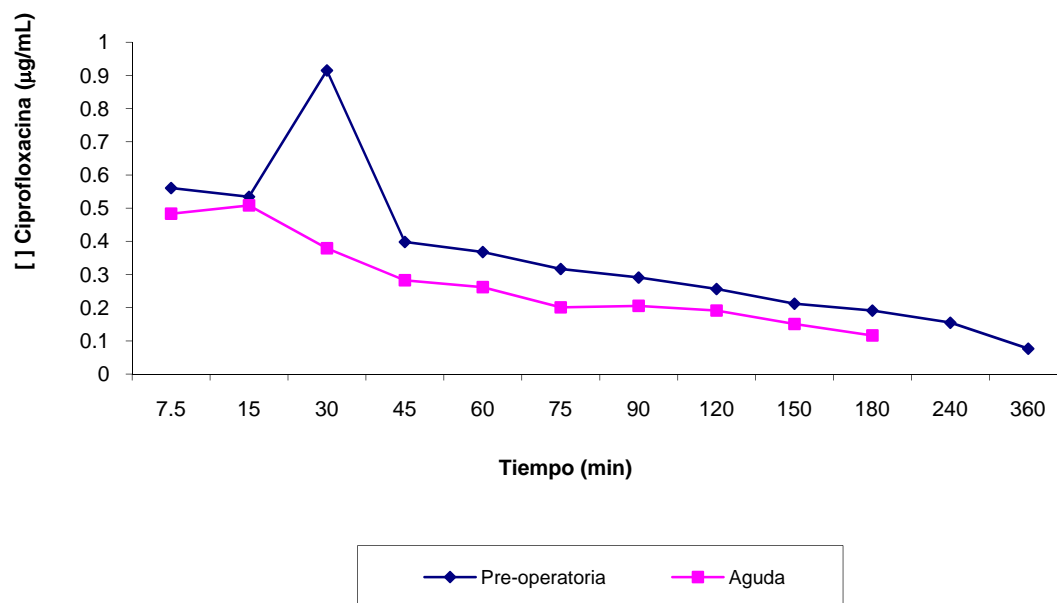


Figura 5. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 1, antes (condición pre-operatoria) y 24 horas después de una compresión medular con una intensidad del 50 % (considerada como lesión leve).

FASE	$ABC_{0\text{ at}}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$ )	$t_{1/2}$ (min)	Cl ( $\text{L}/\text{kg} \cdot \text{min}$ )	Vd ( $\text{L}/\text{kg}$ )
<b>Pre-operatoria</b>	112.47	136.28	0.09	17.60
<b>Fase Aguda</b>	56.86	83.48	0.18	21.18

Cuadro 5. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y aguda del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 1 presentando una intensidad de contusión del 50 % (lesión leve).

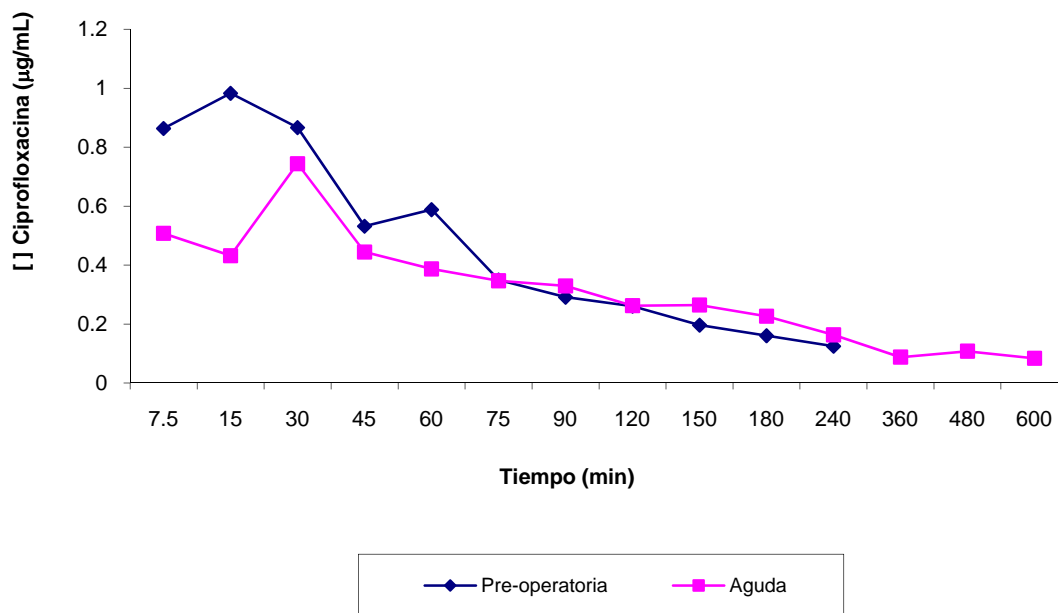


Figura 6. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 2, antes (condición pre-operatoria) y 24 horas después de una compresión medular con una intensidad del 75 % (considerada como lesión moderada).

FASE	$ABC_{0\text{at}}$ ( $\mu\text{g}^*\text{min}/\text{mL}$ )	$t_{1/2}$ (min)	CI ( $\text{L}/\text{kg}^*\text{min}$ )	Vd ( $\text{L}/\text{kg}$ )
<b>Pre-operatoria</b>	112.47	136.28	0.09	17.60
<b>Fase Aguda</b>	141.22	225.75	0.07	23.06

Cuadro 6. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y aguda del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 2 presentando una intensidad de contusión del 75 % (lesión moderada).



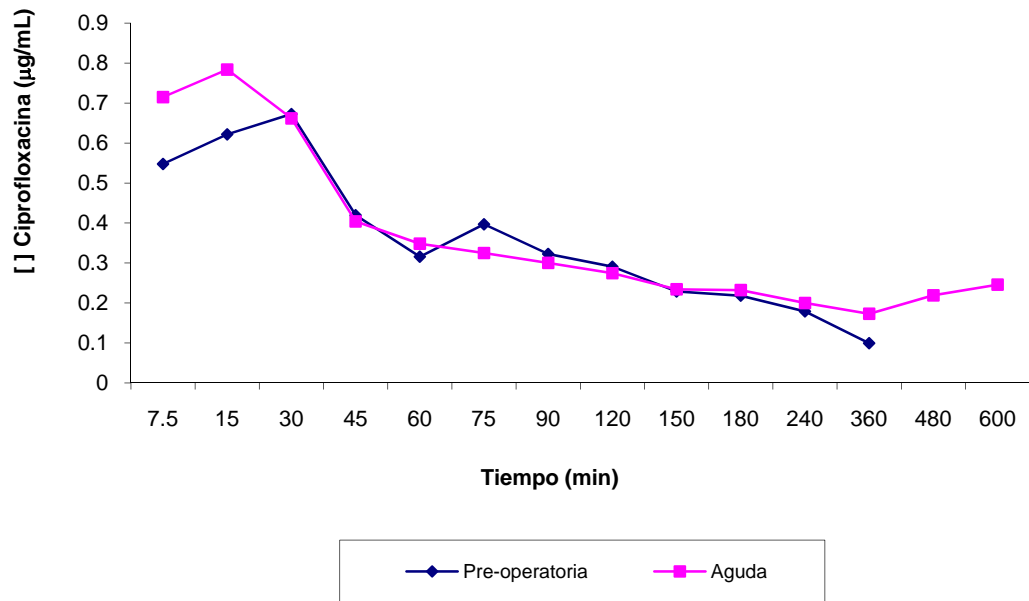


Figura 7. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 3, antes (condición pre-operatoria) y 24 horas después de una compresión medular con una intensidad del 100 % (considerada como lesión severa).

FASE	$ABC_{0at}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$ )	$t_{1/2}$ (min)	Cl ( $\text{L}/\text{kg} \cdot \text{min}$ )	Vd (L/kg)
Pre-operatoria	112.47	136.28	0.09	17.60
Fase Aguda	214.61	454.70	0.05	30.57

Cuadro 7. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y aguda del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 3 presentando una intensidad de contusión del 100 % (lesión severa).

Varios estudios han documentado alteraciones farmacocinéticas en pacientes con lesión traumática de médula espinal, sin embargo todas éstas observaciones han sido obtenidas durante la fase crónica de la lesión, no obstante durante la fase aguda los pacientes reciben un importante número de fármacos incluyendo: agentes neuroprotectores, anticoagulantes, agentes vasodepresores y vasodilatadores entre otros.<sup>(12)</sup> Durante la etapa conocida como choque espinal existe un decremento del volumen circulatorio, alteraciones cardiovasculares y una importante disminución en la distribución del flujo sanguíneo a órganos no vitales incluyendo el hígado, riñón y aparato gastrointestinal <sup>(12)</sup>, que pudieran provocar cambios significantes en la distribución y eliminación de fármacos, los cuales han sido documentados empleando modelos experimentales de lesión medular en ratas <sup>(12, 14, 17 y 18)</sup>, que han contribuido al conocimiento y entendimiento de los procesos fisiológicos involucrados en tales alteraciones. Ante éstos antecedentes el diseño experimental de nuestro estudio persiguió establecer si durante un lapso de tiempo corto posterior a la lesión, 24 horas, 15 días y 2 meses (etapa de choque medular, subaguda y crónica) se evidenciaban alteraciones farmacocinéticas de un antibiótico comúnmente empleado en pacientes con éste padecimiento al enfrentarse éstos frecuentemente a infecciones en vías urinarias. Usando un modelo experimental de lesión medular en monos Rhesus, y no en ratas como los estudios en etapa aguda reportados hasta el momento.

Como puede observarse en los resultados, 24 horas posteriores a la cirugía para provocar una lesión medular, ésta induce cambios en las concentraciones plasmáticas del antibiótico (ciprofloxacina) como se observa en las figuras 5, 6 y 7. Éstas alteraciones evidencian cambios farmacocinéticos significativos en la cantidad de fármaco que alcanza el torrente sanguíneo ( $ABC_{0-t}$ ), el cual al incrementarse la intensidad de la lesión denotado como incremento del por ciento de inflación del globo epidural sobre la médula espinal de un 50 % de compresión a un 100 % de la misma, se incrementa considerablemente su valor hasta un 86 % respecto a su valor obtenido previo a la lesión, como se observa en la figura 8, incrementando la vida media de eliminación del antibiótico también hasta casi 3

veces su valor inicial, al pasar de una vida media de eliminación previo a la cirugía de 136.28 minutos a 454.70 minutos posterior a la lesión cuando la lesión es severa (Figura 9), lo anterior es explicado por el gran incremento en el volumen de distribución del antibiótico encontrado (Figura 10) y la disminución en la depuración del fármaco encontrado (Figura 11). Éstos resultados son congruentes con lo reportado para otros antibióticos como amikacina y gentamicina <sup>(32-35)</sup> en estudios clínicos que atribuyen dichas alteraciones a cambios en el equilibrio de los mecanismos de distribución tales como un tono venomotor alterado y una erosión de la masa muscular que contribuye al incremento del volumen de fluido extracelular provocado por la lesión medular crónica presente en pacientes. <sup>(31-33)</sup>

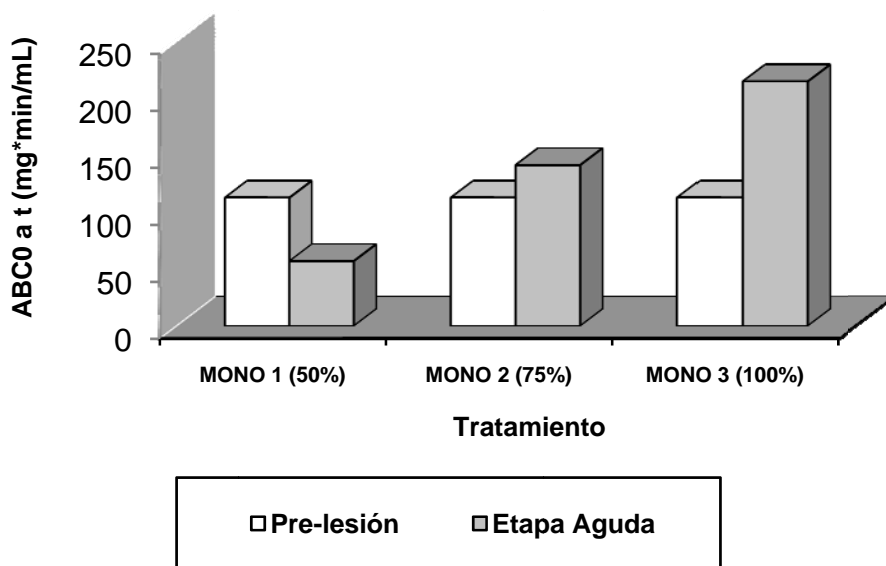


Figura 8. Comparación del  $ABC_{0at}$  de ciprofloxacin en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase aguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

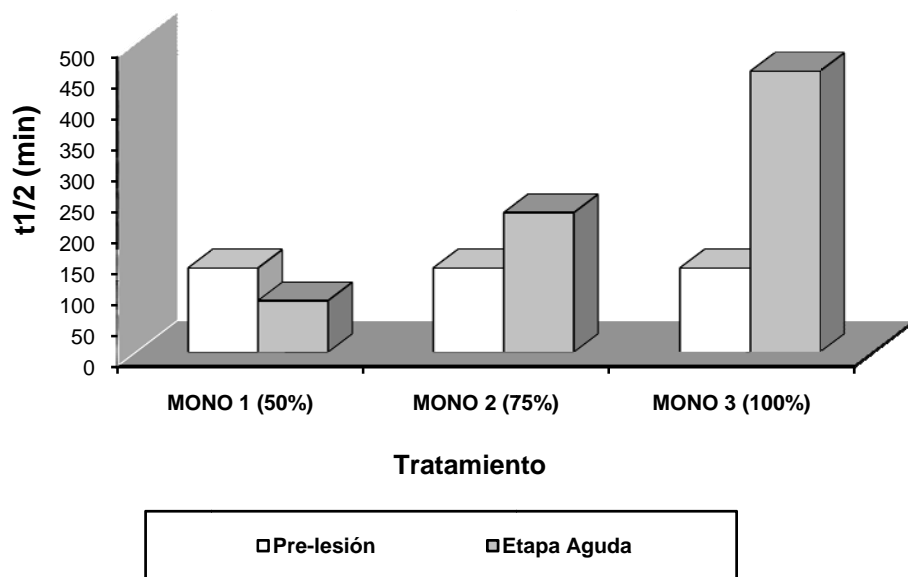


Figura 9. Comparación del  $t_{1/2}$  de ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase aguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

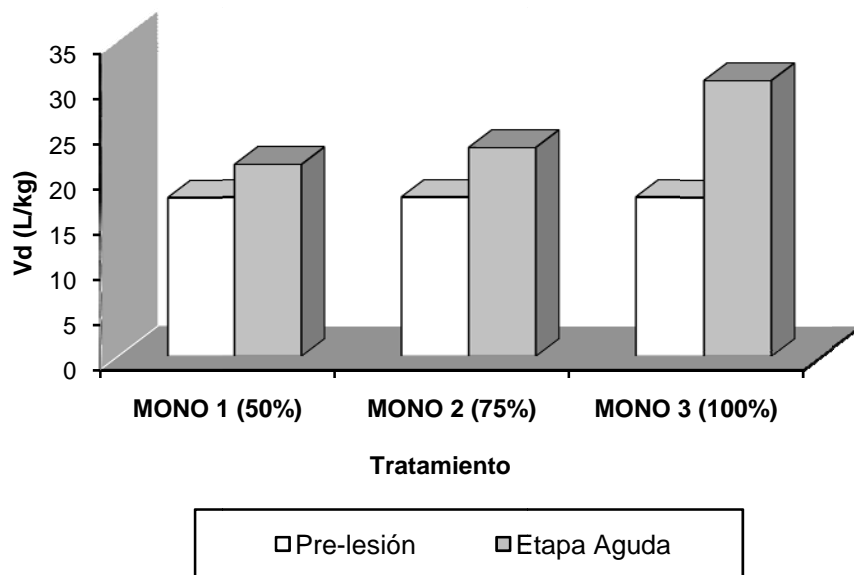


Figura 10. Comparación del  $V_d$  de ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase aguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

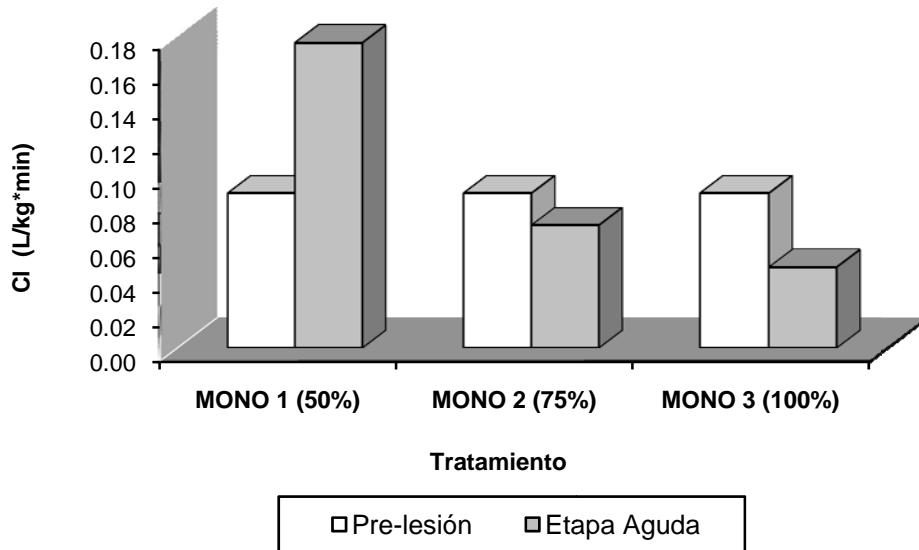


Figura 11. Comparación del CL de ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase aguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/ min.

Si bien se registró un incremento de los parámetros farmacocinéticos: área bajo la curva ( $ABC_{0-t}$ ), vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), volumen de distribución ( $V_d$ ) con disminución en la depuración (CL) de ciprofloxacina 24 horas después de la lesión con respecto a sus valores en condición de pre-lesión para los primates con la intensidad de lesión moderada y severa, para el primate con lesión leve sus parámetros farmacocinéticos no tuvieron el mismo comportamiento, pudiendo atribuir estos resultados al hecho, que no obstante éste primate fue sometido a un evento quirúrgico de compresión medular con globo epidural del 50% de compresión, éste porcentaje de compresión no provocó alteración motora evidente en el primate en el estado agudo de la lesión (24 horas posterior a la cirugía) que pudiera alterar los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina de forma similar a como se observa en una lesión moderada y severa, no obstante cabe la posibilidad que existiera una lesión medular leve e incompleta la cual estaría induciendo los cambios observados.

#### 7.4. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos 15 días después de una LTME (Fase Subaguda).

Los cursos temporales de concentración plasmática de ciprofloxacina en función del tiempo obtenidos en los primates no humanos sin procedimiento quirúrgico alguno comparados con los obtenidos quince días después de la lesión se presentan en la Figura 12, 13 y 14 en tanto los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de éstos perfiles plasmáticos y comparados contra sus valores obtenidos en la pre-lesión se representan en los cuadros 8, 9 y 10.

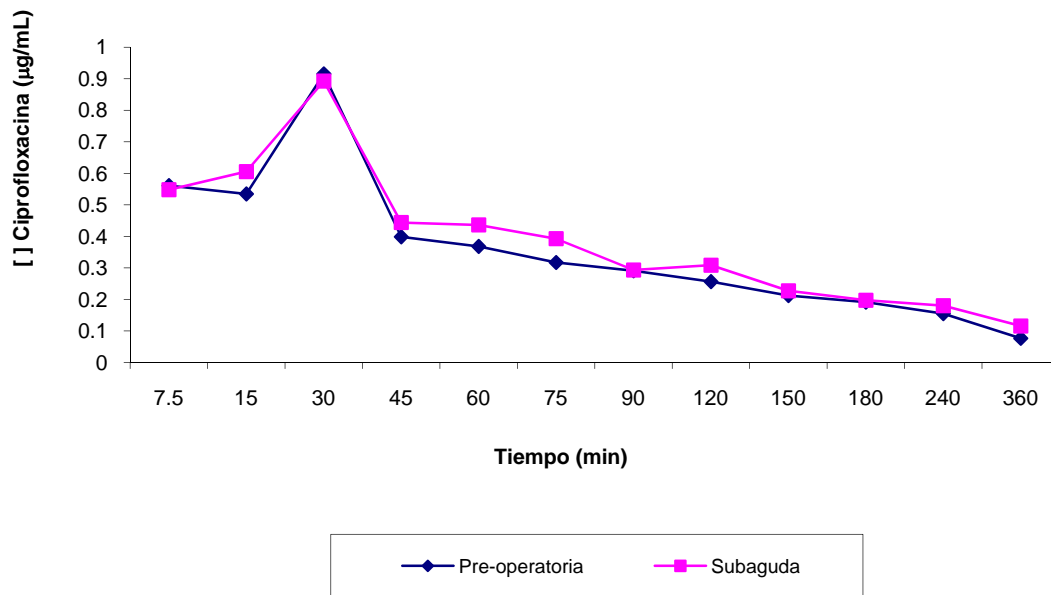


Figura 12. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 1 antes (condición pre-operatoria) y 15 días después de una compresión medular con una intensidad del 50 % (considerada como lesión leve).

FASE	$ABC_{0\text{at}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ )	$t_{1/2}$ (min)	Cl ( $\text{L}/\text{kg}\cdot\text{min}$ )	Vd ( $\text{L}/\text{kg}$ )
Pre-operatoria	112.47	136.28	0.09	17.60
Subaguda	135.26	222.94	0.07	23.78

Cuadro 8. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y subaguda del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 1 presentando una intensidad de contusión del 50 % (lesión leve).

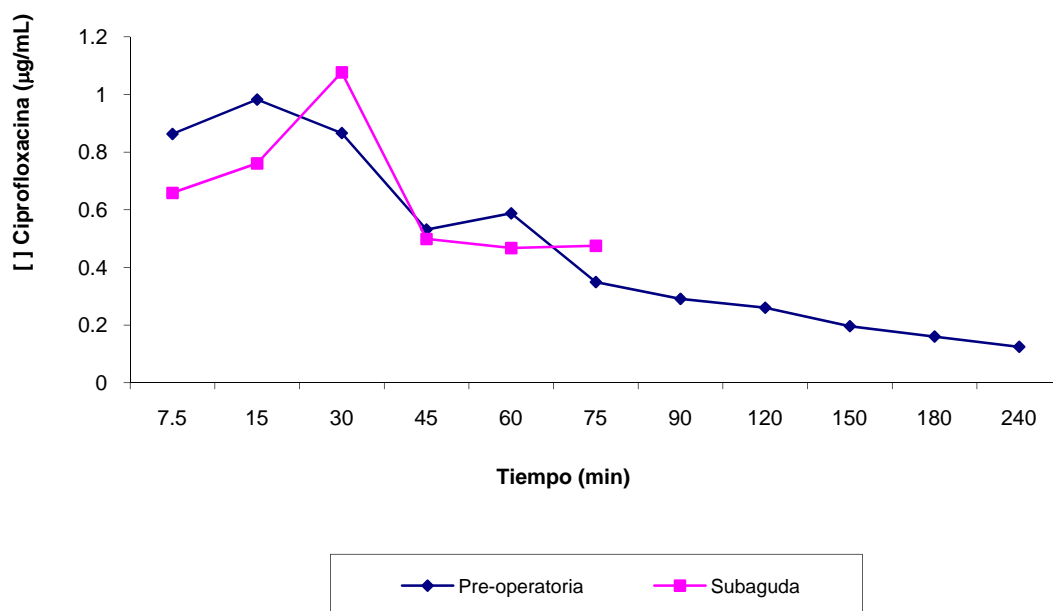


Figura 13. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 2 antes (condición pre-operatoria) y 15 días después de una compresión medular con una intensidad del 75 % (considerada como lesión moderada).

FASE	$ABC_{0\text{at}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ )	$t_{1/2}$ (min)	Cl ( $\text{L}/\text{kg}\cdot\text{min}$ )	Vd ( $\text{L}/\text{kg}$ )
Pre-operatoria	112.47	136.28	0.09	17.60
Subaguda	76.01	41.27	0.13	7.83

Cuadro 9. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y subaguda del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 2 presentando una intensidad de contusión del 75 % (lesión moderada).

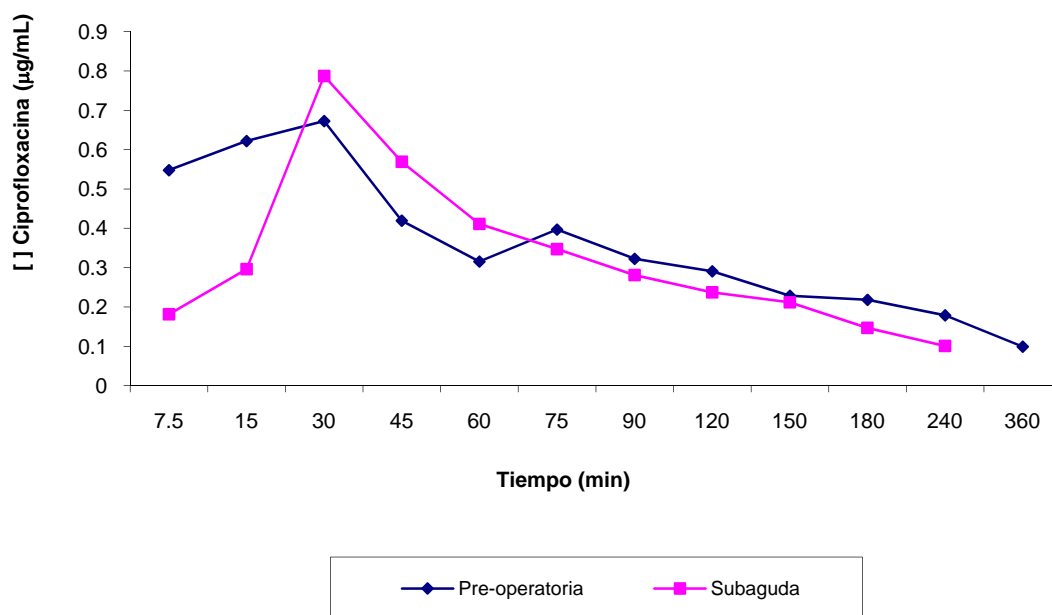


Figura 14. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 3 antes (condición pre-operatoria) y 15 días después de una compresión medular con una intensidad del 100 % (considerada como lesión severa).



<b>FASE</b>	<b>ABC<sub>0 a t</sub> (μg*min/mL)</b>	<b>t<sub>1/2</sub>(min)</b>	<b>Cl (L/kg*min)</b>	<b>Vd (L/kg)</b>
<b>Pre-operatoria</b>	112.47	136.28	0.09	17.60
<b>Subaguda</b>	79.21	91.69	0.13	16.70

Cuadro 10. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y subaguda del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 3 presentando una intensidad de contusión del 100 % (lesión severa).

Quince días posterior a la provocación de una lesión medular, si bien existen cambios en la distribución del fármaco en los tres niveles de intensidad de lesión evaluados, como se observa en los cuadros 8, 9 y 10 de los parámetros farmacocinéticos obtenidos, éstos no se presentan de la misma forma que en los obtenidos a las 24 horas, donde el aumento en el volumen de distribución del fármaco, el prolongamiento de la vida media y una marcada disminución en la depuración del fármaco observada en los primates con intensidad de lesión moderada y severa es aparentemente temporal en ésta fase subaguda de la lesión, comparadas con sus respectivos estudios antes y 24 horas después de la LTME.

Los cambios en el ABC<sub>0-t</sub>, t<sub>1/2</sub>, Vd y CL obtenidos quince días después de la lesión al parecer se revierten, mostrando tendencia de disminución ó incremento hacia el valor control del estudio farmacocinético (sin cirugía alguna), como puede observarse en las figuras 15 a 18.

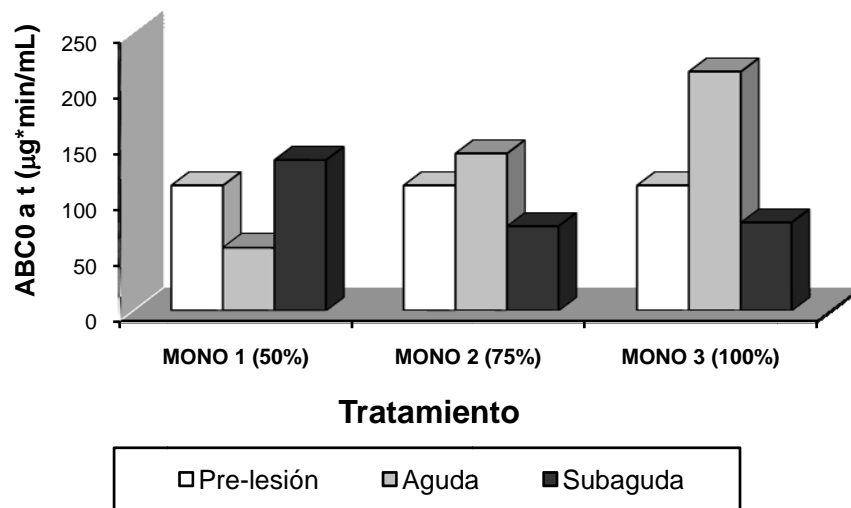


Figura 15. Comparación del ABC<sub>0at</sub> de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase subaguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

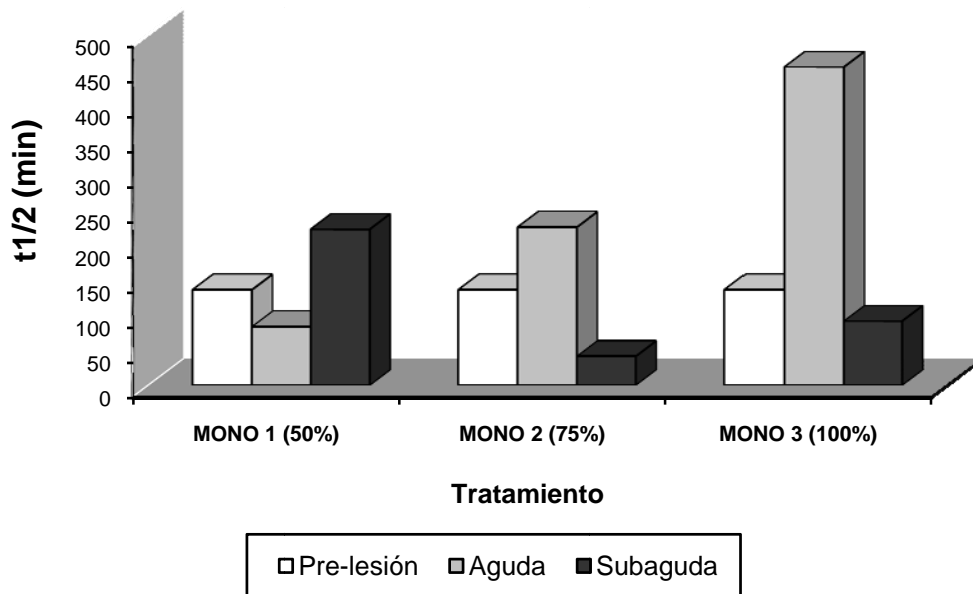


Figura 16. Comparación del t<sub>1/2</sub> de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase subaguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

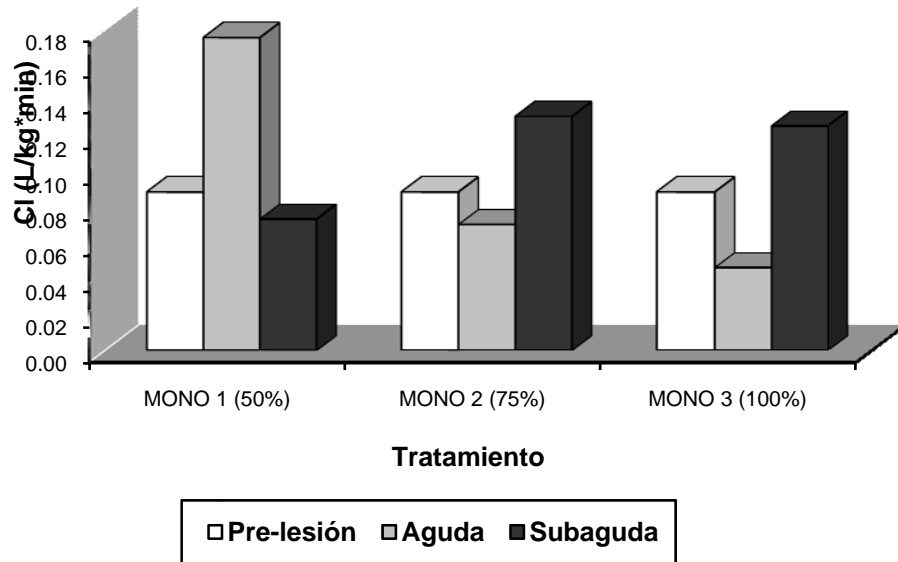


Figura 17. Comparación del Cl de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase subaguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

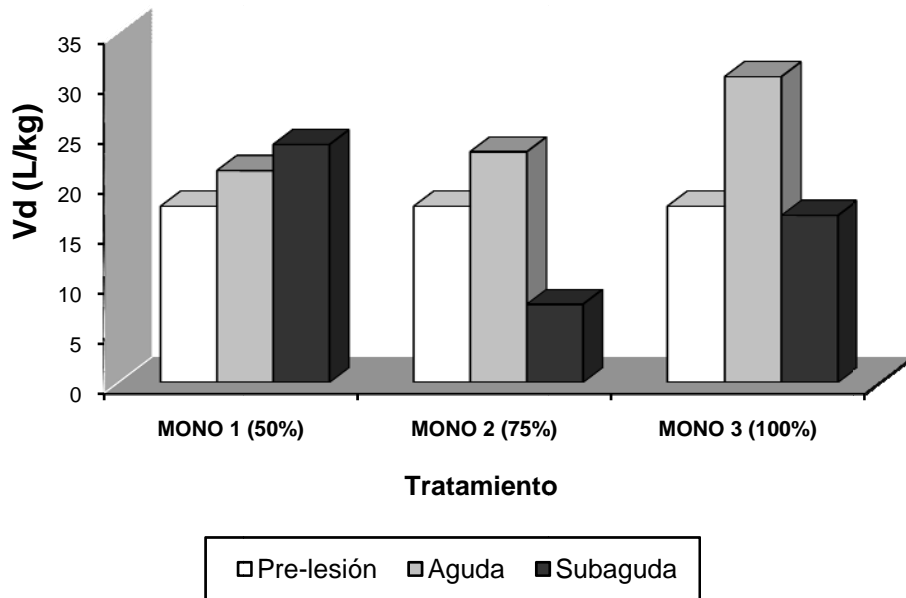


Figura 18. Comparación del Vd de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase subaguda utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

Estos resultados sugieren que las alteraciones observadas no dependen probablemente de forma completa de las funciones relacionadas con la actividad locomotora, como lo refiere un estudio que reporta una reversión en las alteraciones farmacocinéticas posterior a un daño medular doce días después del trauma medular en un modelo experimental utilizando ratas, no obstante los animales sometidos a una LTME presentaban paraplejía completa.<sup>(15)</sup>

### 7.5. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en primates no humanos 2 meses después de una LTME (Fase Crónica).

En las figuras 19, 20 y 21, se presentan los cursos temporales de concentración plasmática de ciprofloxacina en función al tiempo en los primates sin procedimiento quirúrgico alguno comparados con los obtenidos 2 meses después de haberse sometido a una lesión medular por una compresión con globo epidural de 50, 75 y 100%. Los parámetros farmacocinéticos generados de éstos comportamientos se presentan en los cuadros 11, 12 y 13 así como sus respectivos valores en la condición pre-operatoria (cuadro solo pre-operatorio y después de 2 meses posterior a la LTME).

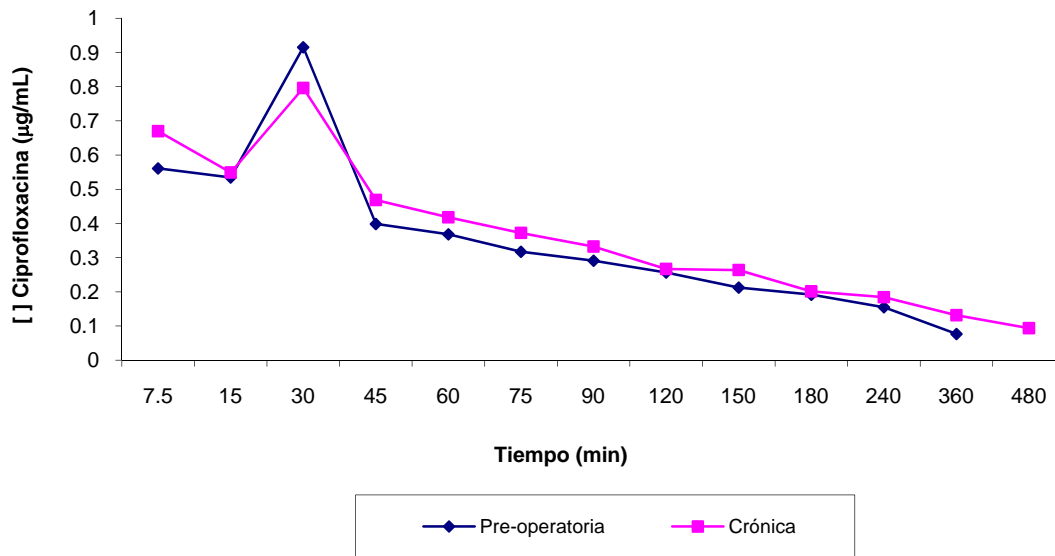


Figura 19. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 1 antes (condición pre-operatoria) y 2 meses después de una compresión medular con una intensidad del 50 % (considerada como lesión leve).

FASE	ABC <sub>0 at</sub> (μg*min/mL)	t <sub>1/2</sub> (min)	Cl (L/kg*min)	Vd (L/kg)
<b>Pre-operatoria</b>	112.47	136.28	0.09	17.60
<b>Crónica</b>	145.58	245.53	0.07	24.33

Cuadro 11. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y crónica del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 1 presentando una intensidad de contusión del 50 % (lesión leve).

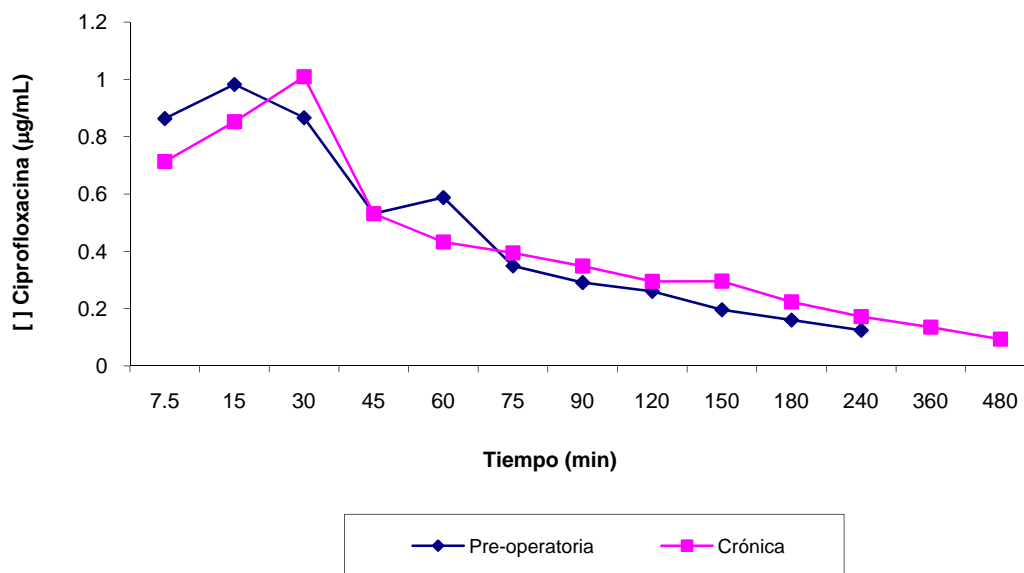


Figura 20. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 2 antes (condición pre-operatoria) y 2 meses después de una compresión medular con una intensidad del 75 % (considerada como lesión moderada).

FASE	ABC <sub>0 at</sub> (µg*min/mL)	t <sub>1/2</sub> (min)	Cl (L/kg*min)	Vd (L/kg)
<b>Pre-operatoria</b>	112.47	136.28	0.09	17.60
<b>Crónica</b>	157.17	250.54	0.06	23.00

Cuadro 12. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y crónica del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 2 presentando una intensidad de contusión del 75 % (lesión moderada).

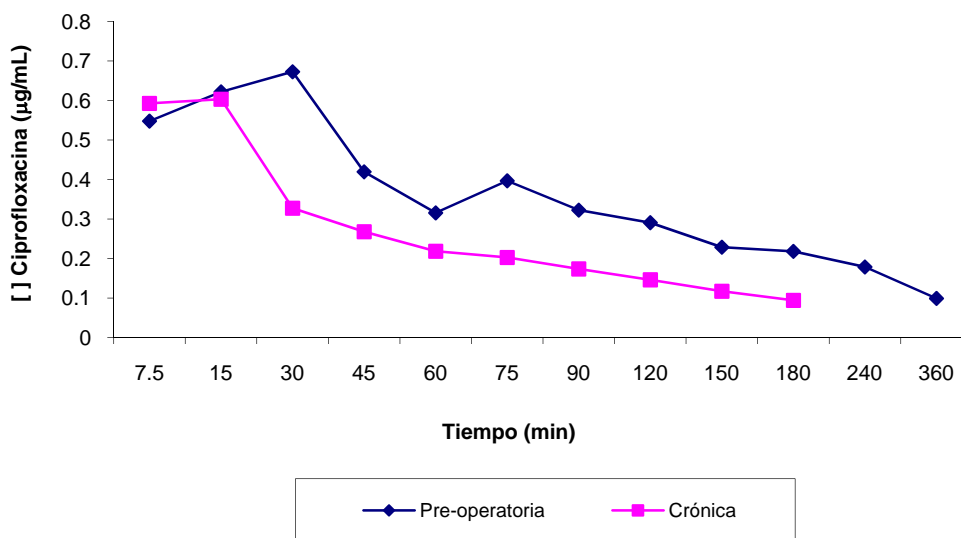


Figura 21. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrada por infusión IV utilizando una dosis de 10 mg/kg en el primate 3 antes (condición pre-operatoria) y 2 meses después de una compresión medular con una intensidad del 100 % (considerada como lesión severa).

<b>FASE</b>	<b>ABC<sub>0 at</sub> (μg*min/mL)</b>	<b>t<sub>1/2</sub>(min)</b>	<b>Cl (L/kg*min)</b>	<b>Vd (L/kg)</b>
<b>Pre- operatoria</b>	112.47	136.28	0.09	17.60
<b>Crónica</b>	52.65	94.85	0.19	25.99

Cuadro 13. Comparación de los parámetros farmacocinéticos en fase pre-operatoria y crónica del antibiótico ciprofloxacina obtenidos para el primate 3 presentando una intensidad de contusión del 100 % (lesión severa).

Los resultados en los primates con diferentes intensidades de lesión medular obtenidos 2 meses después del daño medular ó etapa crónica, nuevamente muestran cambios en la disposición del antibiótico con respecto a su valor control (etapa pre-operatoria) denotando cambios en la biodisponibilidad sistémica de la ciprofloxacina (ABC<sub>0 at</sub>) y vida media de eliminación (t<sub>1/2</sub>) del fármaco administrado por una infusión intravenosa (figuras 22 y 23), la cual involucra los procesos de distribución y eliminación de la misma, tales procesos en nuestro estudio se expresan como volumen de distribución (Vd) y depuración (CL).



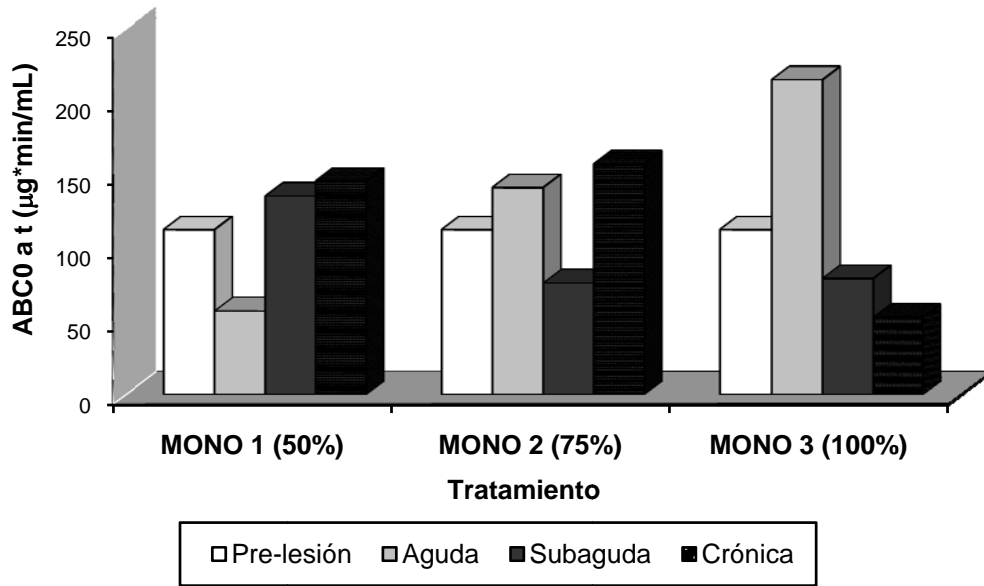


Figura 22. Comparación del  $ABC_{0 a t}$  de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase crónica utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

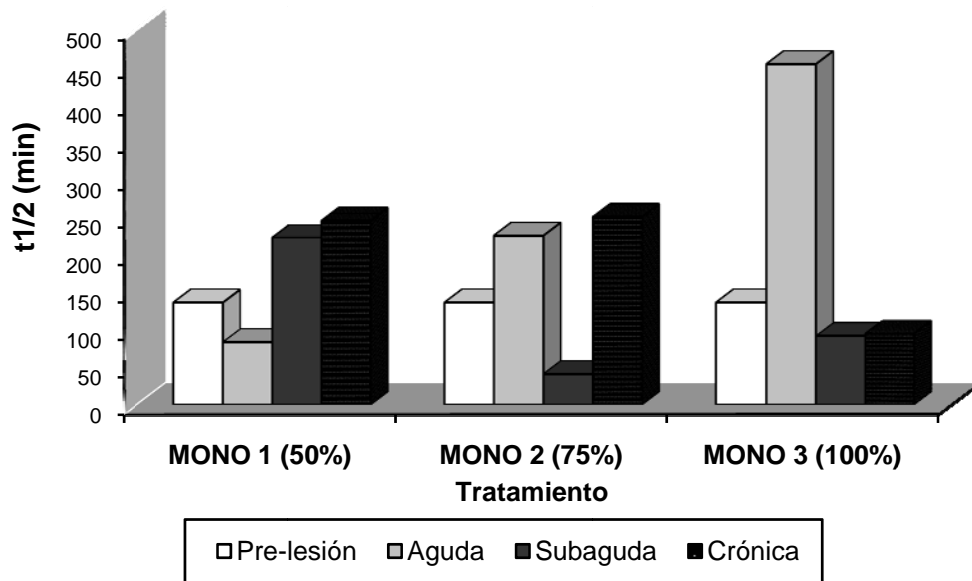


Figura 23. Comparación del  $t_{1/2}$  de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase crónica utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

La distribución comprende los procesos de transporte del fármaco dentro del compartimento sanguíneo y su posterior penetración en los tejidos, diluido en los líquidos intersticiales y celulares <sup>(31)</sup>. La distribución de los fármacos en el torrente sanguíneo a los tejidos del organismo ocurre a varias velocidades y en varias magnitudes. Algunos factores que determinan la distribución del fármaco incluyen la liberación del fármaco al tejido, la habilidad del fármaco para atravesar las membranas del tejido, la unión del fármaco tanto a proteínas plasmáticas como a componentes tisulares, el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo regional <sup>(31)</sup>, cuando el flujo sanguíneo disminuye sea por una insuficiencia cardíaca, un estado de choque ó alguna otra circunstancia (por ejemplo, una lesión traumática de médula espinal), el cerebro y el miocardio reciben más irrigación sanguínea que los órganos abdominales y en consecuencia los procesos de distribución y eliminación de los fármacos se ven modificados.<sup>(31)</sup>

La eliminación involucra la excreción y biotransformación, diversos fármacos sufren biotransformación, la cual se lleva a cabo principalmente en el hígado. Existen fármacos cuya biotransformación depende del flujo sanguíneo del hígado, y son llamados de alta extracción y por lo tanto están sujetos a un amplio metabolismo hepático, el cual es dependiente de la cantidad de fármaco que llega al hígado, en tanto la biotransformación para fármacos de baja extracción, la biotransformación no depende de flujo sanguíneo hepático, y depende principalmente de la actividad enzimática del hígado. <sup>(12)</sup>

La ciprofloxacina es un antibiótico con una unión baja a proteínas plasmáticas (de 30-40%), se elimina principalmente por vía renal a través de filtración glomerular y secreción tubular activa y un porcentaje mínimo es metabolizado por el hígado (10%). <sup>(2, 19 y 39)</sup>

En ésta etapa de nuestro estudio encontramos que el volumen de distribución en los primates con las tres intensidades de la lesión (leve, moderada y severa) está incrementado con respecto a su valor control (estado pre-operatorio) en 22.4, 71.1

y 33.3 por ciento respecto a su valor control, éstos resultados están reflejando por tanto, cambios en el equilibrio de los mecanismos de distribución dos meses después de la lesión (figura 24).

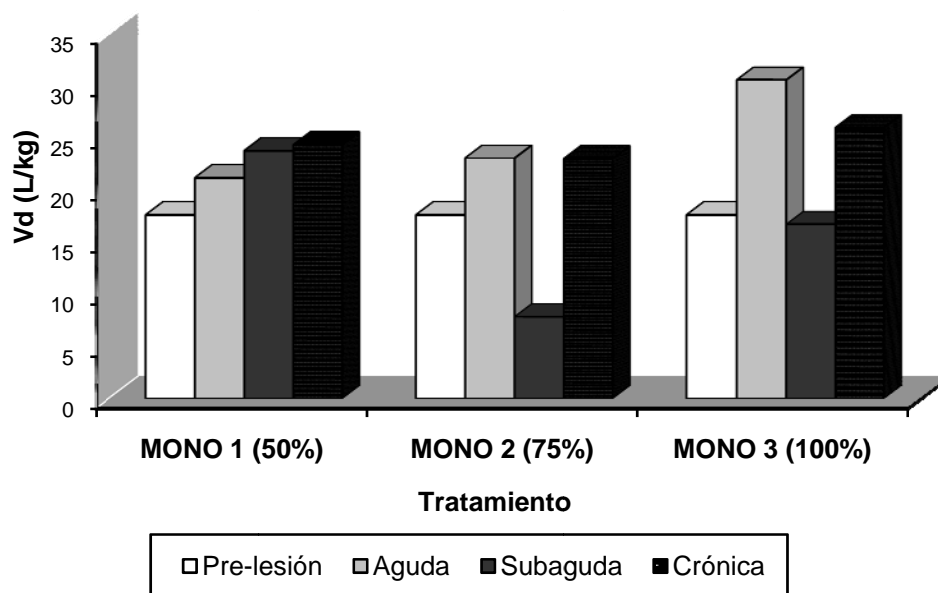


Figura 24. Comparación del Vd de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase crónica utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

Estos resultados pueden ser explicados en primera instancia por las alteraciones en la circulación sanguínea que desencadena una LTME, ya que se ha determinado en diversos estudios experimentales, que una de las consecuencias de dicho daño es un aumento en el líquido extra vascular con respecto al líquido intra vascular, a causa de la baja presión osmótica coloidal intravenosa y una alteración de la presión entre los espacios extra e intravasculares existente <sup>(32-35)</sup>, aunado al hecho de que el aumento en el volumen de fluido extracelular secundario a la erosión de la masa de músculo esquelético, altera el metabolismo de las catecolaminas con perturbación del tono venomotor y subsecuente formación de edema clínico característica de la LTME en estado crónico <sup>(32 y 34)</sup>,

condiciones que pueden existir en nuestros experimentos y por lo tanto estar alterando la distribución de la ciprofloxacina.

Por otro lado la depuración de la ciprofloxacina disminuyó significativamente en los primates con lesión leve y moderada con respecto a su valor control (figura 25), indicando una alteración en la excreción renal mejor evidenciada a un mayor tiempo posterior a la lesión, estos cambios pueden ser explicados por la alteración en el flujo sanguíneo renal existente en la fase de choque espinal <sup>(23)</sup>, y su consecuente alteración en la filtración glomerular <sup>(23)</sup>, no obstante este comportamiento no se evidenció en el primate con lesión severa donde su depuración renal se incrementó a más del doble de su valor inicial (figura 25), indicando que si bien pudiera existir una alteración en el flujo sanguíneo renal como consecuencia del desequilibrio homeostático inducido por la lesión medular, ésta pudiera no estar provocando una falla renal suficientemente significativa.

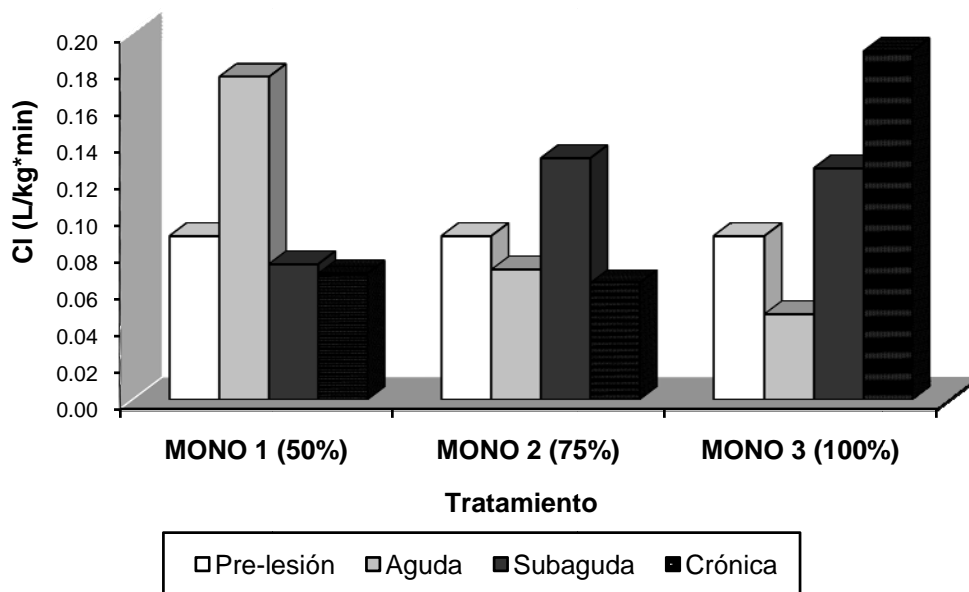


Figura 25. Comparación del CI de la ciprofloxacina en plasma de primate representando diferentes intensidades de compresión medular (50, 75 y 100 %) en fase crónica utilizando una dosis de 10 mg/kg administrada por infusión intravenosa a una velocidad de 30 mL/min.

Estudios previos han reportado que la biodisponibilidad de algunos fármacos, parece depender del nivel, intensidad de la lesión y tiempo del daño medular. <sup>(12,14 y 18)</sup> En nuestro proyecto, el nivel de la lesión se mantuvo constante (vértebra torácica T9), en tanto el tiempo transcurrido posterior a la lesión (24 horas, 15 días y 2 meses) y la intensidad de compresión para provocar la misma (50, 75 y 100 %) se consideraron como variables.

El resultado global con éste modelo experimental para ciprofloxacina parece reflejar el efecto de éstas variables sobre la alteración en la biodisponibilidad intravenosa del fármaco de mejor manera en el estado de tiempo agudo (24 horas después del proceso quirúrgico), como se observa en la Figura 26, donde la biodisponibilidad de la ciprofloxacina se incrementó de forma nivel-dependiente impactando en la vida media, depuración del antibiótico y considerablemente en la distribución del fármaco al incrementarse el volumen de distribución del mismo también de forma nivel-dependiente.

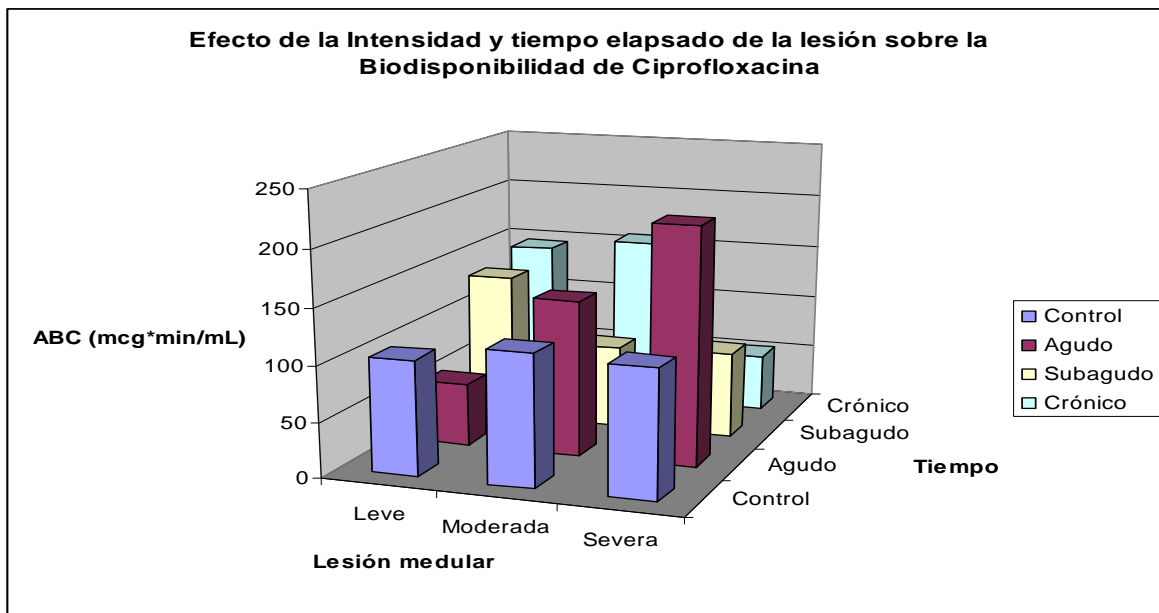


Figura 26. Efecto global de los mecanismos de distribución y eliminación sobre la biodisponibilidad (dada como  $ABC_{0ai}$ ) de ciprofloxacina administrada por infusión IV en primates provocándoles una LTME utilizando una dosis de 10 mg/Kg

No obstante para los estados subagudo (15 días posterior a la lesión) y crónico (2 meses después de la lesión), la asociación en éstas variables es más complicada y no se observa una tendencia tan claramente como a las 24 horas, bien sea por el proceso tan complejo que pasa el organismo después de la lesión, al estar en un estado de desequilibrio homeostático importante ó bien aunado al número limitado de animales de experimentación que por condiciones éticas se emplearon en éste estudio.

Sin embargo, se puede considerar que las alteraciones en el organismo después del trauma medular difieren en las diferentes etapas del estudio (aguda, subaguda y crónica) y también dependen de la fuerza de compresión sobre la médula espinal (100 %, 75 % y 50 %).

Donde el efecto de la intensidad y tiempo elapsado de la lesión sobre la biodisponibilidad y distribución de la ciprofloxacina administrada intravenosamente, se puede mencionar que en el caso de un Vd y un CI reducido pueden conllevar a una biodisponibilidad incrementada de la ciprofloxacina y contrariamente un Vd y un CI incrementado conllevan a una biodisponibilidad reducida de la ciprofloxacina.

Por ultimo en forma global se puede decir que aparentemente las alteraciones iniciales pueden estar relacionadas con la pérdida de la actividad espinal refleja por debajo e inmediatamente por arriba del nivel de la lesión medular, etapa conocida como choque espinal. En las etapas posteriores, la disfunción pudiera estar asociada con cambios plásticos en la médula espinal y en otros tejidos. <sup>(23)</sup> La manifestación de una LTME tiene grados de variación y es totalmente dependiente de la severidad y el nivel de la lesión medular. <sup>(28)</sup>

## VIII. CONCLUSIONES.

- Una LTME 24 horas, 15 días y 2 meses posterior a la lesión medular modifica los mecanismos de distribución y eliminación alterando la cinética de disposición del antibiótico ciprofloxacina administrado por vía intravenosa a primates no humanos.
- Los parámetros farmacocinéticos:  $ABC_{0-t}$ ,  $t_{1/2}$ , Cl y Vd se ven afectados de forma proporcional a medida que se incrementa la intensidad de contusión ó compresión medular 24 horas después de la lesión ó etapa aguda (etapa conocida como choque espinal), eventos atribuidos a cambios hemodinámicos presentes en ésta etapa de la lesión.
- En la etapa subaguda se observó una reversión de los parámetros farmacocinéticos con respecto a la etapa aguda, sugiriendo que en ésta etapa posiblemente se están presentando mecanismos de auto compensación que tratan de contrarrestar la disfunción del sistema nervioso autónomo provocando un desbalance de las actividades simpática y parasimpática.
- La etapa crónica de la LTME provoca un cambio significativo en la distribución y eliminación del antibiótico como consecuencia de un desequilibrio entre el líquido extra vascular con respecto al líquido intra vascular característicos en una LTME en estado crónico y alteraciones en la función renal respectivamente.

## IX. APLICACIÓN DEL PROYECTO.

- Los resultados obtenidos en el modelo experimental empleado (monos Rhesus *Macaca Mulata*) son altamente significativos en función a la aplicabilidad que puedan tener para su extrapolación a pacientes con padecimiento de lesión medular
- Se sugiere realizar un estudio similar al presente pero aplicado a primates Rhesus hembra y visualizar si el flujo plasmático renal se modifica de manera más significativa comparándolo con los resultados en primates Rhesus machos, ya que estudios en humanos se ha establecido una diferencia estadísticamente significativa entre ambos géneros en la fase aguda de una LTME como lo establece el estudio realizado por Guízar-Sahagún y colaboradores.<sup>(23)</sup>
- Por otra parte el método bioanalítico utilizado para la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate utilizando la técnica analítica de CLAR fue rápido y sencillo, ya que el tratamiento de las muestras biológicas es bastante simple y no requiere de mucho tiempo a comparación de otros métodos de extracción. En éste estudio se utilizó una precolumna la cual no disminuyó el porcentaje de recobro de la ciprofloxacina, mucho menos incrementó el tiempo de retención del antibiótico durante el análisis cromatográfico. De ésta manera se aseguró un tiempo de vida más prolongada de la columna utilizada.
- Finalmente se sugiere de ser posible realizar el estudio con un mayor numero de individuos (monos Rhesus) a fin de poder aplicar un análisis estadístico para determinar la posibilidad de una diferencia significativa en los parámetros farmacocinéticos entre tratamientos con y sin lesión, con el



fin de poder asegurar que los resultados obtenidos se sustenten científicamente como lo estipula la NOM-177-SSA1-1998 y la Ley General de Salud en materia de investigación clínica para la salud poblacional.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Afifi Adel, Bergham Ronald. **Neuroanatomía funcional**. 1999. Mc Graw-Hill Interamericana. México. pp: 61-91.
2. Albarellos G. A., Kreil V. E. and Landoni M. F. **Pharmacokinetics of ciprofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats**. J. Vet. Pharmacol. Therap. 2004. (27):155-162.
3. Anderson K. Douglas. **Chemical and Cellular Mediators in Spinal cord Injury**. Journal of Neurotrauma. 1992. 8(2):143-146.
4. Bravo G., Hong E., Rojas G., Guízar S. G. **Sympathetic blockade significantly improves cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury in rats**. Neuroscience Letters. 2002. (319):95-98.
5. Bravo G., Rojas M. R., Larios F., Hong E., Castañeda H. G., Rojas G., Guízar H. G. **Mechanisms involved in the cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury**. Life Sciences. 2001. (68):1527-1534.
6. Brenner M. George. **Pharmacology review**. 2000. W. B. Saunders Company. U. S. A. pp: 3-10.
7. Brown Phyllis and DeAntonis Kayhryn. **High-Performance Liquid Chromatography**. In: **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry**. 1997. Prentice Hall PTR. USA. pp: 147-164.

8. Cardús D, Wesley G, Mactaggart BS. **Total Body Water and its Distribution in Men with Spinal Cord Injury.** Arch Phys Med Rehabil. 1984. 65(9): 509-512.
9. Cid Cárcamo Edison. **Introducción a la farmacocinética.** 1982. Facultad de ciencias básicas y farmacéuticas. Santiago Chile. pp: 1-44.
10. Comisión interinstitucional de buenas prácticas de fabricación. **Guía de Validación de métodos analíticos.** 1994. México.
11. Crossman A. R., Neary D. **Neuroanatomía: Texto y atlas de color.** 2002. 2ª Edición. Masson. España. pp: 69-88.
12. Cruz A. Leticia, Flores M. Francisco J., García L. Rebeca, Guízar S. Gabriel, Castañeda H. Gilberto. **Understanding drug disposition alterations induced by acute spinal cord injury: Role of injury level and route of Administration for agents submitted to extensive liver metabolism.** J. of Neurotrauma. 2006. 23(1):75-85.
13. Frisbie J. H. **Microvascular instability in tetraplegic patients: Preliminary observations.** Spinal Cord. 2004. (42):290-293.
14. Fuentes L. Griselda, Guízar S. Gabriel, García L. Rebeca. **Effect of experimental spinal cord injury on salicylate Bioavailability after oral aspirin Administration.** J Pharmacol Toxicol. 1999. (42):93-97.
15. García López P., et al. **An Experimental Model for the Study of Pharmacokinetic Alterations Induced by Spinal Injury in the Rat.** Pharmaceutical Sciences. 1995. (1):133-135.

16. García L. Patricia, Salas Rebeca. **Bioavailability of diclofenac after intramuscular administration to rats with experimental spinal cord injury.** J Pharmacol Toxicol. 1999. (42):99-101.
17. García López P., et al. **Comparison Between Sprague- Dawley and Wistar Rats as an Experimental Model of Pharmacokinetic Alterations Induced by Spinal Cord Injury.** Archives of Medical Research. 1996. 27(4): 453-457.
18. García López P., et al. **Oral Paracetamol Bioavailability in rats subjected to Experimental Spinal Cord Injury.** Biopharmaceutics & Drug Disposition. 1997. 18(3): 203-211.
19. García Ovando H., Gorla N., Luders C., Poloni G., Errecalde C., Prieto G. and Puelles I. **Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens.** J. Vet. Pharmacol. Therap. 1999. (22):209-212.
20. Gibaldi Milo. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.** 1991. 4<sup>th</sup> Edition. LEA & FEBIGER. Philadelphia. pp: 187-201, 203-230.
21. Gilman M. Thomas., Et al. **Metoclopramide increases the bioavailability of dantroleno in spinal cord injury.** J. Clin. Pharmacol. 1996. (36):64-71.
22. Guidance for industry: **Bioanalytical method validation.** Department of health and human services food and drug administration, Center for drug evaluation and research and Center for veterinary medicine. 2001. pp: 1-20.
23. Guízar Sahagún G et al. **Pathophysiological Mechanisms Involved in Systemic and Metabolic Alterations secondary to Spinal Cord Injury.** Pharmacol. Soc. 1998. (41): 237-240.

24. Ibarra Antonio., Et al. **Alteration of cyclosporin-A pharmacokinetics after experimental spinal cord injury.** Journal of Neurotrauma. 1996. 13(5):267-272.
25. Imre S., Dogaru M. T., Vari C.E., Muntean T. and Kelemen L. **Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2003(33):125-130.
26. Nolte John. **El cerebro humano.** 1994. 3ª Edición. Mosby. España. pp: 119, 122, 126, 143-151.
27. **NOM-177-SSA1-1998.** Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realizan las pruebas.
28. Olive J. L., McCully K. K., Dudley G. A. **Blood flow response in individuals with incomplete spinal cord injuries.** Spinal Cord. 2002. (40):639-645.
29. Pointillart V., Et al. **Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase.** Spinal Cord. 2000. (38):71-76.
30. Profyris Ch., Cheema S. Surindar., Zang DaWei., Azari F. Michael., Boyle K., Petratos S. **Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury.** Neurobiology of Disease. 2004. (15):415-436.
31. Rowland Malcolm and Tozer N. Thomas.(1995). **Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications.** 3<sup>rd</sup> Edition. Williams & Wilkins. U.S.A. pp: 18-33, 137-183, 248-266, 313-339.
32. Segal L. Jack. Et al. **Amikacin pharmacokinetics in patients with spinal cord injury.** Pharmacotherapy. 1988. 8(2): 79-81.

33. Segal L. Jack., Et al. **Gentamicin Bioavailability and single-dose Pharmacokinetics in Spinal Cord Injury.** Drug Intelligence and Clinical Pharmacy. 1988. (22):461-465.
34. Segal L Jack. Et al. **Gentamicin disposition kinetics in humans with spinal cord injury.** Paraplejia. 1985. (23):47-55.
35. Segal L. Jack. Et al. **Impaired absorption of intramuscularly administered gentamicin in spinal cord injury.** Current therapeutic research. 1986. 39(6):961-969.
36. Shargel Leon, Andrew B.C. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics.** 1993. 3<sup>rd</sup> Edition. Appleton and Lange. U.S.A. pp: 33-47, 169-193.
37. Snell S. Richard. **Neuroanatomía clínica.** 2003. 5<sup>a</sup> Edición. Editorial Medica Panamericana. Argentina. pp: 166-184.
38. Sweefman C. Sean. **MartinDale: The complete drug reference.** 2005. 34<sup>th</sup> Edition. Pharmaceutical Press. Gran bretaña. pp: 188-192.
39. Turnidge John. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones.** Drugs. 1999. 58 Suppl. (2):29-36.
40. Vybiralová Z., Nobilis M., Zoulova J., Kvetina J. and Petr P. **High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2005(37): 851-858.