



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
“Zaragoza”

CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA DE
MICRODIÁLISIS PARA LA RECUPERACIÓN DEL
ANTINEOPLÁSICO DOXORRUBICINA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JULIO ARMANDO MENA HERNÁNDEZ

Directora de tesis:

Dra. Patricia García López

Asesora de tesis:

Dra. Liliana Carmona Aparicio



México, D.F.

2009



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.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICA
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

MENA HERNÁNDEZ JULIO ARMANDO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Caracterización de un sistema de microdiálisis para la recuperación del antineoplásico Doxorubicina.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO
VOCAL*	DRA. LILIANA CARMONA APARICIO
SECRETARIO	DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
SUPLENTE	M. en C. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA
SUPLENTE	M.en C. ALMA E. IBARRA CAZARES

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 25 de mayo de 2009.

DRA. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA

DE Q. F. B.

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología del Instituto
Nacional de Cancerología



Este proyecto fue apoyado por CONACYT
Proyecto número: 44386

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por la enseñanza académica, profesional y por la formación humanística responsable y crítica ante la sociedad.

A la **Dra. Patricia García López** que desde la facultad me proporciono los conocimientos encaminados, por su enseñanza y dirección, por la paciencia y confianza otorgada y sobre todo, por creer en mi.

A mi asesora **Dra. Liliana Carmona Aparicio**, el **Dr. Luis Alberto Medina** y al **M. en C. Enrique Pérez** por los conocimientos transmitidos, por el apoyo que recibí de ustedes, por el tiempo y consejos otorgados. De todos me quedo con lo mejor, gracias Lily.

A mis **sinodales** por la aportación a este trabajo.

A **mis padres** por otorgarme el regalo más sublime: la vida.

A **mis profesores, maestros y personal** por los conocimientos y consejos transmitidos, por su paciencia, por su labor, por las palmadas y correctivos justos.

A mis **compañeros de la FES Z** y mis **compañeros INCan-jeables** por su camarería, por su apoyo, por la complicidad juvenil y sobre todo por la amistad.

A **mi madre Margarita, Victoria** y a **mi Abuela** por la fuerza inyectada, por tu cuidado, por mi preparación ante el camino, por tus atenciones y por tu amor.

A **Eleazar Bravo** por dirigirme y apoyarme; por estar en momentos complicados y sobre todo por convertirme en mi padre.

A los integrantes del **Cuarteto de Coapa**: por sus consejos, por su compañía, por su ayuda, por su amistad, por las risas y los momentos que te facilitan a mantenerte en pie

A **Daniel Bravo** por tu hermandad; que lo mejor que pueda ofrecerte sean mis pasos de lucha y trabajo.

A **Armando Mena** por tus apoyos y lecciones.

A **Angélica Montañéz** por haber compartido la magia, por haber tomado mi mano y permitirme estar en tu corazón durante esta labor y por nuestra contra-ley. Que nuestros caminos estén colmados de aprendizaje, paz y amor.

A todos ustedes y a todas las personas que indirecta o directamente me han ayudado en la realización de éste trabajo; a todos esos seres especiales que me he encontrado en el camino y que me han aportado su conocimiento, cariño y cobijo, que me han permitido aprender de las reglas de la naturaleza humana, que sin su apoyo no hubiera sido posible concluir: A todos ustedes solamente les puedo decir: **GRACIAS**.

Dedico este trabajo a **Isabel Mena** (QEPD) por tus lecciones de vida que me enseñaste y me sigues dando, buen camino linda.

La paciencia es un árbol de raíces amargas y de frutos muy dulces; y así como en la vida decides probarlos o no; mantenidos con tu esfuerzo, constancia, libertad y tu rebeldía con sentido, con el mejor aliado que puedas tener: uno mismo.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Breve historia e incidencia del cáncer	3
2.2 Definición de cáncer	5
2.3 Quimioterapia en el tratamiento del cáncer	7
2.3.1 Objetivo de la quimioterapia	8
2.3.2 Desventajas de la quimioterapia	8
2.4 Doxorubicina	10
2.4.1 Características generales	10
2.4.2 Biotransformación de Doxorubicina	12
2.4.3. Propiedades farmacocinéticas de Doxorubicina	12
2.4.4 Mecanismo de acción de Doxorubicina	13
2.5 La disposición del fármaco y su relación con el efecto terapéutico en los tumores sólidos	14
2.5.1 El microambiente tumoral como factor que determina la disposición del fármaco	15
2.5.2 Factores farmacocinéticos	16
2.5.3 La microdiálisis como procedimiento de medición de la distribución del antineoplásico en los tumores sólidos	17
2.6 Microdiálisis	19
2.6.1 Principio de la microdiálisis	20
2.6.2 Factores que determinan la recuperación in vitro	23
2.6.2.1 Velocidad de perfusión	23
2.6.2.2 Características de la membrana	24
2.6.2.3 Temperatura	25
2.6.2.4 Propiedades del fármaco	25
3. Justificación	26
4. Objetivos	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27

5. Hipótesis	28
6. Metodología	29
6.1 Soluciones para microdiálisis	29
6.1.1 Preparación de vehículo de perfusión de microdiálisis	29
6.1.2 Solución del sistema de microdiálisis in vitro	29
6.2. Microdiálisis in vitro	29
6.2.1 Porcentaje de recuperación in vitro de doxorubicina a diferentes velocidades de perfusión y diferentes tiempos de muestreo	31
6.2.2 Estabilidad del porcentaje de recuperación in vitro de doxorubicina	31
6.3 Cuantificación de muestras por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	31
6.4 Análisis estadístico	31
7. Resultados	33
8. Discusión	41
9. Conclusión	47
10. Referencias bibliográficas	48

1. Resumen

El cáncer ocupa el tercer lugar de causas de defunción en la población mexicana según el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, (INEGI, 2006). Conforme se incrementa el nuevo panorama de la vida cotidiana se incrementan los factores de riesgo, siendo esta enfermedad un problema de salud nacional. Los avances tanto tecnológicos como científicos aportan una gran esperanza en el tratamiento de pacientes que presentan cáncer, pero la detección temprana aumenta la probabilidad de cura con lo cual la prevención resulta el método más adecuado para enfrentar la enfermedad; sin embargo, el porcentaje de defunciones generales causadas por tumores malignos en el año de 1997 fue de 11.6% y en el año de 2006 fue de 12.9%, (INEGI Estadísticas Vitales, 1997-2006). Estas estadísticas nos permiten sugerir que aún no son suficientes los avances en investigación y en tratamiento contra esta enfermedad. La quimioterapia es una alternativa para el combate de esta patología basándose en el uso de fármacos conocidos como antineoplásicos que se administran a pacientes con cáncer. Sin embargo, la poca especificidad y la alta toxicidad de los antineoplásicos que se emplean representan un obstáculo de esta terapia (Rang, 2004).

El efecto terapéutico de un fármaco esta relacionado con la disposición de éste en el sitio de acción (Michinton, 2006). En el caso del cáncer, el sitio de acción son las células tumorales. Los tumores se dividen en tumores líquidos (leucemias) y tumores sólidos (cáncer de mama, de pulmón, de próstata, de estómago, cérvico uterino; Pimentel, 2000). El microambiente de un tumor sólido se caracteriza por una vascularización heterogénea, incremento de factores de crecimiento, hipoxia, presión intersticial elevada, grandes distancias intercapilares etc., condiciones que reducen una biodistribución del fármaco en el centro de un tumor sólido (Jang *et al.*, 2003, Michinton *et al.*, 2006, Tannock *et al.*, 2002). Así que es importante determinar directamente la cantidad de fármaco que esta presente en un

tumor sólido. Un procedimiento que se ha utilizado para cuantificar la cantidad del fármaco en el interior del tumor sólido, es la microdiálisis (MD; Zhou, 2005). Esta técnica es un proceso en el cual a través de una membrana semipermeable se recolectan sustancias por una transferencia pasiva que cruzan la membrana en virtud de un gradiente de concentración establecido entre un líquido de perfusión y el medio extracelular (Robinson, 1991).

En este trabajo se estableció la caracterización del sistema de microdiálisis para la recuperación del antineoplásico Doxorubicina (DOXO) empleando una membrana de poliacrilonitrilo (AN 69) de 5 mm, y empleando diferentes velocidades de perfusión de 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 $\mu\text{l}/\text{min.}$, con periodos de recuperación de 20, 30 y 60 min. Además se evaluó la estabilidad de la recuperación de la muestra por un periodo de 36 horas. La cuantificación se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución ("High-performance liquid chromatography, HPLC") con un método previamente validado.

2. Introducción

2.1 Breve historia e incidencia del cáncer

La historia del cáncer es tan antigua como la historia de la propia humanidad. Los primeros escritos que hacen referencia de esta enfermedad datan de antes de 1500 a.C. en culturas como la hindú y persa (Estapé, 1991). Sin embargo, la primera referencia escrita sobre el cáncer, fue realizada por Herodoto hacia el año 520 a.C. Para el siglo XIV se comenzó con los tratamientos contra el cáncer, por ejemplo, Fabricio (1537-1619) abogó a favor de la extirpación completa de los tipos de cáncer y describió el riesgo de las intervenciones incompletas. Paré (1509-1590) dejó referencias escritas acerca del tratamiento del cáncer de mama. Con respecto a la metástasis que pueden presentar las células cancerosas, Ledran (1685-1770) estudió dicho comportamiento en el cáncer cutáneo y expresó la idea de la diseminación linfática a partir del tumor primitivo. La síntesis de sus doctrinas permitieron describir al cáncer como una lesión localizada inicialmente (curable quirúrgicamente), que se extendía a través de la glándulas linfáticas y tendía a recidivar (Estapé, 1991). Con el descubrimiento del microscopio acromático en 1824 en París, da inicio a la era histológica y Raspail en 1826 demuestra que el crecimiento de los tejidos es consecuencia de la multiplicación celular, con lo cual comienza las bases para poder entender el mecanismo de la enfermedad. En ese siglo se crea en Londres la primera Sociedad para la Investigación del Cáncer (Society for Investigation the Nature and Cure of Cancer). Aunque esta sociedad tuvo un lapso de vida corto (de 1802 a 1806) fue el primer intento para el ataque multidisciplinario al problema del cáncer (Estapé, 1991).

En 1902, Bowen establece que la prevención en esta enfermedad puede evitar el desarrollo de mayores complicaciones y demostró que la extirpación de la lesión benigna anula la lesión de la enfermedad. Papanicolau (1943) asienta esta idea con su trabajo, en el cual introduce la técnica que lleva su nombre y que por simple examinación del moco cervical permite el diagnóstico del carcinoma del cérvico-uterino (CaCU) *in situ* en mujeres asintomáticas (Estapé, 1991).

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados, y se espera que al menos una persona de cada cinco en Europa y Estados Unidos muera de cáncer. Los datos de los últimos 100 años sugieren que la incidencia de la enfermedad va en aumento en estos países (Abeloff, 2005).

En México en el año del 2006, el cáncer fue la tercera causa de muerte (INEGI. Estadísticas Vitales, 1997-2006). Cada año se registran 61 mil decesos y se diagnostican 100 mil nuevos casos. Entre los hombres los tumores malignos más comunes son los de tráquea, bronquios, pulmón, próstata y estómago. En tanto, las mujeres mueren principalmente por cáncer mamario y CaCU (Cruz, 2006). El Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) resaltó que de acuerdo con el volumen de su población, cuatro entidades concentran 37 de cada 100 fallecimientos por cáncer, el Distrito Federal 11.1%; Estado de México 10.5%; Veracruz 8.1% y Jalisco 7.2 % (INEGI, 2006).

El cáncer de mama, representa un desafío en materia de salud pública en nuestro país, ya que constituye la segunda causa de defunción por enfermedad neoplásica en la población femenina mayor de 25 años, después del CaCU (INEGI, 2006). La mortandad por cáncer mamario en México, mantiene una tendencia ascendente con algunas variaciones en los últimos registros (INEGI, 2006). En 2002 se notificaron 3,822 muertes por esta causa, lo que corresponde a una tasa de mortalidad de 15.18 defunciones por 100 mil mujeres mayores de 25 años. Esta tasa representa la cifra más alta jamás alcanzada por el país y significa que diariamente mueren un poco más de 10 mexicanas por cáncer mamario. Las perspectivas no son nada alentadoras, así lo demuestran las estadísticas. En el año 2002 datos preliminares del registro histopatológico, indican 11, 242 nuevos casos de cáncer de mama, que se presentaron, una cantidad excepcional si se compara con años anteriores en los que la cifra de 10 mil nuevos casos anuales, no se sobrepasaba. Esto significó que en las instituciones del Sistema Nacional de Salud del país, en ese año, fueron diagnosticados más de 50 casos de cáncer mamario en cada día laborable y, lo más dramático fue que la gran mayoría de estos casos se diagnosticaron en etapas avanzadas de la enfermedad (Cruz, 2006).

2.2 Definición de cáncer

El cáncer es una enfermedad debida a una proliferación excesiva de las células que puede llegar a una diseminación incontrolada en todo el organismo, que invaden, desplazan y destruyen localmente y a distancia otros tejidos sanos del organismo (Pimentel, 2000). El primer síntoma producido por esta población de células en crecimiento depende de su localización. Si surge en la piel, por ejemplo, producirán un crecimiento de rápida detección; en el pulmón puede causar una tos persistente o un inexplicable ataque de neumonía; en la mama, puede ser detectado simplemente como un bulto o tumor (Cairns, 1981).

Un tumor es el resultado final del proceso del desarrollo neoplásico, los cuales usualmente aparecen en un periodo largo en el organismo. El tumor es diagnosticado clínicamente cuando adquiere un tamaño detectable a la vista o al tacto. De acuerdo al comportamiento biológico y clínico con el organismo que presente el tumor se pueden tener dos grandes categorías. Tumores benignos y malignos. Por su expresión en el organismo los tumores pueden ser tumores líquidos o sólidos. Un tumor sólido no contiene áreas con quistes o líquido. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman. Los sarcomas, los carcinomas y los linfomas son ejemplos de tumores sólidos. Las leucemias (cáncer de la sangre), por lo general no forman tumores sólidos y son ejemplos de tumores líquidos (Pimentel, 2000).

Algunos tumores benignos causan serios daños al organismo por su largo tamaño o por el lugar donde se encuentre, los cuales pueden producir disturbios en los órganos y tejidos vecinos. Por ejemplo, algunos tumores benignos pueden producir obstrucciones en vías de circulación de fluidos corporales, los cuales pueden tener serios daños como el tejido del sistema nervioso central. Otros tumores benignos pueden presentarse en las glándulas endocrinas, como son las adenomas en las células- β de los islotes de Langerhans del páncreas que pueden producir daños metabólicos en la vida del paciente (Pimentel, 2000).

En la siguiente tabla se muestran las características más importantes de tumores benignos y malignos.

Tabla 1. Características importantes de los tumores benignos y malignos. (Pimentel, 2000).

Benigno	Maligno
Están bien definidos en relación con el entorno del tejido y están delimitados por una envoltura de tejido conectivo.	No presentan un contorno definido en relación con las demás células normales de alrededor y no están delimitadas por una envoltura de tejido conectivo.
Su crecimiento es lento y su expansión es de acuerdo a su origen, sin invasión o destrucción del tejido circundante normal.	En las etapas avanzadas de su desarrollo, su crecimiento es aparentemente rápido y es acompañado con invasión y destrucción del tejido normal circundante.
No se presenta diseminación y tampoco da origen a metástasis.	Presentan una tendencia a diseminación en forma de metástasis, lo cual da como resultado la formación de tumores secundarios.
Normalmente son curables y se pueden remover por cirugía.	La erradicación total es difícil, lo cual da como resultado una serie de procedimientos terapéuticos agresivos.
No contribuyen a la reducción del tiempo promedio de vida del paciente.	Su reducción, algunas veces, queda limitada dependiendo de la sobrevida del paciente.

2.3 Quimioterapia en el tratamiento del cáncer

La intervención quirúrgica, la radioterapia, terapia hormonal y quimioterapia son las terapias frecuentemente usadas en el tratamiento del cáncer y dependen del estadio en el cual se encuentre la enfermedad y pueden emplearse en combinación (Myers, 1990).

El término Quimioterapia fue acuñado por Ehrlich a comienzos del siglo XX con el fin de describir la utilización de sustancias químicas sintéticas para destruir microorganismos infecciosos. En los últimos años, la definición del término se ha ampliado e incluye a los antibióticos (que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos). También se puede ampliar el término para englobar la quimioterapia frente al cáncer (Rang, 2004). Existen tres métodos para tratar el cáncer ya establecidos, la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. La importancia de cada una de ellas depende del tipo del tumor y del estadio de su desarrollo (Rang, 2004). La quimioterapia aislada se puede utilizar como complemento de otras formas de tratamiento. La quimioterapia adyuvante constituye la prolongación lógica del uso de la quimioterapia en los pacientes que conservan un riesgo elevado de recidiva una vez que se ha erradicado toda la enfermedad clínicamente detectable y ha demostrado disminuir el riesgo a recurrencia por lo que se considera un estándar de tratamiento (Arce, 2006). En algunos cánceres específicos, la aplicación de quimioterapia antes, de cualquier otro tratamiento neoadyuvante, puede mejorar la supervivencia o conservación del órgano y el mantenimiento de la función (Perry, 2005).

El empleo más frecuente de la quimioterapia contra el cáncer tiene lugar en el tratamiento de las enfermedades avanzadas metastásicas. Aunque sea curativa en varios cánceres avanzados, su carácter es básicamente paliativo para la enfermedad metastásica. Prácticamente todas las pautas de quimioterapia curativa ideadas contra los tumores malignos recurren a combinaciones de sustancias activas. La poliquimioterapia también aventaja al empleo de productos por separado en el tratamiento adyuvante posquirúrgico y en el tratamiento neoadyuvante (Perry, 2005).

2.3.1 Objetivo de la quimioterapia

La quimioterapia del cáncer tiene como finalidad causar una lesión citotóxica letal que detenga el progreso del tumor en tratamiento. El ataque suele dirigirse contra los sitios metabólicos esenciales para la multiplicación celular, por ejemplo, los precursores de purina y pirimidina disponibles para la síntesis de ADN o ARN. Lo ideal es que estos fármacos sólo interfieran con los procesos celulares únicos de las células malignas. Sin embargo, los fármacos antineoplásicos usados en la quimioterapia carecen de una acción específica contra las células cancerosas con lo cual afectan a las células que proliferan, tanto normales como cancerosas. Por este motivo casi todos los agentes antitumorales tienen una curva de dosis-respuesta cercana tanto como para los efectos tóxicos como para los terapéuticos; en consecuencia es importante ajustar las dosis de los fármacos al estado físico del paciente (Mycek, 2004).

2.3.2 Desventajas de la quimioterapia

Una de las principales dificultades de la utilización de la quimioterapia antineoplásica es que un tumor habitualmente se encuentra en un estado avanzado antes de que se diagnostique. Un tumor surge de una sola célula y crece exponencialmente (primeras fases). Este crecimiento es diferente dependiendo de los tiempos de duplicación de cada tumor y son de manera aproximada de 24 horas en el linfoma de Burrrkit, dos semanas en algunas leucemias y tres meses en los cánceres de mama (Rang, 2004). Hacen falta unas treinta duplicaciones para generar una masa celular tumoral con un diámetro de 2 cm, que contiene 10^9 células. Un tumor de este tamaño está dentro de los límites de los procedimientos de diagnósticos, aunque podría pasar por desapercibido en muchos órganos, como el hígado. Otras diez duplicaciones darían lugar a 10^{12} células, una masa tumoral que probablemente sea mortal y que mediría alrededor de 20 cm de diámetro si todas las células estuvieran en un mismo conjunto. Por tanto, la neoplasia podría ser silente las tres primeras cuartas partes o más de su existencia y el problema de detener su desarrollo después del diagnóstico, cuando existen cifras muy elevadas de células neoplásicas, es considerable (Rang, 2004).

El crecimiento exponencial continuo de este tipo no ocurre de manera habitual. En la mayoría de los tumores sólidos (pulmón, estómago, mama, útero, etc.), la velocidad de crecimiento disminuye al aumentar el tamaño del tumor. Esto se debe en parte a que el tumor tiende a sobrepasar su capacidad de mantener su aporte sanguíneo, con una necrosis secundaria de su masa, además, no todas las células proliferan de manera continua. Se puede considerar que las células de un tumor sólido se dividen en tres compartimientos:

- El compartimiento A está formado por células en división, que probablemente se encuentran continuamente en el ciclo celular
- El compartimiento B lo forman células en reposo (fase G_0): células que aunque no se están dividiendo, si pueden hacerlo
- El compartimiento C está constituido por células que no se pueden dividir, pero que contribuyen al volumen tumoral (Rang, 2004).

En esencia sólo las células del compartimiento A que pueden suponer tan poco como el 5% de algunos tumores sólidos, son sensibles a los principales fármacos citotóxicos de los que se dispone en la actualidad. Las células del compartimiento C no representan un problema; es la existencia de las células del compartimiento B la que hace que la quimioterapia antineoplásica sea difícil, ya que estas células no son sensibles a los fármacos citotóxicos, aunque pueden pasar al compartimiento A después de un ciclo de quimioterapia (Rang, 2004).

La mayoría de los fármacos antineoplásicos que se utilizan en la actualidad, especialmente los que son citotóxicos, afectan sólo a la primera de las características de las células cancerosas que se han señalado con anterioridad: el proceso de división celular, es decir, son antiproliferativos; carecen de efectos inhibidores específicos sobre la invasibilidad, la pérdida de la diferenciación o la tendencia a producir metástasis. Por ejemplo, su acción antiproliferativa se debe principalmente a su acción sobre la fase S del ciclo celular y la lesión secundaria del ADN inicia la apoptosis. Además, debido a su efecto principal sobre la división celular, todos afectan a las células de tejidos normales que se dividen y de esta manera es probable que originen en mayor o menor medida los siguientes efectos tóxicos generales:

Toxicidad sobre la médula ósea (mielodepresión), alteración de la cicatrización de las heridas, pérdida de cabello (alopecia), lesión del epitelio digestivo, trastorno en el crecimiento de los niños, esterilidad y teratogenicidad (Rang, 2004).

En ciertas circunstancias los fármacos antineoplásicos pueden ser carcinógenos (es decir, producen cáncer por sí mismos). Además, si hay una rápida destrucción celular con un catabolismo generalizado de purinas, los uratos pueden precipitar en los túbulos renales y provocan una lesión renal. Finalmente, prácticamente todos los fármacos antineoplásicos producen náuseas y vómitos intensos (Rang, 2004).

En particular el fármaco antineoplásico de nuestro interés es Doxorubicina el cual será descrito a continuación.

2.4 Doxorubicina

Doxorubicina (DOXO) es un antibiótico antineoplásico aislado de un cultivo de *Streptomyces peucetius*. La dosis que se administra es en forma de sal de clorhidrato en combinación con lactosa. Su nombre químico es: 10-[(3-Amino-2,3,6-tridoxi-L-lixo-Hexopiranosil) oxi] - 7, 8, 9, 10 - tetrahidro 6, 8, 11 – trihidroxi - 8 - (hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-nartacanadiona. El nombre genérico es Adriamicina, aunque recibe otros nombres como: 4-hidroxi-daunomicina, Adriacina, Adriblastina, Rubex (Figura 1; The Merck Index, 1983).

2.4.1 Características generales

La DOXO se clasifica como un antibiótico del grupo de la antraciclina. Este fármaco a menudo se le denomina con su nombre comercial Adriamicina® (análogo hidroxilado de la daunorubicina). La DOXO se usa frecuentemente en asociación con otros antineoplásicos en tratamientos contra la leucemia aguda linfoblástica, la leucemia mieloblástica, el tumor de Wilms, la neuroblastoma, los sarcomas óseos y los de tejidos blandos, el carcinoma ovárico y de mama, los linfomas Hodgkin y no-Hodgkin así como el carcinoma de células pequeñas (Florey, 1980; The Merck Index, 1983).

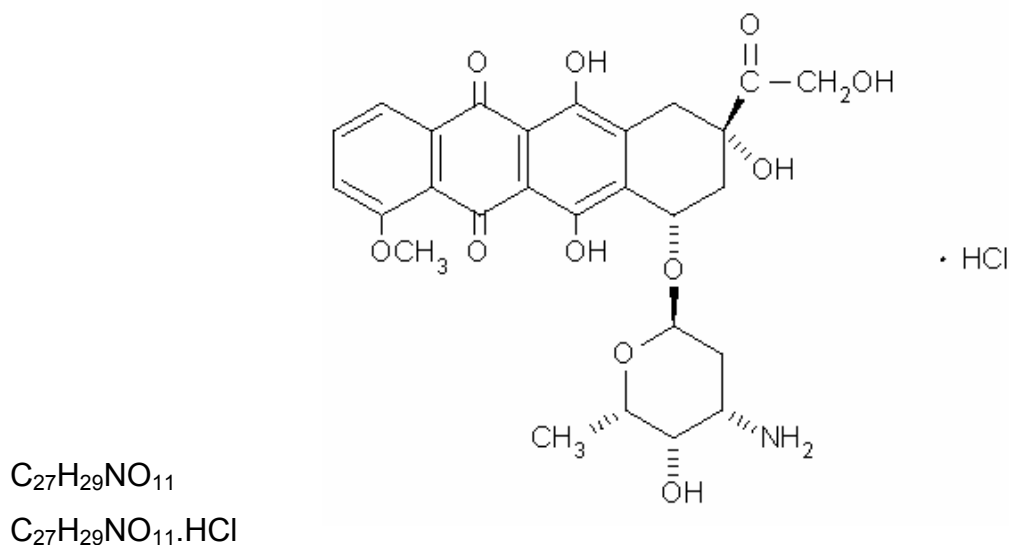


Figura 1. Estructura química de Doxorubicina. Se observa el grupo cromóforo de la estructura química de DOXO compuesto por los anillos aromáticos a los cuales se les atribuye el color rojo de la molécula, en la parte inferior izquierda se encuentra la fórmula condensada de DOXO y la sal, responsable de la solubilidad en sustancias polares (Tomado de The Merck Index, 1983).

El peso molecular de DOXO es de 543.54 g/mol. En el clorhidrato su peso molecular es de 580.0 g/mol. Presenta forma de agujas de color rojizas a naranjas, su punto de fusión es de 204-205 °C, $[\alpha]_{20D} +248^\circ$ ($c = 0.1$ en metanol), es soluble en agua, metanol y en alcohol diluido. El clorhidrato de DOXO es soluble en agua, solución salina, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Es prácticamente insoluble en acetona, benceno, cloroformo, éter etílico y éter de petróleo. En soluciones ácidas presenta tonalidades de amarillas a naranjas, en neutras se presenta en tonalidades rojas a naranjas y en soluciones alcalinas >9 presenta tonalidades de azul a violetas. DOXO es estable en soluciones ácidas en un rango de pH de 3.0 a 6.5 pero se descompone cuando el pH incrementa de 6.5 a 12.0. La dosis letal 50 (DL_{50}) por vía intravenosa en ratones es de 21.1 mg/Kg (Florey 1980).

2.4.2 Biotransformación de Doxorubicina

El metabolismo de DOXO se lleva a cabo de la siguiente manera: 1) reducción de la cadena de carbonilo a alcohol, dando como resultado disminución de la actividad; 2) la reducción de un electrón a semiquinona en radical libre puede dar como resultado un superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo; 3) la reducción de dos electrones con formación de aglicona, que da por resultado a un intermediario de quinona metilada que funciona como un agente alquilante, y 4) el hierro puede quelar la cadena, produciendo una oxidación y ruptura de esta misma (Myers, 1990).

2.4.3. Propiedades farmacocinéticas de Doxorubicina

La farmacocinética de DOXO presenta, un volumen de distribución de 25 litros, con una unión a proteínas del 70%, y circula predominantemente como doxorubicinol que es el metabolito más común. Con la administración intravenosa de DOXO, se alcanza concentraciones plasmáticas de forma rápida y una amplia distribución siendo ésta significativa y posterior unión a varios tejidos. La excreción urinaria determinada por métodos fluorimétricos, alcanza aproximadamente el 4-5% de la dosis administrada en cinco días. La excreción biliar representa la mayor vía de eliminación, el 40-50% de la dosis administrada se recupera en la bilis o en las heces en los siete días siguientes (Myers, 1990). La principal ruta de eliminación es la hepática, por aldo-ceto reductasas, llevando a cabo una reducción de la cadena, excreción biliar, y formación de aglicona. El factor limitante que predomina en la eliminación es la lenta disociación del fármaco en el tejido debido a la unión en los sitios de acción, predominantemente ADN, la cual presenta una muy lenta capacidad de metabolismo en el hígado (Myers, 1990). Alteraciones de la función hepática dan como resultado una lenta eliminación y consecuentemente un aumento de la retención y acumulación en plasma y tejidos. La DOXO no atraviesa la barrera hematoencefálica (Rang, 2004).

2.4.4 Mecanismo de acción de Doxorrubicina

La DOXO tiene varias acciones citotóxicas. Se une al ADN e inhibe la síntesis de ADN y ARN, además la reductasa del citocromo P-450 cataliza la reducción de las antraciclinasen radicales simiquinonas libres. A su vez éstos reducen el O₂ molecular y originan iones superóxido y peróxido de hidrógeno que provocan el corte de una sola banda del ADN (Mycek, 2004); pero su principal acción citotóxica parece estar mediada por un efecto sobre la topoisomerasa II (una ADN girasa) cuya actividad ésta notablemente aumentada en las células que proliferan. La importancia de esta enzima radica en que durante la duplicación de la hélice de ADN, debe tener lugar un desdoblamiento reversible alrededor de la horquilla de replicación para impedir que la molécula hija de ADN se enrede durante la segregación mitótica. El desdoblamiento se debe a la topoisomerasa II, que produce cortes en las dos hebras de ADN y posteriormente sella las roturas. DOXO se intercala en el ADN y su efecto consiste, en esencia, en estabilizar el complejo ADN-topoisomerasa II después de la ruptura de las hebras, haciendo de esta manera que el proceso se paralice en este punto (Rang, 2004).

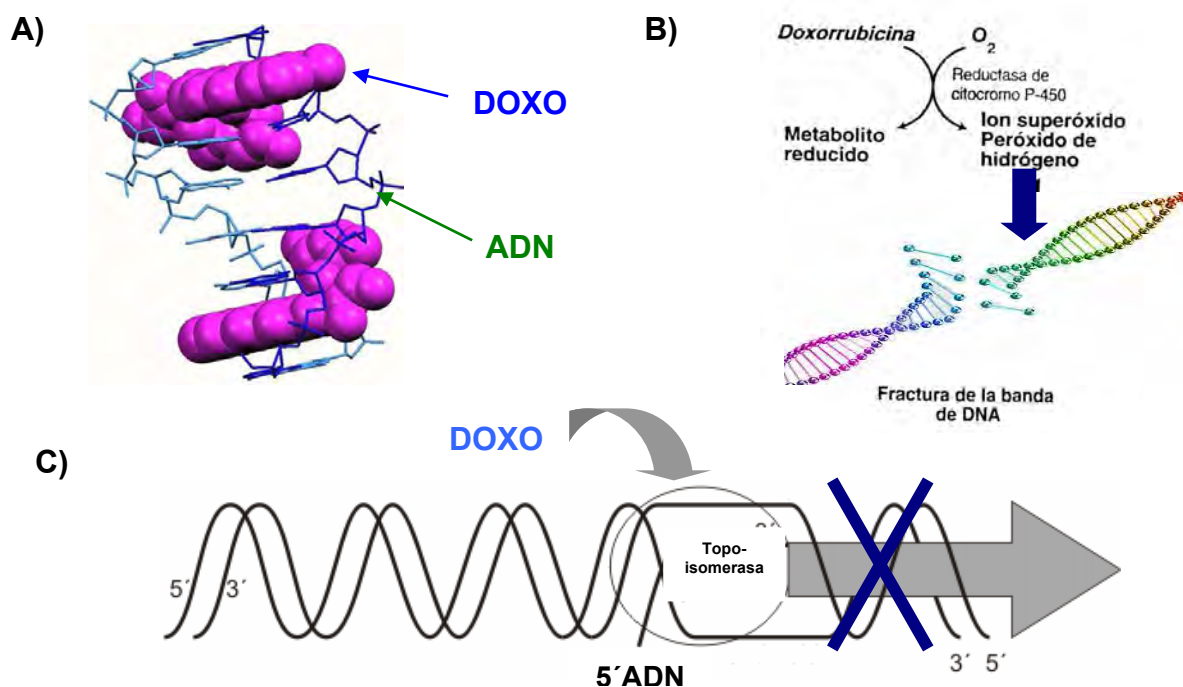


Figura 2. Mecanismos de DOXO. a) Imagen tridimensional del intercalamiento de DOXO entre la molécula de ADN, b) Producción de iones superóxido y peróxido de hidrógeno debido a la interacción de DOXO con el O₂ molecular provocando las fracturas en la banda sencilla del ADN y c) DOXO inhibe la síntesis de ADN interfiriendo en la acción de la topoisomerasa (Myers, 1990; Mycek, 2004 y Rang, 2004)

Los efectos indeseables de DOXO son la mielosupresión, la mucositis, la alopecia, además, puede producir lesiones cardíacas acumulativas relacionadas con las dosis, que originan arritmias e insuficiencia cardíaca. Esta acción puede ser consecuencia de la generación de radicales libres. La extravasación en el lugar de inyección puede provocar una necrosis local (Myers, 1990).

2.5 La disposición del fármaco y su relación con el efecto terapéutico en los tumores sólidos.

En seres humanos, los tumores sólidos son los más frecuentes (85%; Jang *et al.*, 2003). La mayoría de los tumores sólidos, de forma innata o adquirida terminan siendo resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes (Sánchez, 2006). Actualmente, la quimioterapia obtiene un porcentaje significativo de respuestas en un elevado número de pacientes que mejoran de manera importante pero, no es menos cierto, que al cabo de un tiempo, muchos de ellos experimentan recaída de su proceso lo que les conduce a un desenlace fatal (Moyano, 2008).

El efecto terapéutico de los antineoplásicos en el tratamiento del cáncer depende de una disposición adecuada del fármaco en las células tumorales (Chu *et al.*, 2000). Una disposición deficiente del antineoplásico en las células tumorales podría resultar en una regeneración del tumor y un posible desarrollo de células resistentes (Jang *et al.*, 2003). En los tumores sólidos (cáncer de pulmón, de mama y de colón) el mantenimiento de la dosis terapéutica tiene un mayor impacto que en los tumores líquidos (leucemias y linfomas). Aunque los mecanismos intracelulares son ampliamente reconocidos como factores de resistencia en las células tumorales y repercusión en el efecto terapéutico, con mayor frecuencia se pone atención a los puntos relacionados a la disposición del fármaco y el transporte de este hacia las células tumorales y su resultado en el efecto terapéutico (Chu *et al.*, 2000). Para que el antineoplásico llegue hasta el tumor, el fármaco debe pasar por una serie de barreras las cuales pueden limitar la presencia del fármaco en las células tumorales (Chu *et al.*, 2000).

Los antineoplásicos empleados en el tratamiento del cáncer son administrados por vía intravenosa u oral. Después de la administración sistémica del fármaco, la disposición de éste hacia las células tumorales se lleva a cabo en tres procesos: el transporte en el interior de los vasos sanguíneos (circulación sanguínea), el paso desde los vasos sanguíneos hacia el interior del tejido y el transporte hacia el interior del tumor desde el espacio intersticial (Jain *et al.*, 1989). Estos procesos son determinados por las propiedades del fármaco como son: el peso molecular o tamaño de partícula, solubilidad, presencia de cargas en la molécula, difusividad, unión a proteínas (Jang *et al.*, 2003; Minchinton *et al.*, 2006) y las propiedades biológicas, fisiológicas y físicas del tumor, como el microambiente tumoral (Jang *et al.*, 2003).

2.5.1 El microambiente tumoral como factor que determina la disposición del fármaco

La poca respuesta del fármaco en el conjunto de células cancerosas y el ambiente que rodea a estas, microambiente tumoral, viene a representar la dificultad de la captación de un determinado fármaco debido a la capa multicelular relacionado a una distribución heterogénea de los vasos sanguíneos (Hazlehurst *et al.*, 2000; Tannock *et al.*, 2002; Tunggal *et al.*, 1999; Tunggal *et al.*, 2000).

Las células cancerosas presentan una proliferación más rápida a la formación de capilares sanguíneos que las células normales. Dicha proliferación provoca un distanciamiento entre los capilares sanguíneos y los vasos sanguíneos (>100 μm ; Tannock *et al.*, 2002). Este fenómeno provoca una organización deficiente en la arquitectura vascular, flujo sanguíneo irregular y la compresión de vasos sanguíneos y linfáticos (Chaplin *et al.*, 1987). La hipoxia resultante es el sello característico de microambiente tumoral, además la desorganización vascular y la ausencia de funcionalidad de los vasos linfáticos causa un incremento en la presión del fluido intersticial (Leu *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2002). Finalmente, la estructura y la composición de la matriz extracelular puede hacer una disminución en el movimiento de moléculas hacia el interior del tumor (Netti *et al.*, 2000).

En un tumor sólido existe una pobre vascularización que produce una limitada liberación de oxígeno, otros nutrientes y fármacos hacia las células cancerosas. Además, los productos del metabolismo como ácido láctico y carbónico produce una disminución en el pH extracelular provocando una acidificación del microambiente lo cual puede repercutir en la estabilidad de algunos fármacos ya que a determinado pH comienzan a ionizarse (Tannock *et al.*, 2002). Además, se sabe que las células malignas que se encuentran en un medio ácido evidencian mayor resistencia que las células normales. Así, un gradiente de pH hacia la región ácida (1-5 de pH) inhibe la acumulación intracelular de fármacos que son bases débiles como la Doxorubicina (Moyano, 2008). La presencia de células hipóxicas en el tumor sólido es ampliamente reconocido (Tannock *et al.*, 2002), y se ha establecido que dichas células son resistentes al tratamiento de radioterapia (Moulder *et al.*, 1987).

2.5.2 Factores farmacocinéticos

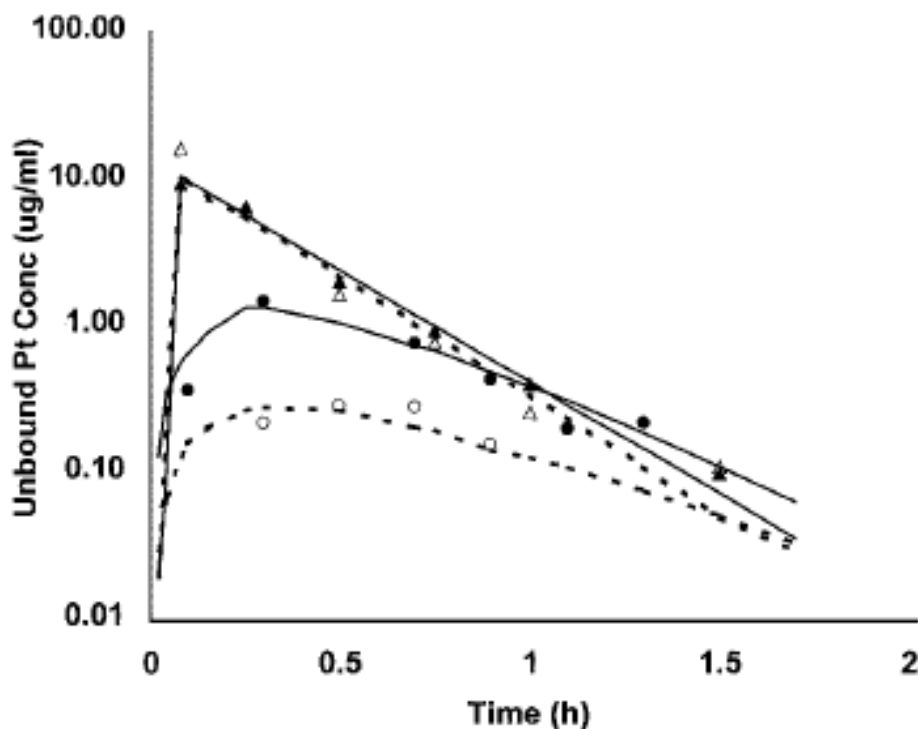
Las fallas en el tratamiento con quimioterapia hacia los pacientes se atribuyen en algunos casos a la farmacocinética y farmacodinamia, los cuales se reflejan en el desarrollo de una resistencia al tratamiento de los fármacos y una inadecuada concentración en el tumor (Galmarini *et al.*, 2003; Hryniuk *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 2005).

El fármaco después de haber sido administrado por vía oral o intravenosa llega a la circulación sistémica y las concentraciones del fármaco son determinadas en plasma en función del tiempo después de la administración (Allen *et al.*, 1982). El comportamiento del fármaco es descrito por parámetros como el volumen de distribución (Vd), vida media ($t_{1/2}$) y depuración (Cl). Aunque estos parámetros son importantes para determinar la disposición total del fármaco, los cuales relacionan la toxicidad que pueden presentar algunos órganos y dan información con respecto al régimen de administración, también proporcionan información con respecto a la penetrabilidad hacia las células tumorales. Por ejemplo, mitoxantrona tiene un Vd alto debido al secuestro del fármaco en tejidos sanos pero tiene una pobre penetración hacia el interior del tejido tumoral (Tannock *et al.*, 2002).

La concentración presente en el tejido blanco es ampliamente reconocido que esta relacionado con el efecto farmacológico (Zhou *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2003). La relación exitosa entre la concentración plasmática y el efecto terapéutico ha sido definida por una gran variedad de esquemas en diferentes clases de fármacos; la concentración plasmática es comúnmente usada como el reflejo de la concentración del fármaco en los diferentes sitios del organismo (Masson *et al.*, 1997). Sin embargo, el microambiente en el interior del tumor es significativamente diferente al de un tejido sano. Muchos factores tales como el flujo sanguíneo heterogéneo, permeabilidad vascular, y densidad celular, así como presión intersticial puede impedir la liberación y penetración del fármaco desde el plasma hacia el interior del tumor, provocando una compleja relación entre la concentración en el plasma, intersticio y las células neoplásicas (Tannock *et al.*, 2002). La concentración de un antineoplásico es menor en el tejido tumoral que en el tejido normal debido a las diferencias fisiológicas del microambiente tumoral (Tannock *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2005). Esta situación se puede confirmar en los experimentos realizados por Zamboni *et al.*, (2002; gráfica 1), en los cuales comparan, en dos modelos experimentales de cáncer (melanoma y pulmón), las concentraciones de platino provenientes del cisplatino (Cis-Pt) en plasma y en el líquido extracelular del tumor obtenidos por microdiálisis reflejando diferencias marcadas en las concentraciones.

2.5.3 La microdiálisis como procedimiento de medición de la distribución del antineoplásico en los tumores sólidos

El efecto terapéutico del antineoplásico se determina por la exposición del fármaco en el tumor sólido más que en las concentraciones plasmáticas (Front *et al.*, 1987; Blomquist *et al.*, 1991; Dikic *et al.*, 1998; Zamboni *et al.*, 2002). Uno de los obstáculos que se presenta en la farmacocinética de los antineoplásicos se refiere a la incapacidad de cuantificar de forma directa y exacta la distribución del fármaco en el interior de tejido tumoral, lo cual repercute en la caracterización de los eventos farmacocinéticos tales como la liberación, absorción, metabolismo y eliminación del fármaco (Brunner *et al.*, 2002).



Gráfica 1. Estudio farmacocinético de platino libre en muestras plasmáticas y tumorales después de administrar 10 mg/Kg de cisplatino a modelos tumorales. El primer modelo tumoral corresponde a un modelo murino de melanoma, pueden observarse los datos individuales los cuales corresponden a plasma ▲ y al fluido extracelular del tumor ●. El segundo modelo tumoral corresponde a un modelo de xenograftos de pulmón de origen humano, se puede observar los datos individuales los cuales corresponden a plasma △ y al fluido extracelular del tumor ○ (Tomado de Zamboni, 2002).

La medición de las concentraciones del fármaco en el tumor no es un aspecto trivial, ya que esta operación resulta limitada por factores como el microambiente tumoral. Hasta la fecha, se han utilizado medidas indirectas para conocer la concentración del fármaco en el tumor, tales como el análisis de plasma mediante estudios farmacocinéticos (Brunner *et al.*, 2002). Por otra parte, las biopsias se usan como procedimientos rudimentarios para la cuantificación del fármaco y se utilizan para evaluar sólo algunos puntos temporales, sin embargo, este es un proceso invasivo y éticamente es poco aceptable. Otro procedimiento que comúnmente se ha utilizado para obtener concentraciones tumorales del antineoplásico se refiere a los homogenados tumorales. En este proceso se evalúa la concentración total del

fármaco, que representa un promedio de las concentraciones vasculares, intersticiales y las cantidades intracelulares; las cuales invariablemente limitan la evaluación del fenómeno en un sitio específico. Otro inconveniente con respecto a estos procesos es el sacrificio serial de animales. Cada animal contribuye a un punto de muestreo en un intervalo de tiempo, resultando en una alta variabilidad y la interpretación de los resultados resulta comprometida (Chu *et al.*, 2000).

Existen otras alternativas para la cuantificación del antineoplásico en el tejido tumoral, las cuales se basan en el empleo de núcleos radioactivos unidos al fármaco (radiofármaco), junto con técnicas de medicina nuclear o de autorradiografía. Sin embargo, estos métodos requieren que el personal se exponga a la radiación emitida, además de la necesidad de contar con equipos detectores de radiación y de generación y procesamiento de imágenes. Recientemente se ha usado otro tipo de proceso para la cuantificación de antineoplásicos en el tejido tumoral, denominado microdiálisis (Brunner *et al.*, 2002).

2.6 Microdiálisis

La microdiálisis (MD) es una técnica de recolección de muestras en sitios específicos utilizando una membrana semipermeable que se utiliza para evaluar especies químicas de los espacios extracelulares en diferentes tejidos (Rocha, 1997). En el proceso de MD se puede utilizar animales anestesiados o en libre movimiento (Elmqvist *et al.*, 1997).

En la MD el fármaco es evaluado en un proceso continuo lo cual refleja una relación entre la concentración obtenida y la del sitio de implantación de la membrana de MD. En contraste con las farmacocinéticas tradicionales en sangre o en tejido, la evaluación es por puntos de tiempo establecidos (Elmqvist *et al.*, 1997).

La MD fue originalmente desarrollada para recolectar muestras de neurotransmisores en sitios específicos del cerebro (Robinson, 1991). El análisis de las funciones bioquímicas del organismo comúnmente se ha llevado a cabo en muestras sanguíneas o en disecciones de tejidos. Sin embargo, las muestras sanguíneas reflejan poco los eventos que ocurren en las células y en los órganos; las disecciones de tejidos representan una imagen detenida de los eventos

bioquímicos, es decir, una mezcla química de organelos, células y el fluido extracelular. El intercambio químico entre las células ocurre en el fluido extracelular pero este compartimiento generalmente es un acceso experimental limitado (Robinson, 1991). Existe una lista variada de experimentos en los cuales se tiene acceso en el espacio extracelular en tejido intacto por ejemplo perfusión ventricular, cánulas de “push-pull” (Gaddum, 1961) y copas de perfusión corticales. No obstante, parece que la idea de introducir una membrana de diálisis en el interior del tejido fue la que proporciono por primera vez una forma aplicable de interacción con el compartimiento extracelular (Robinson, 1991). proveo

Bito *et al*, en 1966 fueron los primeros en implantar “sacos de diálisis” conteniendo 6% de dextrán en solución salina en el interior del tejido subcutáneo del cuello y en el interior del parénquima en el hemisferio cerebral de perros. Después de diez semanas los sacos fueron removidos quirúrgicamente y se analizó el contenido de los aminoácidos. Estos experimentos introdujeron la idea de un “compartimiento” rodeado por una membrana de diálisis en los cuales se presenta un equilibrio en el espacio extracelular (Robinson, 1991).

El principio de la técnica de MD actual fue concebido en 1974, por Ungersted y Pycock al observar a través de un microscopio de fluorescencia, que la dopamina radioactiva difundía de las terminales nerviosas a los vasos sanguíneos cercanos. Estos investigadores implantaron entonces fibras de diálisis, que funcionarían como vasos sanguíneos a través de los cuales se recuperarían neurotransmisores presentes en el espacio extracelular cercanos (Robinson, 1991).

2.6.1 Principio de la microdiálisis

El proceso de MD se basa en el fenómeno de difusión el cual se presenta cuando una sustancia no esta homogéneamente distribuida en un medio, propicia que exista una fuerza que tienda a igualar el potencial químico de la misma en todo el espacio; produciéndose, por lo tanto un flujo de moléculas desde la partes de donde sea mayor el potencial químico de esta sustancia hasta donde sea menor (Figura 2; Kenneth *et al*, 2002). Es un proceso espontáneo e irreversible (Sanz, 1992). En dicho fenómeno, una sustancia en solución se expande como consecuencia del

movimiento de sus partículas, hasta ocupar todo el volumen disponible en el que se encuentran. El movimiento es constante y al azar, es decir, las moléculas pueden moverse hacia una dirección u otra de manera indistinta. Sin embargo, si se toma en cuenta que el número de partículas de una sustancia dada es mayor en sitios en los que se encuentra en alta concentración, predomina el desplazamiento hacia sitios de baja concentración. Por ende, se establece una difusión neta de la sustancia desde los sitios de alta hacia sitios de baja concentración (Jaitovich, 2003). Solo las moléculas de determinado peso molecular atraviesan la membrana semipermeable, la cual se caracteriza por un tamaño de poro específico (Verbeeck, 2000).

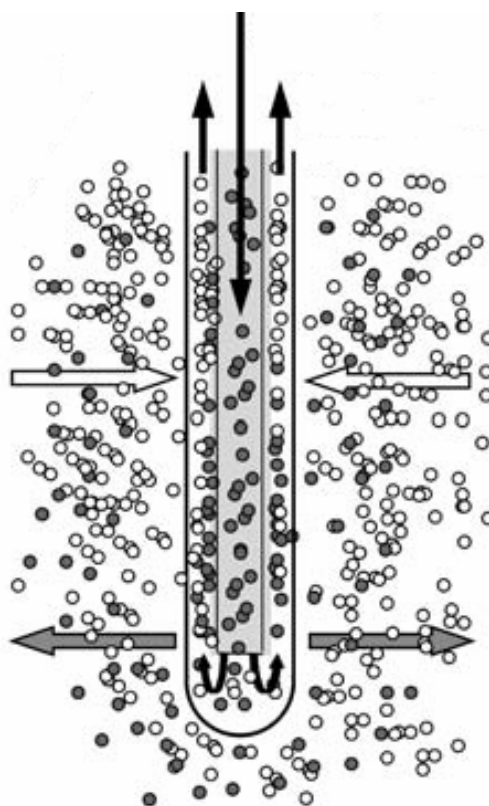


Figura 3. Principio de la microdiálisis. El principio básico es la colocación de una membrana semipermeable en la cual se lleva a cabo la difusión pasiva de agua ● y de los solutos entre la solución de interés □. En la imagen se observa la dirección hacia el interior y salida del vehículo de perfusión ➡, hacia el interior de la membrana del analito a recuperar ⇨ y la salida del vehículo de la membrana ⇨; dichos intercambios suceden por el fenómeno de difusión e inicia el intercambio entre las moléculas (Modificado de Chaurasia, 2007).

La MD involucra el paso de un vehículo a determinada velocidad de perfusión (VP) a través de la membrana (acción llamada perfusión), la cual está implantada en un tejido para el caso de modelos experimentales *in vivo* y en una solución de concentración conocida para el caso de experimentos *in vitro* (figura 3). Los líquidos de perfusión o vehículo es la matriz en la cual va contenido el analito de interés. Los vehículos que se emplean en MD varían en su composición y pH, tales como solución salina, solución Ringer o soluciones buffer. La elección del vehículo en los experimentos con MD van enfocados a el sitio donde se va a implantar la cánula de MD, en general son soluciones acuosas con concentraciones de iones de sodio y potasio en proporciones bajas, sin la presencia de proteínas o a muy bajas concentraciones (Hocht *et al.*, 2007). En algunos casos, el vehículo puede contener proteínas para prevenir que el fármaco se adhiera a las paredes de la cánula y/o tubería (Maidment *et al.*, 1989).

La concentración del soluto en el dializado, o del analito de interés es una fracción de la concentración en el espacio extracelular. El porcentaje de recuperación (PR) [promedio de la concentración del analito que se encuentra en el fluido extracelular alrededor de la cánula de microdiálisis] se puede calcular con la concentración del fármaco en el tejido en el cual se haya implantado la cánula (Elmqvist *et al.*, 1997).

Durante la perfusión en la cánula de MD, el flujo del vehículo genera el movimiento del analito el cual es difundido mediante la formación de un gradiente de concentración que se forma entre dos regiones las cuales están separadas por una membrana. Las regiones o espacios en experimentos *in vivo*, son el fluido extracelular de los tejidos y la solución perfundida que se encuentra en la cánula de MD. La difusión ocurre a través de una membrana polimérica. Los compuestos endógenos (hormonas, neurotransmisores etc.) y compuestos exógenos (fármacos y sus metabolitos) difunden al interior, mientras que compuestos que han sido agregados al vehículo difunden fuera de la solución de perfusión. Por lo tanto la MD además de ser utilizada para la evaluación continua de la concentración de analitos en el espacio extracelular puede ser usada para la liberación de fármacos en regiones específicas del tejido. El principio básico del procedimiento de la microdiálisis es crear un “vaso sanguíneo artificial” donde la difusión de los

compuestos se lleva a cabo en dirección a una zona de baja concentración (Elmqvist *et al.*, 1997).

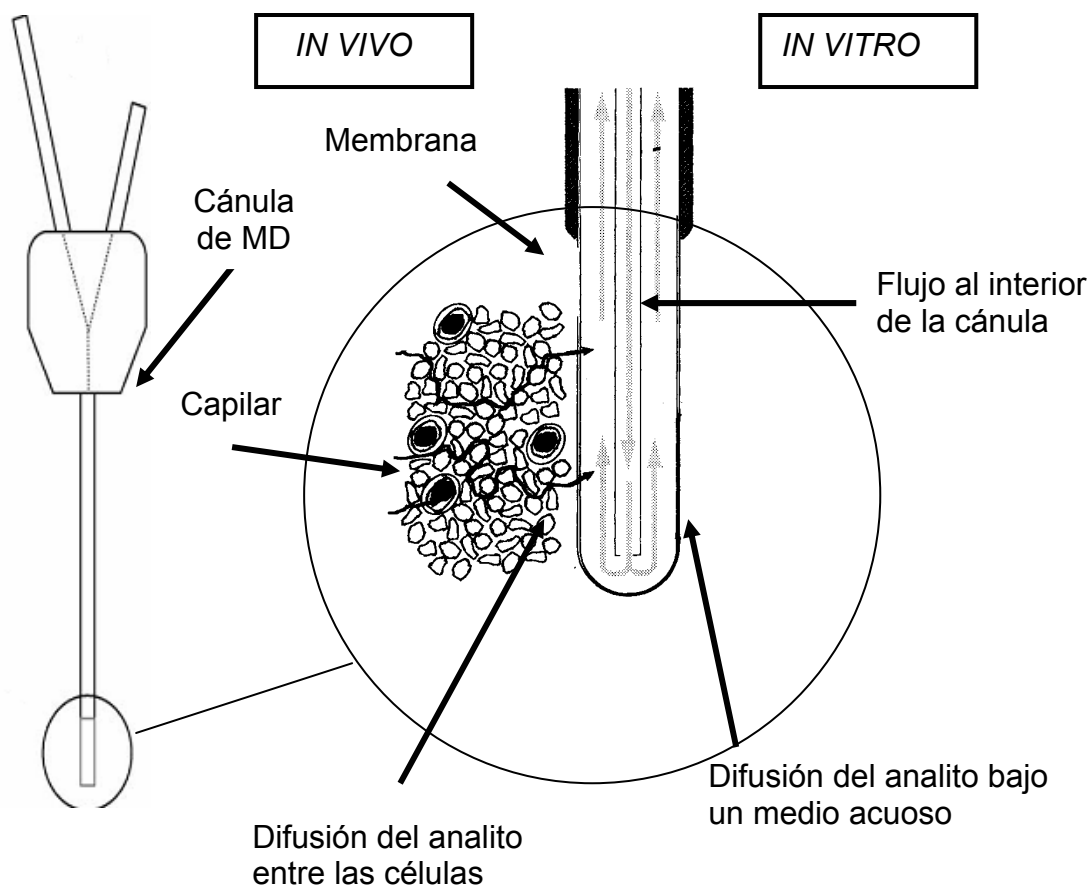


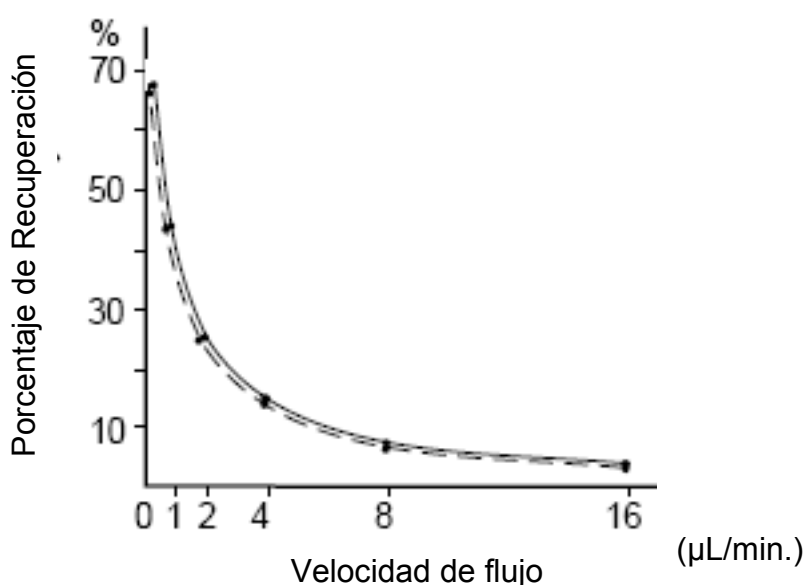
Figura 4. Representación esquemática de la recuperación de un soluto *in vivo* e *in vitro*. De la cánula de microdiálisis se resalta la membrana que es la parte activa. Se muestra la trayectoria del vehículo al ser perfundido y las diferencias tanto *in vivo* como *in vitro* alrededor de la membrana. Al final se obtiene la recuperación *in vivo* e *in vitro* (Modificado de Plock *et al.*, 2005).

2.6.2 Factores que determinan la recuperación *in vitro*

2.6.2.1 Velocidad de perfusión

En la cánula de microdiálisis se lleva a cabo el fenómeno de difusión que a diferencia de una diálisis, el equilibrio entre las concentraciones no se alcanza ya que es un proceso dinámico. Por tal razón la velocidad del flujo constante

determinará la recuperación del analito. A velocidad baja como es 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ el equilibrio se favorece pero el volumen obtenido es muy bajo para ser analizado, cuando se usan velocidades mayores a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ el intercambio se impide lo cual afecta la cantidad de analito recuperada, es decir, la recuperación es inversamente proporcional a la velocidad de perfusión, así la recuperación se acerca al 100% cuando el flujo es cercano a cero y es mínima cuando es rápido (gráfica 2; Benveniste *et al.*, 1990).



Grafica 2. Efecto de la velocidad de perfusión en la cantidad que se recupera. A velocidades bajas se favorece la recuperación, sin embargo, al incrementar la velocidad de perfusión el porcentaje de recuperación disminuye. Condiciones experimentales: CMA/12® longitud de membrana de 4 mm, sustancias analizadas Dopamina — — Noradrenalina — (Tomado de CMA®).

2.6.2.2 Características de la membrana

La recuperación es directamente proporcional al área total de la membrana, con lo cual, la longitud de la membrana es un factor que determina el porcentaje de recuperación (Plock *et al.*, 2005).

La difusión de agua, solutos y moléculas de cierto peso molecular esta relacionada con la composición de las membranas (Rocha, 1997). Actualmente existen más de 30 materiales diferentes con los que se fabrican las membranas.

Estos materiales pueden ser de tres tipos: directamente derivados de productos naturales, semisintéticos y totalmente sintéticos (Aljama *et al.*, 1996). La presencia de cargas superficiales reduce la recuperación de ciertas moléculas también con carga, lo que no sucede con las moléculas neutras (Sandberg *et al.*, 1983). La membrana de poliacrilonitrilo, la cual se usa en este trabajo, es una membrana sintética, la cual esta constituida por dos o más monómeros diferentes (Aljama *et al.*, 1996).

Membrana	Polímero	Morfología (membrana)	Grupos reactivos	Carácter
AN-69 (Poliacrilonitrilo)	Poliacrilonitrilo metalil sulfonato	Asimétrica	CN ⁻ CO ⁻ SO ₃ ⁻	Muy polar

Tabla. 2 Propiedades de la membrana de poliacrilonitrilo. La morfología se determina controlando el proceso de precipitación del polímero durante la fabricación, mientras que los grupos funcionales son los propios de cada monómero, se considera asimétricas a las membranas cuya sección presenta diferentes distribuciones de porosidad entre las dos películas de recubrimiento y la matriz esponjosa. Por otra parte, se señalan los grupos funcionales característicos de cada membrana, con expresión de carácter químico (Aljama *et al.*, 1996).

2.6.2.3 Temperatura.

La recuperación es mayor cuando la temperatura del sistema donde se aplica la microdiálisis se incrementa cerca de 37 °C (Benbeniste *et al.*, 1990).

2.6.2.4 Propiedades del fármaco

Otros factores que determinan el porcentaje de recuperación están relacionados con las propiedades del antineoplásico como son: el peso molecular; capacidad de atravesar la membrana; el pH en el cual el fármaco no se degrade; cargas en la estructura química las cuales pueden propiciar uniones por afinidad eléctrica entre los grupos de la membrana y la afinidad de unión que presente el antineoplásico hacia la membrana y la tubería (Chaurasia, 2007).

3. Justificación

El microambiente de un tejido tumoral presenta características fisiológicas y físicas diferentes a las de un tejido no tumoral que limitan la distribución de los agentes antineoplásicos (Chu *et al.*, 2000; Michinton *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 1989) induciendo diferencias marcadas en las concentraciones de los antineoplásicos en plasma y en tejido tumoral, lo cual sugiere la necesidad de implementar procedimientos que permitan la evaluación directa en el tejido tumoral y que por lo tanto la concentración del fármaco sea representativa.

La MD es un procedimiento que permite mediante una membrana, la evaluación continua y directa de cualquier fármaco en el tejido tumoral (Verbeeck, 2000). Los estudios de MD requieren una caracterización previa *in vitro* en la cual se asegure la recuperación del antineoplásico bajo las condiciones de experimentación (Hansen *et al.*, 1999). Actualmente, sólo existe un estudio en el cual se reporta el porcentaje de recuperación *in vitro* para DOXO empleando una cánula de MD comercial bajo condiciones diferentes con las que se cuenta en el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo (Kitazawa *et al.*, 1997). Por lo que es necesario caracterizar las condiciones propias que generen el mejor porcentaje de recuperación *in vitro* de DOXO y utilizar dichas condiciones para estudios de farmacocinética intratumoral en modelos experimentales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar las condiciones óptimas que ofrezcan el mejor porcentaje de recuperación de Doxorubicina a través de una cánula con membrana de poliacrilonitrilo mediante un procedimiento de microdiálisis.

4.2 Objetivos específicos

Establecer el porcentaje de recuperación *in vitro* de Doxorubicina a diferentes tiempos de muestreo (20, 30 y 60 min.) y utilizando diferentes velocidades de perfusión (1.0, 1.5, 3.0, 4.0 y 5.0 $\mu\text{l}/\text{min}.$).

Determinar la estabilidad del porcentaje de recuperación en el proceso de microdiálisis a 6, 12, y 24 horas.

5. Hipótesis

En un procedimiento de microdiálisis el porcentaje de recuperación de Doxorubicina a través de una membrana estará determinado por las propiedades de la membrana y la velocidad de perfusión ya que estas influyen en el fenómeno de difusión que se presenta en la microdiálisis.

6. Metodología

6.1 Soluciones para la microdiálisis

6.1.1 Preparación de vehículo de perfusión de microdiálisis

En balanza analítica (SA80, Scientech®), se pesó 0.9 g de Cloruro de sodio (NaCl, Técnica Química®) y se aforó en matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada provenientes de un equipo desionizador (Simplicity 185, MILLIPORE®). Posteriormente, esta solución se hizo pasar por un filtro de 0.2 µm (Corning®) y se almacenó a -20 °C.

6.1.2 Solución del sistema de microdiálisis *in vitro*

De una solución de 2 mg/mL de Doxorrubicina (Lemery®) se tomó una alícuota de 70 µL y se llevó a un volumen final de 14 mL con vehículo de perfusión para tener una solución de DOXO a 10 µg/mL. De la solución anterior se prepararon alícuotas de 4 mL protegidos de la luz con papel aluminio, estas soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.2 Microdiálisis *in vitro*

Para realizar la MD *in vitro* se llevaron a cabo dos protocolos, el primero consistió en realizar la microdiálisis a diferentes velocidades de perfusión (1.0, 1.5, 3.0, 4.0 y 5.0 µL/min) y con tres periodos de evaluación (20, 30 y 60 minutos) cada seis horas. El segundo protocolo consistió en establecer la estabilidad del porcentaje de recuperación de la muestra en un intervalo de tiempo máximo de 36 h cada doce horas.

Para realizar los experimentos de MD se inició con el montaje del sistema, el cual consistió en la colocación de las tuberías, llenado de jeringas del vehículo y el ajuste en la bomba de perfusión, la colocación de la cánula de MD y la concentración del sistema. Se inicio estabilizando el sistema, eliminando el dializado de los primeros cinco minutos, posteriormente se inició la recolección de las muestras. El proceso se realizó a una temperatura de 20 °C, la cual se controló

mediante un equipo de clima York ®. El sistema de microdiálisis se muestra en la siguiente imagen.

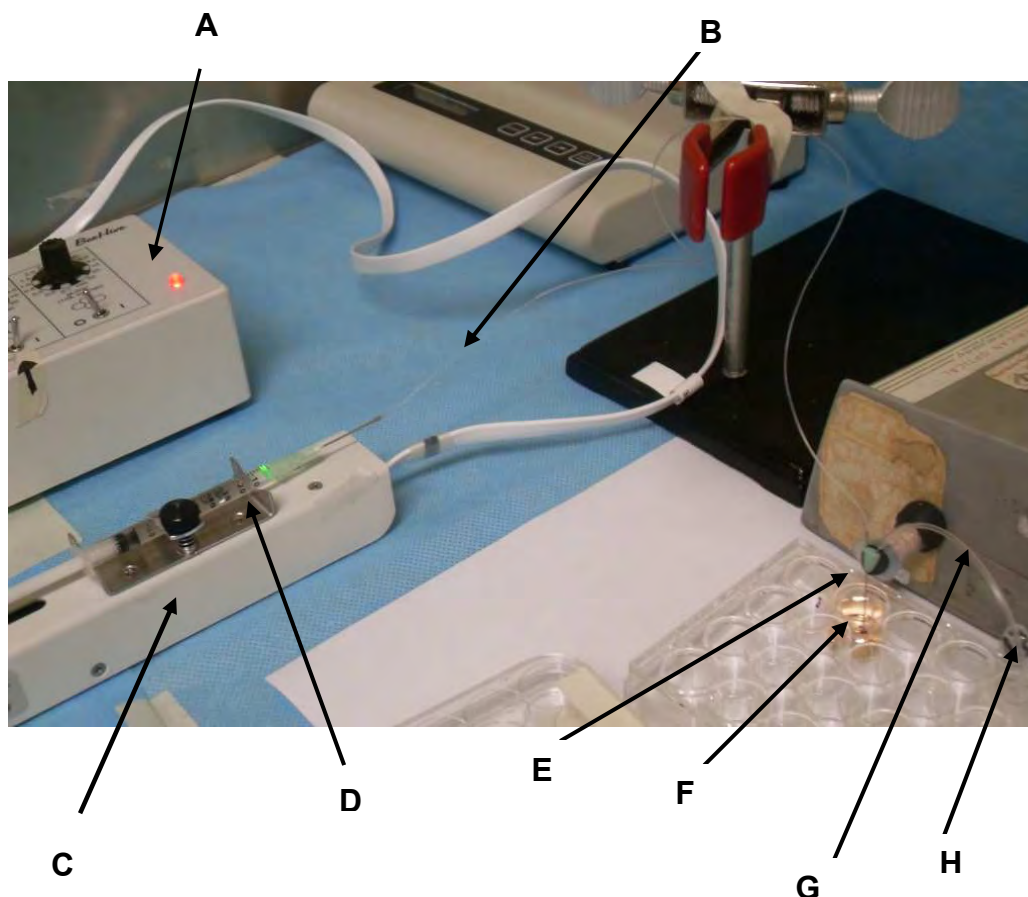


Figura 5. Sistema de microdiálisis *in vitro*. Se muestran los componentes del sistema: A) control de las velocidades, B) entrada del vehículo, c) bomba de perfusión, d) jeringa con vehículo E) cánula de microdiálisis, F) concentración del sistema, G) salida del vehículo y H) vial contenedor de la muestra.

En ambos protocolos el procedimiento se realizó mediante el uso de una cánula de MD acoplada a una bomba de perfusión Bass (modelo MD-1001 Bioanalytical Systems). Las cánulas de MD se construyeron con acero inoxidable (Small Parts Inc.) para la parte externa y para la parte interna fibra de vidrio (Polymicro Technologies). La parte activa consistió en una membrana de poliacrilonitrilo Hospal de 40 KDa (de un largo de 5 mm), sellada con resina epóxica en su extremo inferior y en su unión con su cara externa (Maidment, 1989). Los dializados obtenidos se recolectaron en tubos eppendorf de 1 mL y se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación.

6.2.1 Porcentaje de recuperación *in vitro* de Doxorrubicina a diferentes velocidades de perfusión (Protocolo 1)

Una solución stock de Doxorrubicina (Lemery®) de 10 µg/mL se colocó en un reservorio y se perfundió a través de ésta el vehículo de NaCl al 0.9 % (Técnica Química®) a velocidades de 1.0, 1.5, 3.0, 4.0 y 5.0 µl/min; cada velocidad con periodos de recuperación de 20, 30 y 60 min.

6.2.2 Estabilidad del porcentaje de recuperación de doxorrubicina (Protocolo 2)

Consistió en perfundir como vehículo NaCl 0.9%, a través de una solución stock de DOXO de 10 µg/ml, a velocidad de 2.0 µL/min con intervalos de tiempo de 0, 6, 12, 24 y 36 horas.

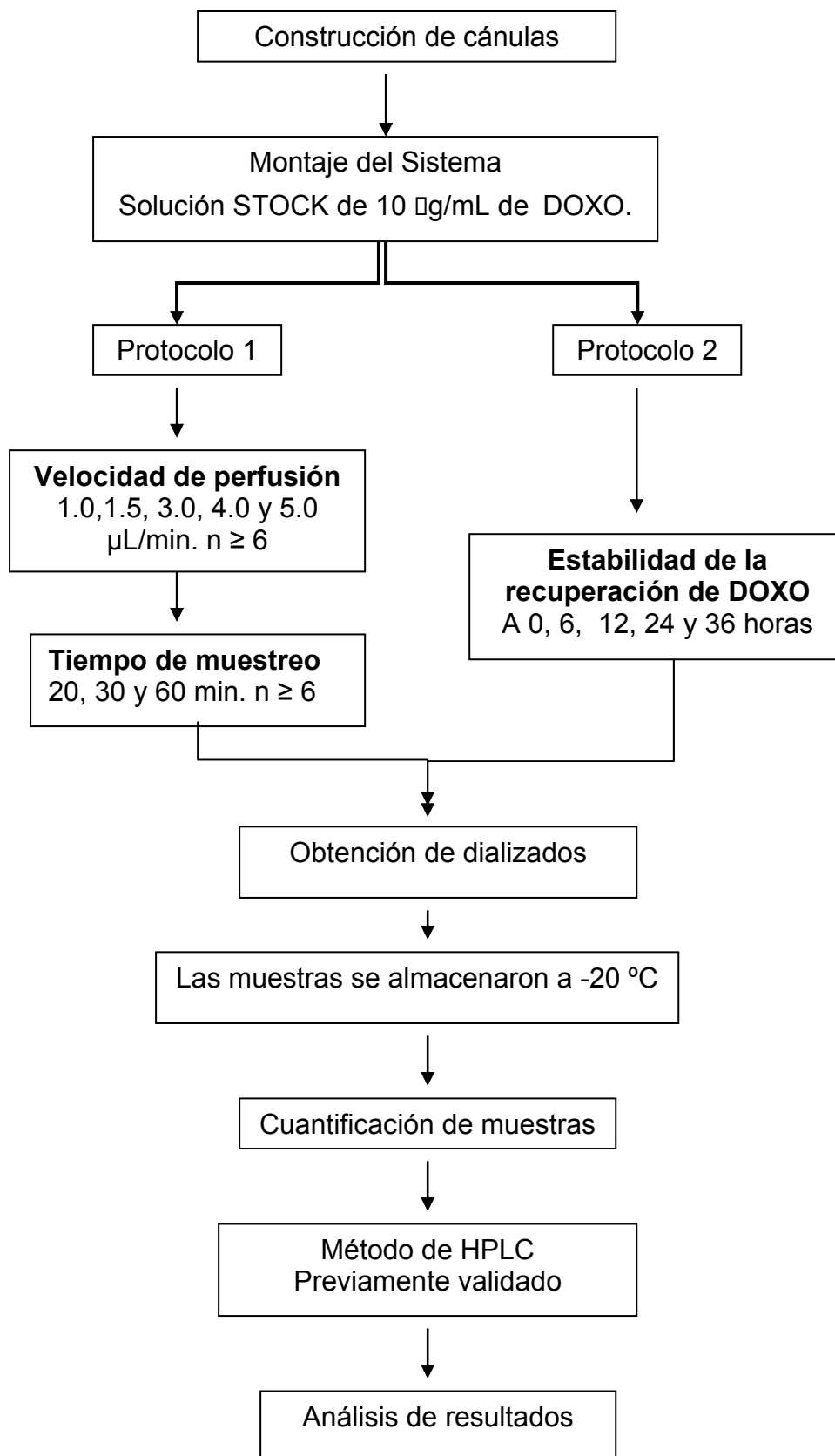
6.3 Cuantificación de muestras por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La cuantificación se realizó en un equipo de HPLC (Waters 650 E) utilizándose una columna Bondapack C-18 con una longitud 3.9 x 150 mm., con una fase móvil que consiste en una mezcla de formiato de amonio-acetonitrilo con una proporción de 55:45, a un flujo de 2 mL/min. Se empleó un detector de fluorescencia (Waters 2475) con una longitud de λ_{ex} 580 nm y una longitud de λ_{em} 480 nm. Este procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente y no se usó derivatizante. Dicho método se encuentra validado por el grupo de investigación del laboratorio donde se desarrolló este trabajo.

6.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de la concentración de Doxorrubicina determinada. Las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) se evaluaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía usando el software "Sigma stat"

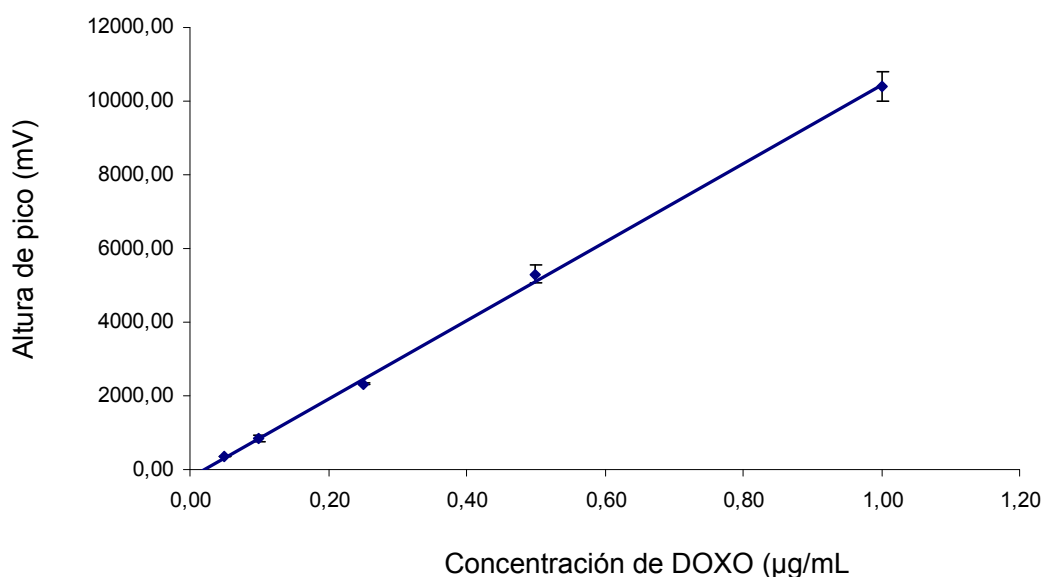
En el siguiente diagrama de flujo se muestra la metodología general que se siguió en este trabajo.



7. Resultados

7.1 Cuantificación de las muestras en HPLC

La cuantificación de las muestras se realizó empleando una curva patrón de DOXO a diferentes concentraciones las cuales fueron de: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La curva patrón obtenida correspondiente a un día de análisis se muestra en la gráfica 3 y cuatro de los cromatogramas obtenidos a diferentes concentraciones se presenta en la figura 6 y 7. Se usó como respuesta, la altura del pico de las muestras la cual se integro mediante el software Millenium®.



Gráfica 3. Curva estándar de DOXO. Se grafica la relación de alturas obtenidas contra las concentraciones de DOXO. $r^2= 0.9992$. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e (n = 3).

7.1.1 Cromatogramas obtenidos en la cuantificación

Los cromatogramas del vehículo (A; blanco), la concentración de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (B) figura 6, y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de la curva patrón (C) y una de las muestras obtenidas por microdiálisis (D) son mostradas en la figura 7.

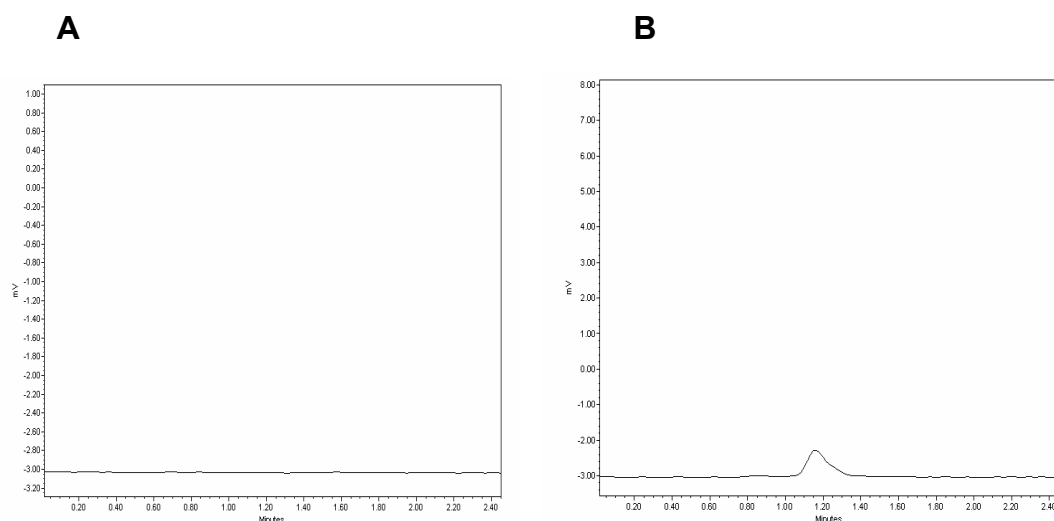


Figura 6 Cromatogramas típicos correspondientes a una muestra blanco (A) y una concentración conocida de Doxorubicina de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (B).

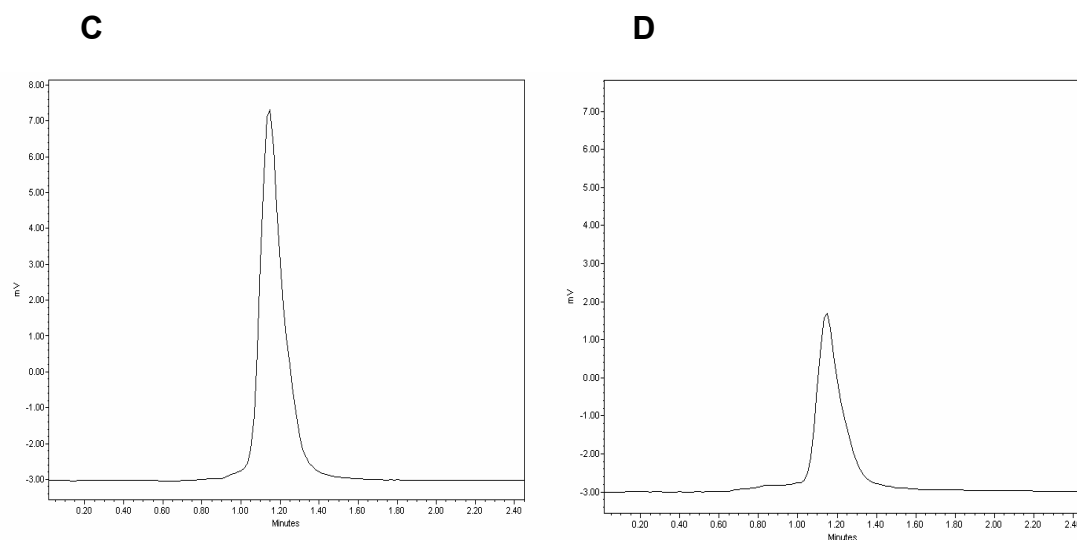


Figura 7. Cromatogramas típicos correspondientes a una concentración conocida de Doxorubicina de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (C) y una muestra obtenida del sistema de microdiálisis (D).

7.2 Porcentaje de recuperación *in vitro* de doxorubicina a diferentes velocidades de perfusión

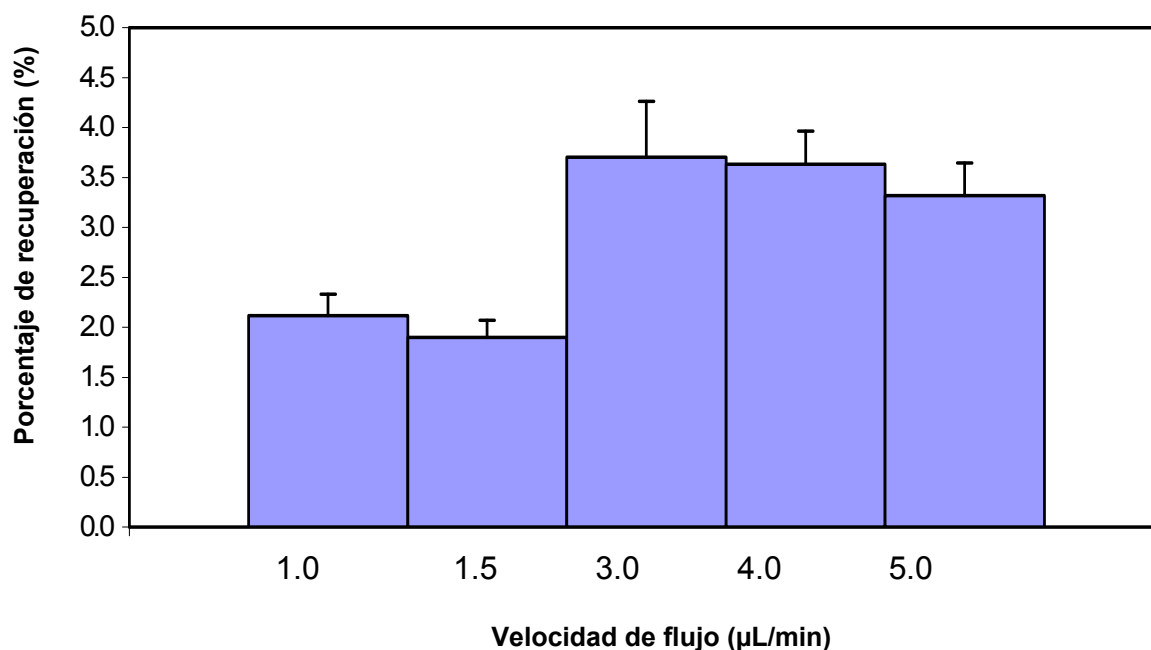
Los porcentajes de recuperación \pm e.e. de DOXO a diferentes velocidades de perfusión y tiempos de recolección se muestran en la tabla 3; donde se observa un rango de 1.90 ± 0.17 a 4.29 ± 0.64 . El porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente relación:

$$\text{Porcentaje de Recuperación (PR)} = \frac{[\text{ }] \text{ del dializado}}{[\text{ }] \text{ del sistema}} \times 100$$

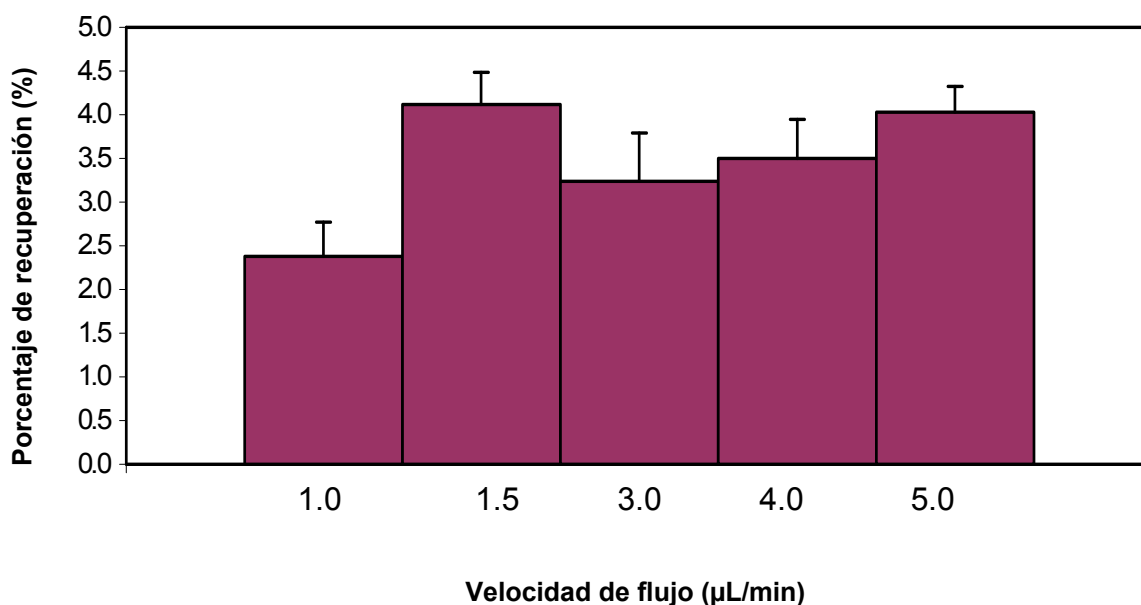
Velocidad $\mu\text{L}/\text{min.}$	Tiempo de recolección		
	20'	30'	60'
1,0	$2,12 \pm 0,21$	$2,38 \pm 0,39$	$2,77 \pm 0,25$
1,5	$1,90 \pm 0,17$	$4,11 \pm 0,37$	$4,14 \pm 0,22$
3,0	$3,70 \pm 0,56$	$3,24 \pm 0,56$	$4,29 \pm 0,64$
4,0	$3,63 \pm 0,33$	$3,50 \pm 0,45$	$2,98 \pm 0,43$
5,0	$3,32 \pm 0,33$	$4,03 \pm 0,30$	$3,67 \pm 0,34$

Tabla 3 Porcentajes de recuperación. Los datos se expresan como el promedio \pm e.e. $n \geq 6$

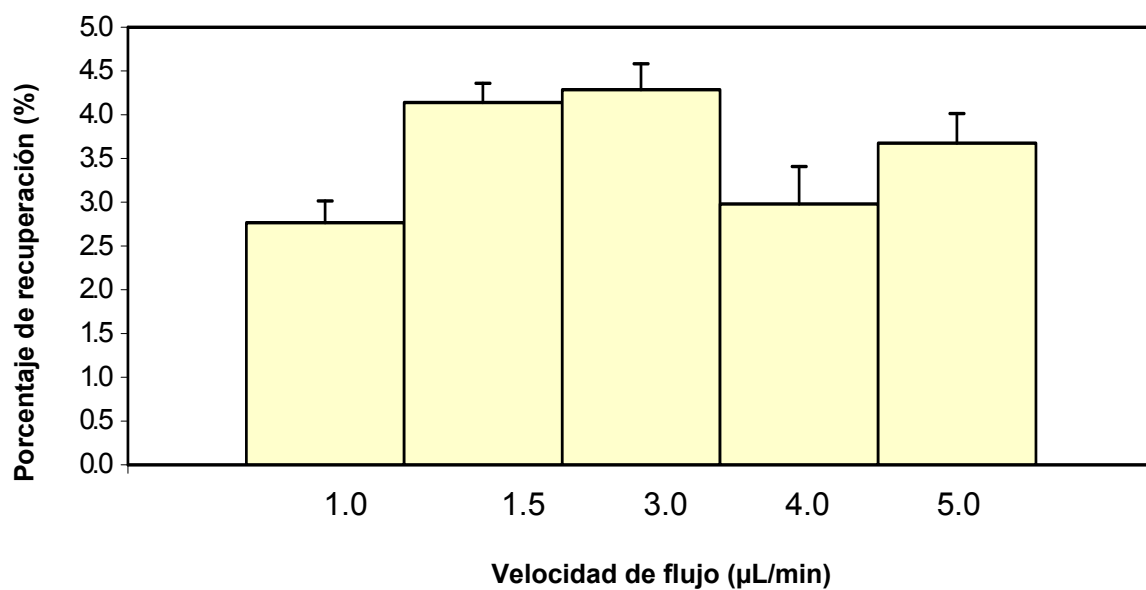
A continuación se presentan los gráficos correspondientes a los datos de la tabla 3, en donde se grafica el porcentaje de recuperación (PR) con respecto a las diferentes velocidades de perfusión (VP) analizadas en el tiempo de recolección indicado.



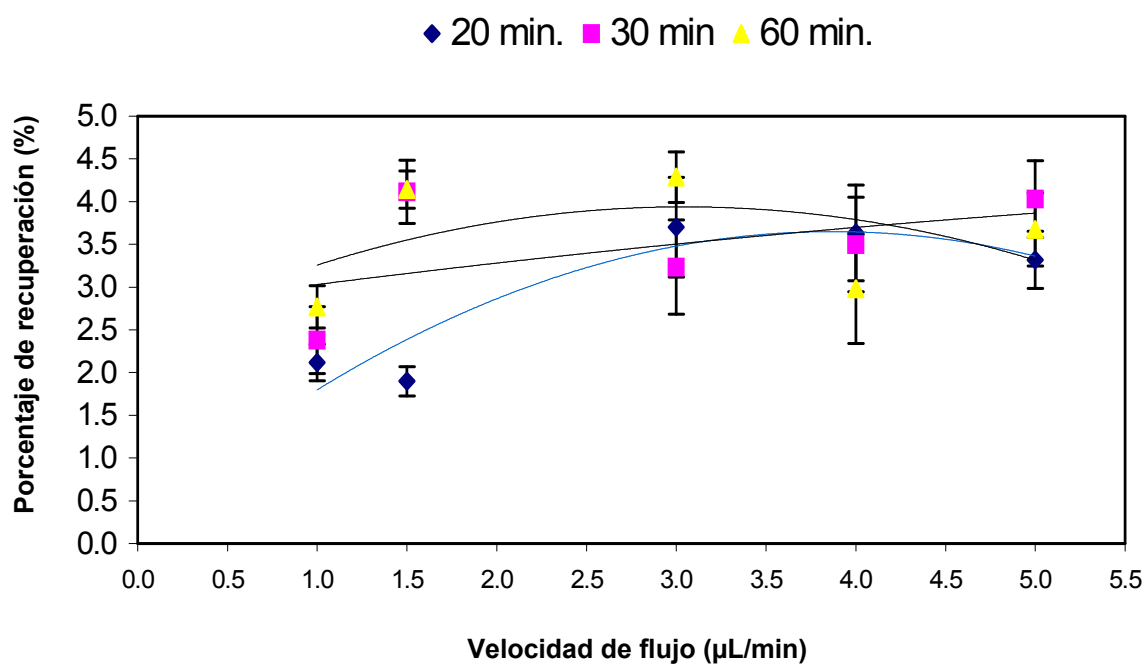
Gráfica 4. Porcentajes de recuperación de DOXO a 20 min a diferentes velocidades de perfusión. Promedio \pm e.e n \geq 6



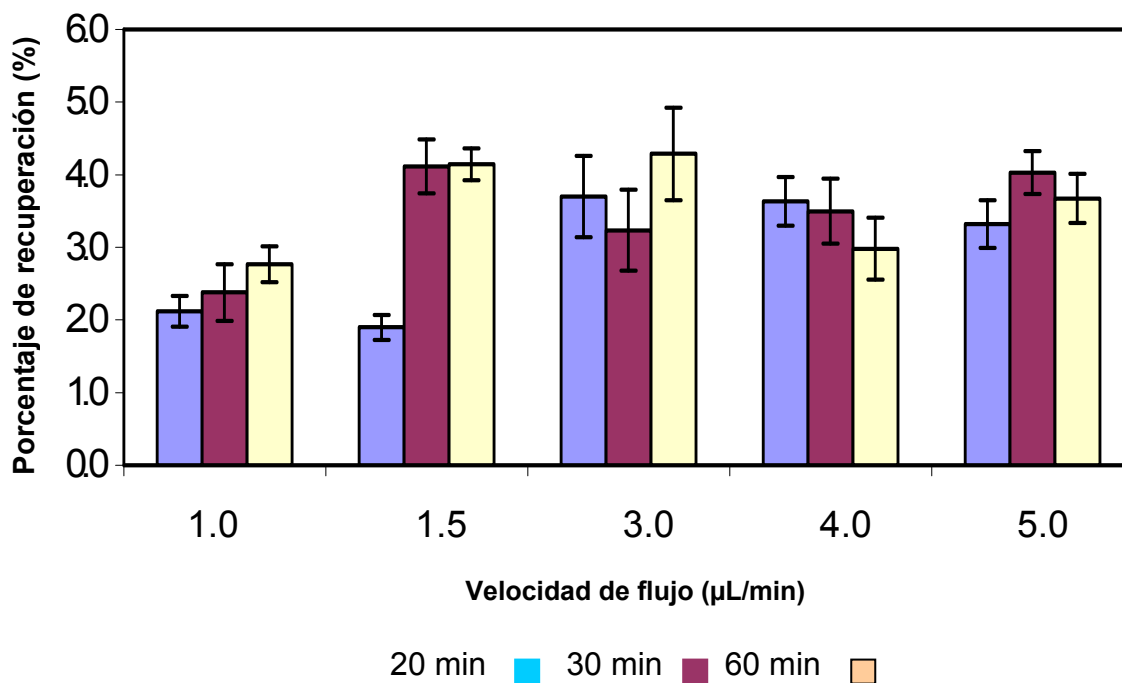
Gráfica 5. Porcentajes de recuperación de DOXO a 30 min a las diferentes velocidades de perfusión. Promedio \pm e.e n \geq 6



Gráfica 6. Porcentajes de recuperación de DOXO a 60 min a las diferentes velocidades de perfusión. Promedio \pm e.e $n \geq 6$



Gráfica 7. Porcentajes de recuperación de DOXO a 20, 30 y 60 min a las diferentes velocidades que se realizó el estudio. Promedio \pm e.e $n \geq 6$



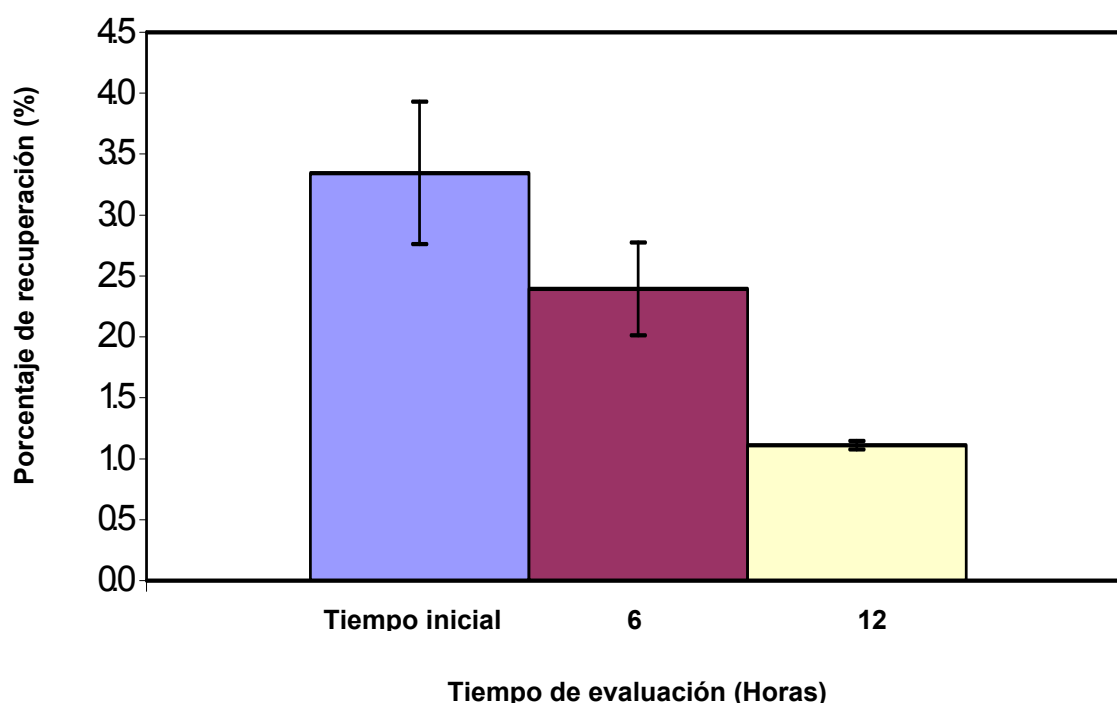
Gráfica 8. Porcentajes de recuperación a 20, 30 y 60 min a las diferentes velocidades de perfusión. Promedio \pm e.e n \geq 6

7.3 Estabilidad del porcentaje de recuperación de Doxorrubicina

La estabilidad del PR de DOXO usando un flujo constante de 2 μ L/min se presenta en la tabla 4 y gráfica 9, mientras que la estabilidad del PR a un flujo de 2 μ L/min (interrumpido) se presenta en la tabla 5 y gráfica 10.

Tiempo de recolección (Hrs)	% de Recuperación
0	3.35 ± 0.58
6	2.40 ± 0.38
12	1.11 ± 0.03

Tabla 4. Porcentajes de recuperación de Doxorubicina obtenidos a un flujo constante. Los datos se expresa como la promedio ± e.e. $n \geq 2$

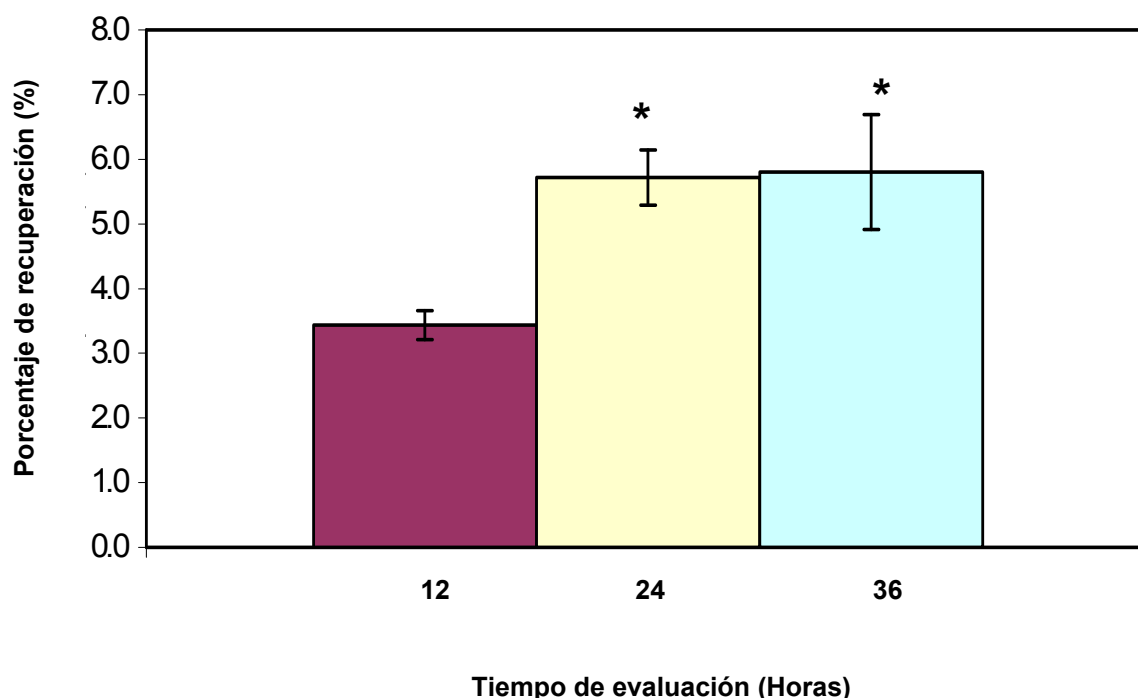


Gráfica 9. Estabilidad de la recuperación de Doxorubicina. Se muestran a tiempos de 0, 6 y 12 Hrs los porcentajes de recuperación obtenidos a la velocidad de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ manteniendo este flujo constante durante las 12 horas. Los datos se expresan como el promedio ± e.e $n = 6$.

Tiempo de recolección (Hrs)	% de recuperación
12	3.44 ± 0.22
24	5.72 ± 0.43
36	5.80 ± 0.89

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de Doxorrubicina obtenidos a un flujo detenido.

Los datos se expresa como la promedio ± e.e. n ≥ 2



Gráfica 10. Estabilidad de la recuperación de la muestra. Se muestran a tiempos de 0,12, 24 y 36 Hrs los porcentajes de recuperación obtenidos a la velocidad de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ manteniendo este flujo detenido durante las 36 horas. Los datos se expresan como la media ± e.e n ≥ 2.. * p = 0.008 con respecto al tiempo de 12 h utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba deTukey.

8. Discusión

La microdiálisis (MD) es una técnica que permite recolectar sustancias en zonas específicas, esto se lleva a cabo por el fenómeno de difusión que se presenta alrededor de la membrana de MD. Uno de los inconvenientes que se tienen al usar esta técnica es la incapacidad de una recuperación total (100%) de las sustancias de interés. La recuperación puede lograrse en un intervalo entre <1% y 99 % (Hansen et al., 1999). Diversos estudios que utilizan MD reportan una recuperación que varía del $0.6 \pm 1.6\%$ al 9.1 ± 1.4 (Alec et al, 2006; Xie et al, 2000). Esto depende de factores tales como el tipo y longitud de membrana, el tamaño de la sustancia a recuperar, su permeabilidad a través de la membrana, estabilidad de la sustancia y la velocidad a la cual se perfunde el vehículo. Por tal razón es indispensable establecer las condiciones *in vitro* que proporcionen las concentraciones más altas de recuperación de la sustancia analizada.

Existen reportes de estudios de MD *in vitro*, como la evaluación para la cuantificación de acetaminofen y fenilpropilamina a partir de disoluciones de tabletas (Shah et al., 1994), estudios de cinética enzimática (Zhou et al., 1995), cuantificación de metabolitos para caracterizar el metabolismo hepático (Gunaratna et al., 1997). Además se ha utilizado a la MD para determinar el grado de unión que tiene la ciclosporina a las proteínas plasmáticas (Ekblom, 1992).

Sin embargo, aun que existen algunos reportes de MD *in vitro* de agentes antineoplásicos (Kitazawa et al., 1997; Zamboni et al., 2002) solo un estudio se reportó, en el cual desarrollan una formulación de liberación de Doxorubicina (DOXO) y utilizan a la MD para la recolección y su posterior cuantificación (Kitazawa et al en 1997). En este estudio reportan la recuperación *in vitro* de DOXO de $6.04 \pm 1.07\%$ utilizando una membrana de policarbonato, con un tamaño de poro de 20 KiloDaltons (Kda) y una longitud de membrana de 10 mm adaptada a una cánula comercial (CMA/20 ®) y como vehículo de perfusión utilizan solución buffer de fosfatos con alginato de sodio al 2.5%; además Maidment et al, 1989 reportaron que la composición química de las membranas que se usan en el procedimiento de MD repercute en la recuperación de los opioides. En el presente trabajo se planteó

evaluar el porcentaje de recuperación de DOXO utilizando una membrana de poliacrilonitrilo con un tamaño de poro de 40 Kda y una longitud de membrana de 5 mm.

Se plantearon dos protocolos; estos consistieron en A) determinar la variable de velocidad de perfusión en $\mu\text{L}/\text{min}$ sobre el porcentaje de recuperación del fármaco utilizando la técnica de MD y B) se determinó la estabilidad de la recuperación de DOXO utilizando dos condiciones diferentes una manteniendo un flujo constante de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ por un periodo de 12 horas máximo y la segunda se realizó a la misma velocidad de perfusión, sin embargo el flujo del vehículo se detuvo entre cada periodo de tiempo de muestreo y éste se realizó por intervalos de tiempo hasta de 36 horas.

A) Porcentaje de recuperación *in vitro* de Doxorrubicina a diferentes velocidades de perfusión

En la tabla 3 se muestran los datos que corresponden a los porcentajes de recuperación obtenidos, en los cuales se observa un rango de 1.90 ± 0.17 a $4.29 \pm 0.64\%$ a las diferentes velocidades de perfusión probadas con tiempos de evaluación de 20, 30 y 60 minutos.

Específicamente empleando la velocidad de 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ a los tres tiempos de evaluación y la velocidad de 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un tiempo de evaluación de 20 minutos observamos que el porcentaje de recuperación (PR) es inferior al 2.8 %, al incrementar la velocidad de perfusión (VP) también se incrementa el PR hasta alcanzar un valor de alrededor del 4% a partir de una VP de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. El PR obtenido a las velocidades de 3, 4 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ no presenta diferencias estadísticamente significativas. En la figura 13 se presentan los PR con respecto a las diferentes VP empleando diferentes tiempos de evaluación y podemos observar que las VP inferiores a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ presentan un PR variable, es decir, no hay un comportamiento homogéneo, sin embargo, a partir de la velocidad de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$, este comportamiento es menos variable. En la figura 14 observamos que el PR de Doxorrubicina, bajo nuestras condiciones experimentales es inferior al 3% a la velocidad de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (con tiempos de recolección de 20, 30 y 60 min.) y 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$

con tiempos de recolección de 20 min. Sin embargo, este PR se incrementa hasta un 4% a velocidades de 3, 4 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En general, una velocidad alta de perfusión le corresponde una recuperación baja (Chaurasia *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 1999) sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo nos permiten observar una situación diferente, esta situación posiblemente esta definida por las interacciones que en esta zona se presenten entre fármaco y membrana como es la propiedad de difusión de Doxorubicina a través de la membrana de poliacrilonitrilo. Además a velocidades inferiores a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ el flujo que se presenta en el interior de la membrana quizá permite el regreso de la molécula de Doxorubicina hacia el exterior de la membrana; debido a que el intercambio entre las moléculas del vehículo y las del fármaco es un fenómeno constante y dinámico y que sólo el flujo al cual se perfunde el vehículo a través de la membrana permite esta condición.

A velocidades de 3.0, 4.0 y 5.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ la recuperación es mayor con respecto a velocidades de 1.0 y 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Tal vez a velocidades de perfusión entre 3 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ se encuentre la recuperación mas alta (gráfica 8). Esto podría ser confirmado si se incrementa la VP, sin embargo, en el caso de la membrana de poliacrilonitrilo que se usa en la cánula de microdiálisis, el aumento de velocidad de flujo podría causar daño a dicha estructura (Maidment *et al.*, 1989) y por lo tanto no es recomendable un aumento de la VP.

Para mejorar la recuperación de DOXO a través de la MD se propone evaluar diversos vehículos de perfusión los cuales disminuyan la posible adhesión del antineoplásico a las paredes de la tubería de acero inoxidable de la cánula, ya que es en esta zona donde no se tiene un control sobre este fenómeno, tanto en la tubería de entrada y de salida se utilizó tubería de teflón con lo cual se evita una interacción en estas zonas; además, con las concentraciones de de diversos iones presentes en el vehículo de perfusión se puede favorecer el acarreamiento del fármaco presentándose.

Por otra parte, evaluar diferentes materiales de las membranas como son de pilicarbonato, celulosa, polietilsufona etc. puede propiciar una mejoría en la

recuperación del Antineoplásico debido a las propiedades de difusión de DOXO en estos materiales (Maidment *et al.*, 1989).

B) Estabilidad del porcentaje de recuperación de Doxorubicina

Los resultados obtenidos del PR de DOXO a un determinado periodo de tiempo nos permite demostrar que en un intervalo de tiempo de hasta 12 horas la recuperación de la muestra, bajo nuestras condiciones experimentales, es constante. Esto es relevante en un estudio *in vivo* ya que nos permite establecer hasta que tiempo de muestreo la recuperación de DOXO no cambia por las características propias de la membrana. La literatura reporta que en un estudio farmacocinético la eliminación de DOXO se logra alrededor de las 4 horas (Zara *et al.*, 1999). Sin embargo, en el presente trabajo se decidió evaluar la estabilidad de la recuperación de DOXO utilizando periodos hasta por 36 h con la finalidad de establecer la estabilidad de la recuperación por periodos largos.

El muestreo durante las primeras 6 horas a flujo constante muestra que la membrana de poliacrilonitrilo comienza a adquirir un color rojizo, característico de la DOXO, lo cual sugiere una probable saturación del antineoplásico en la membrana, posiblemente a una adhesión de las moléculas de DOXO a la superficie de la membrana. Dicha saturación probablemente este relacionada con una disminución del PR del fármaco como fue observado en nuestros resultados (tabla 4, gráfica 9).

Cuando la VP se detuvo durante los intervalos de muestreo más largos: 12, 24 y 36 h (durante este tiempo la cánula de MD se mantuvo sumergida en la solución stock del sistema y sólo se activó el flujo para recolectar la muestra) se observa un incremento de PR a las 24 y 36 h con respecto a las 12 h alcanzando valores de hasta $5.80\% \pm 0.89$. Sin embargo, dicho incremento es constante a partir de las 24 h y hasta las 36 h. El incremento puede deberse posiblemente a que la MD es un proceso dinámico, es decir, el intercambio de las moléculas de DOXO es constante mientras la velocidad de flujo es constante; cuando se detiene el flujo, se establece el equilibrio entre el interior y el exterior de la membrana, al iniciar nuevamente el flujo, lo que se recupera es la cantidad de DOXO que esta en equilibrio.

Se han reportado varios estudios de recuperación de agentes antineoplásicos *in vivo* empleando el procedimiento de MD en experimentos preclínicos, uno de estos ha sido la caracterización de la recuperación *in vitro* del antineoplásico metotrexato, empleando una cánula comercial con una membrana de 10 mm de longitud y utilizando como vehículo de perfusión solución salina equilibrada Hank's (HBSS) a una velocidad de 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ obteniendo un porcentaje de recuperación de $7.8 \pm 1.5 \%$ (Dukic, *et al*; 1998); Zamboni, *et al* en 2002, reporta las condiciones para la recuperación de cisplatino en experimentos *in vivo*, también se han reportado la recuperación de carboplatino *in vitro* empleando una cánula comercial CMA 10® con una membrana cuya longitud es de 16 mm y una velocidad de flujo de 1.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ posteriormente utilizan estas condiciones para estudios clínicos (Blochl-Daum, *et al*; 1996). Estos estudios confirman que es importante establecer las condiciones óptimas de recuperación del fármaco. Es importante mencionar que estos estudios se han realizado con cánulas comerciales CMA® las cuales tienen un alto costo. La propuesta del presente trabajo es la construcción de las cánulas de MD disminuyendo en gran medida el costo de las mismas.

Uno de los inconvenientes al utilizar la MD es que en los dializados obtenidos la concentración recuperada es pequeña (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y que esta se encuentra en volúmenes pequeños (10 μL) lo cual implica métodos analíticos lo suficientemente sensibles para la cuantificación de las muestras. La Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es una opción para cuantificar los dializados con las características antes mencionadas. En la figura 6 y 7 se pueden observar los Cromatogramas obtenidos de algunos dializados por medio del HPLC, la cantidad mínima cuantificable es de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Otra ventaja que se puede mencionar del método de cuantificación es que los dializados se inyectan directamente al equipo de cromatografía sin un tratamiento previo, lo cual facilita el análisis de las mismas, además, no hay pérdida de la muestra o variaciones por una manipulación. Al final del análisis, la concentración final se ajusta con respecto a la concentración *stock* del sistema y se calcula el PR.

En resumen podemos mencionar que la penetración y distribución de los antineoplásicos en un tejido tumoral esta limitada por diversos factores presentes en el microambiente tumoral. Con la cuantificación de la concentración del fármaco

directamente en el tumor se puede caracterizar la farmacocinética y farmacodinamia y plantear estrategias para incrementar la concentración intratumoral de fármacos antineoplásicos. Existen muchos reportes en los cuales se ha confirmado el potencial del uso del procedimiento de microdiálisis como una técnica de recolección de muestras en el espacio extracelular lo que nos permite la cuantificación de fármaco directamente en el sitio blanco. Caracterizar la recuperación *in vitro* de un antineoplásico utilizando un procedimiento de MD nos permite establecer una aproximación de la recuperación que tendrá el fármaco en estudios *in vivo* así de esta manera establecer una correlación de la concentración del fármaco a nivel sistémico y su capacidad de penetrar hacia el interior del tumor.

Conclusión

El procedimiento de microdiálisis empleando una cánula construida en el laboratorio con membrana de poliacrilonitrilo, nos permite recuperar el antineoplásico Doxorubicina en condiciones *in-vitro*.

El mayor porcentaje de recuperación obtenido fue de 4.29 ± 0.64 con un tiempo de recolección de 60 minutos a una velocidad de $3 \mu\text{L}/\text{min}$.

La recuperación de Doxorubicina, utilizando una membrana de poliacrilonitrilo, es estable en un periodo de 6 h.

Con lo mencionado anteriormente podemos concluir que este trabajo nos proporciona las condiciones optimas *in vitro* al usar una membrana de poliacrilonitrilo para la recuperación del antineoplásico Doxorubicina con lo cual se da un antecedente para el desarrollo de estudios farmacocinéticos a nivel intratumoral en modelos experimentales utilizando el procedimiento de microdiálisis. Y así mismo dar una amplia gama de propuestas de estudios en el tratamiento de la enfermedad del cáncer.

10. Referencias bibliográficas

Abeloff Martin D.col. Oncología clínica, 3ª ed., Vol. II, ELSEVIER, España, 2005.

Alec H. Ross, Petra J. van Gorp, Jacques J. Willemsen, Jacques W. M. Lenders, Cees J. Tack, and Fred C. G. J. Sweep Transport within the Interstitial Space, Rather Than Membrane Permeability, Determines Norepinephrine Recovery in Microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther.* Nov;319(2):840-6. 2006

Aljama P., Amate J. M. y Conde J. L. Criterios de clasificación de las membranas. *Nefrología.* Capitulo IV, Vol. XVI. Suplemento 4. 1996

Allen L, Kimura K, Mackitchan, J and Ritschel W, Manual of symbols, equations and definitions in pharmacokinetics. *J. Clin. Pharmacol.* 22, 1S-23S, 1982

Arce Claudia, Martínez-Tlahuel J. y Lara U. F. Quimioterapia Adyuvante en Cáncer de Mama: Presente y Futuro. *Cancerología* 1: 177-185, 2006

Benveniste Helene, Huttemeier Peter Cristian. Microdialysis-Theory and application. *Progress in Neurobiology* Vol. 35 pp 195 to 215, 1990

Bito, L. Davson, H., Levin, E.M.Snyder, N The concentration of free aminoacids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J. Neurochem.* 49: 729-734, 1987

Bloch-Daum B, Muller M, Meisinger V, Eichler HG, Fassolt A, and Pehamberger H. Measurement of extracellular fluid carboplatin kinetics in melanoma metastases with microdialysis. *B. Journal of Cancer* 73, 920-924, 1996

Blomquist L, Dizdar N, Karlsson M, Kagedal B, Ossowicki H, Pettersson A, Smeds S. Microdialysis of 5-S-cysteinyldopa from interstitial fluid in cutaneous human melanoma transplanted to athymic mice. *Melanoma Res.* 1:23-32, 1991

Brunner M. Muller M. Microdialysis: an in vivo approach for measuring drug delivery in oncology. *Eur J Clin Pharmacol.* 58:227-234, 2002

Cairns John. Cáncer: Ciencia y sociedad, Editorial Reverte, España, 1981.

Chaplin D.J., Olive P.L.and Durand, R. E. Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer Res.* 47, 597-601, 1987

Chaurasia CH. S Markus Müller, Edward D. Bashaw, Eva Benfeldt, Jan Bolinder, Ross Bullock, Peter M. Bungay, Elizabeth C. M. DeLange, Hartmut Derendorf, William F. Elmquist, Margareta Hammarlund-Udenaes, Christian Joukhadar, Dean L. Kellogg Jr., Craig E. Lunte, Carl Henrik Nordstrom, Hans Rollema, Ronald J. Sawchuk, Belinda W. Y. Cheung, Vinod P. Shah, Lars Stahle, Urban Ungerstedt, Devin F. Welty, and Helen Yeo. Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. *Pharmaceutical Research*, Vol. 24, No. 5, May 2007

Chu Jianxiong, Gallo James M, Application of microdialysis to characterize drug disposition in tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 45:243-253, 2000

Cruz Martínez Ángeles. Cada año mueren de cáncer 61 mil mexicanos:INEGI. La jornada, viernes 3 de febrero de 2006,[Internet], URL<<http://www.jornada.unam.mx/2006/02/03/048n3soc.php>>

Dukic S, Matthieu L, Kaltenbach, Bertrand G, Helene M and Richard V. Determination of free extracellular levels of methotrexate by microdialysis in muscle and solid tumor of the rabbit. *Pharmaceutical Research*, Vol. 15, No. 1, 1998

Estapé, J., Burgos, P.I. Medicina general y cáncer. Ed. Doyma, España, 1991.

Elmqvist William F., Sawchuk Ronald J. Application of Microdialysis in Pharmacokinetic Studies. *Pharmaceutical Research*. Vol 14 No 3, 267-288, 1997

Florey Klaus. Analytical Profiles of drug Substances. Vol 9, Academia Press, , USA. pp. 245-273, 1980.

Front D. Israel O., Iosilevsky G., Even-Sapir E., Frenkel A., Peleg H., SteinerM., Kuten A., Kolodny GM. Human Lung tumors: SPECT quantitation of differences in Co-57 bleomicyn uptake. *Radiology* 165:129-133, 1987

Gaddum, J.J. Push-Pull cannulae. *J. Physiol.* 155 : 1, 2P, 1961

Galmarini C.M, Galmarini F C Multidrug resistance in cancer therapy: role of the microenvironment. *Curr Opin Investing Drugs*. 4:1416-1421, 2003

Gunaratna C, Kissinger P.T, Application of microdialysis to studies in vitro metabolism of drug in liver microsomes. *J. Biomed Anal.* 16:239-248, 1997

Hansen D, Malonne I D, Susan M L, and Craig E L. Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci.* 88 (1):14-27, january 1999

Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I et al. Adhesion to fibronectin via integrinsregulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance CAM-DR. *Oncogene*. 19: 4319–4327, 2000.

Hocht Cristian, Opezzo Javier, Taira Carlos. Applicability of reverse microdialysis in pharmacological and toxicological studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 55:3-15, 2007

Hryniuk W. M, The importante of dose intensity in the outcome of chemotherapy. In: *Importan Adv. Oncol.* 121-141, 1988

INEGI. Situación Actual del Cáncer de Mama en México. [Internet],URL www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/presnsa 31 de enero de 2008

Jain R.K. Delivery of novel therapeutic agents in tumor: physiological barriers and strategies. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:570-576, 1989

Jain R.K., Munn L.L. and Fukumura D. Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy. *Nature Rev.Cancer.* 2, 266-276, 2002

Jaitovich Ariel. Capítulo Introducción al tráfico de sustancias a través de la membrana celular. Best and Taylor Bases fisiológicas de la práctica médica. 13ª Ed, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 2003

Jang Seong H. Guillaume W. M, Lu D. and Jessie A. Drug Delivery and transport to solid tumors. *Pharmaceutical Res.* Vol. 20, No. 9, sep, 2003

Jynge, P. Skjetne I, Gribbestad C.H, Kleinbloesem H. F, Hoogkamer O, Antonsen J, Krane O.E, Bakoy K. M, Furuheim O, Nilsen. In vivo tissue pharmacokinetics by fluorine magnetic resonant spectroscopy: a study of liver and muscle disposition of fleroxacin in humans. *Clin Pharmacol. Ther.* 48 (5) 481-489, 1990

Kenneth E. Garrisona, Stephanie A. Pasasb, Joshua D. Cooperb, Malonne Daviesc
A review of membrane sampling from biological tissues with applications in pharmacokinetics, metabolism and pharmacodynamics *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 17 1–12, 2002

KitazawaH., Sato H., Adachi I., Masuko Y. y Horikoshi I. Microdialysis Assessment of fibrin glue containing sodium alginate for local delivery of doxorubicin in tumor-bearing rats. *Biol.Pharm, Bull.* 20 (3)278-281,1997.

Leu A. J., Berk D.A. Lymboussaki A., Alitalo K., Jain R.K. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 60, 4324-4327, 2000.

Maidment N.T., Brumbaugh D.R, Rudolph V. D, Erdelyi E, and Evans C. Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience.* 33, 549-557, 1989

Masson E, Zamboni W C, PK optimization of cancer chemotherapy effect on outcomes. *Clin Pharmacokinet.* 32:324-343, 1997

The Merck Index.10 edition, Publisher by merck Co.Inc., USA, 1983

Michinton Andrew I., Tannock Ian F. Drug penetration in solid tumors. *Nature Reviews Cancer*, Volume 6, august 2006

Moulder J. E. Rockwell S Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 5 313-341, 1987

Moyano Jato, Alfredo José. Mecanismos de resistencia a fármacos en oncología, Hospital Ramón y Caja. Internet, [PDF], URL<
<http://www.fiomedica.org/Mecanismos%20de%20resistencia%pdf> 31 de enero de 2008

Mycek J. M., Harvey R. Farmacología, 2ª ed., Mc Graw Hill, México, 2004

Myers. Charles, Chabner A. Bruce. Cancer Chemotherapy principles and practice J.B. Lippincott Company, Philadelphia, USA, 1990

Netti P. A., Berk D.A. Swartz M.A. Grodzinsky A. J. and Jain R.K. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumor. *Cancer Res.* 60, 2497-2503, 2000

Perry C. Michel, Anderson M. Clay Donehower C. Ross. Quimioterapia. Abeloff Martin D.col. Oncología clínica, 3ª ed., Vol. II, ELSEVIER, España, 2005.

Pimentel Enrique. Oncogenes, 2ª ED., CRC Press inc., Boca ratón, Florida, USA, 2000.

Plock Nele, Kloft Charlotte. Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25:1–24(2005)

Rang H.P., Dale M.M.. Farmacología, 5ª ED. Editorial ELSEVIER, Madrid, España, 2004.

Robinson T. E., Justice JR J.B. Microdialysis in neurosciences. ELSEVIER, Los Paises Bajos, 1991.

Rocha Luisa et al. Microdiálisis, Sociedad Mexicana de Ciencias fisiológicas, México, 1997.

Sánchez-Suárez P. Benítez-Bribiesca L. Procesos biomoleculares de la resistencia a drogas. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 1 : 187-199, 2006

Sandberg, M. y Lindstrom, S. Aminoacids in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat-collection *in vivo*. *J. Neurosci. Methods* 9,65-74. 1983

Sanz Pedrero P. Fisicoquímica para farmacia y biología. Ediciones Científicas y Técnicas SALVAT, España, 1992

Shah K.P, Chang M, Riley C.M, Automated analytical systems for drug development studies. Multivessel dissolution testing system based on microdialysis sampling. *J Phar Biomed Anal* 13:1235-1241, 1995

Tannok, I. F. , Lee, C. M., TungalJ. K., Cowan, DS. M., y Erogin M. J. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potencial cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* (8), 878-884, 2002.

Tungal J.K. David S.M, Cowan H. S, Tannock I.F. Penetration of anticancer Drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. *Clinical Cancer Research.* Vol.5, 1583-1586, June 1999

Tunggal J.K., Melo T., Ballinger J.R., Tannock I. F. The influence of expression of p-glycoprotein on the penetration of anticancer drugs through multicelular layers. *Int. J. Cancer*. 86, 101-107, 2000

Verbeeck Roger K. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* 45, 217-228, 2000

Xie Rujia, M. ReneÂ Bouw & ,Margareta Hammarlund-Udenaes Modelling of the blood-brain barrier transport of morphine-3-glucuronide studied using microdialysis in the rat: involvement of probenecid-sensitive transport. *British Journal of Pharmacology* 131, 1784:1792 (2000)

Zamboni W C., Gervais, A. C., Egorin M. J., Schellens J. H. M., Hamburger D. R., Delauter B. J., Grim A., Zuhowski E. G., Joseph E., Pluim D., Potter D. M., and Eiseman J. L. Inter- and Intratumoral Disposition of Platinum in Solid Tumors after Administration of Cisplatin. *Clinical Cancer Research*. Vol. 8, 2992–2999, September 2002

Zara G P, Cavalli R, Fundaro A, Bargonic A, Caputo O, and Gasco M, R. Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN) *Pharmacological Research*, Vol. 40, No. 3, 1999

Zhou J. Sheare E.C, Hong J, Riley C.M, Schowen R, Automated analytical systems for drug development studies. V. A system for enzyme kinetic studies. *J Pharm Biomed Anal* 14:1691-1698, 1996

Zhou Qingyu, Gallo James. *In Vivo* Microdialysis for PK and PD Studies of Anticancer Drugs. *The AAPS Journal*; 7 (3) Article 66, 2005