



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE ESTUDIOS DE
PERMEABILIDAD DE CASIOPEÍNA[®] III-ia
A TRAVÉS DE CÉLULAS MDCK.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A
SOFÍA DEL CASTILLO GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Lena Ruiz Azuara
Vocal: Dra. Inés Fuentes Noriega
Secretario: M en C. María Isabel Gracia Mora
Primer suplente: M en C. Luis Jesús García Aguirre
Segundo suplente: M en C. Roberto Carlos Cañas Alonso

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 112 y 113, Departamento de Farmacia Conjunto E
Facultad de Química, UNAM

Laboratorio de cultivo celular, Unidad de Experimentación Animal UNEXA
Conjunto E Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor técnico

M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso

Sustentante

Sofía del Castillo García

A los proyectos:

CONACyT 60085

Facultad de Química PAIP 6390-05

PAPIIT IN-209609

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Escuela Nacional Preparatoria plantel 5 “José Vasconcelos” y a la Facultad de Química, por abrirme sus puertas, por darme la oportunidad de aprender de todos sus profesores, por todos sus maravillosos espacios y por los mejores momentos de mi vida.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por la confianza y apoyo incondicional para este y muchos otros proyectos, pero sobre todo por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A la M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado por su apoyo, paciencia, quien me enseñó más que técnicas, experiencias y sabiduría. Me mostró la humildad y nobleza a través de la química gracias por estar en los momentos complicados.

A la Dra. Helgi Jung por las pláticas, los consejos y sobre todo por compartir sus experiencias con todos sus alumnos

Al M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso por el apoyo, la paciencia ayuda y tiempo brindados para la conclusión del proyecto.

A la M. en C. Isabel Gracia Mora por abrirme las puertas de la UNEXA y facilitar el desarrollo de este trabajo en el laboratorio de cultivo celular

A la MVZ Lucía Macías Rosales por dejarme ser parte de la UNEXA; no solo como visitante si no como compañera y amiga, mil gracias por todos los momentos y

AGRADECIMIENTOS

sobre todo por compartir los momentos difíciles para iniciar el cultivo de la línea celular.

A la Dra. Claudia Rivera Guevara por el ánimo, la compañía y por todos los consejos así como las platicas durante el trabajo en el laboratorio de cultivo celular.

Al M. en C. Francisco Sánchez Bartz por la ayuda, los consejos, las técnicas para que sobrevivieran mis células, mil gracias por eso y por toda la ayuda para la conclusión de este trabajo.

A la M. V. Z Marisol Rivera por la chispa el ánimo y el buen humor que la acompañan todos los días

A la Dra. Lilián Yépez Mulia de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Laboratorio de Parasitología en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social por donar la línea celular para este proyecto

A la Dra. Sonia Galván del departamento de Neuroquímica del edificio de investigación en neurofisiología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por las facilidades otorgadas para la lectura de las muestras en el fluorómetro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario González de la Parra, a la M. en C. Clara Espinosa Martínez y a la Q.F.B. Victoria Burke Fraga por la oportunidad que me brindaron para desarrollarme profesionalmente, por los maravillosos consejos, por el fomento a la investigación biofarmacéutica y sobre todo por todas las facilidades otorgadas para la revisión de este proyecto.

A la M. en C. Fabiola Pérez Becerril, a la QFB Vanessa Díaz Arteaga y a la M. en C. Ericka López por todo el apoyo, las aventuras, los consejos, el ánimo, el buen humor para combinar la conclusión, la revisión y la presentación de este trabajo

A la Dra. Perla Carolina Castañeda, no tengo palabras para agradecer todo el apoyo que me brindó a lo largo de la carrera, por todos sus consejos y enseñarme a luchar por lo que se quiere, gracias por todo

A todos los que contribuyeron para la culminación de este trabajo

Y a los que se opusieron al mismo

Mil gracias

A mi familia

A mis papás por sacrificar parte de su vida para mi formación, por siempre creer en mí, por estar siempre ahí, por la paciencia y el apoyo incondicional en cada paso que doy. Este trabajo es suyo y se los dedico de todo corazón

A mis hermanos Rosalba y a Elías por siempre creer en mí, por todo su apoyo, que además demostraron una enorme comprensión y diplomacia ante cualquier adversidad

A mi abuelita Manuela por todo el impulso, por su enorme cariño y por sus maravillosas ganas de vivir.

A la memoria de mi abuelita Cota por todo su amor, cariño, su enorme fortaleza y sobre todo su gran corazón.

A las familias García Morales, Franco Morales y Cisneros Armendáriz

Por estar ahí en las buenas y en las malas, por apoyar a mi familia en todo momento por saber superar las adversidades, por el entusiasmo de seguir adelante, por los deseos de superación y además por ser un vivo ejemplo del “QUERER ES PODER” y por qué cada uno de ustedes me animó a dirigirme hacia donde estoy, por todo esto y por lo que falta, les agradezco de todo corazón.

A mis amigos

Andrea y Horacio por el apoyo y la comprensión, quienes desde mucho antes de plantearme esta idea creyeron en mí además sin darse cuenta, me guiaron por el camino correcto

Héctor e Itzel quienes me ayudaron, me entendieron en el momento adecuado, gracias por las largas conversaciones, los buenos consejos y los maravillosos momentos.

A todos los chicos de la **Jarribanda**: Belén, Alexis, Christian, Alejandro, Jonathan, Adriana, Adrián, Tania Daniela, Claudia, Oscar y Ana Lilia, por todas las risas, el llanto, la amistad, los buenos momentos su comprensión y entendimiento, por los buenos y los malos momentos sin su apoyo no hubiera logrado todo esto.

A mis amigos de la **Facultad de Química**: Arcadio Cruz, Alejandro Gutiérrez, Ernesto Guerrero, Rodrigo Fuentes, Mónica García, Carlos Ramírez, Alejandra Cortés, Narenthzy Díaz, Eduardo Molina, a quienes conocí a lo largo de la carrera, me ayudaron en gran parte de ella, por brindarme su amistad, por las experiencias compartidas, por su cariño y por formar parte de mi vida.

Por último pero no menos importante, a mis compañeros y amigos de los laboratorios **112 y 113** Liliana, Hernán, Ileana, Erandi, José, José Luis, Magaly, Luis, Joel, Saúl, Daniel, Memo, Paola, César, por toda esa chispa, entusiasmo y la calidez de un maravilloso ambiente de compañerismo, saben que sin ustedes este

DEDICATORIAS

trabajo no estaría terminado ni mucho menos escrito, gracias por la agradable estancia en el laboratorio dejando a un lado el aburrimiento extremo, por todas esas noches sin dormir y sobre todo por las platicas interminables. Por que algún día volvamos a trabajar como equipo. Por todo lo que nos falta un millón de gracias.

Como seguramente omití a alguien, les pido disculpas saben que a pesar de todo los llevo en mi corazón y agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí a lo largo de mi carrera o bien algunos se dedicaron o influyeron para tomar el camino adecuado, a todos los que me ayudaron a ser lo que soy muchas gracias

Por el ayer, por hoy y por todo lo que falta

Todo llega para el que sabe esperar

Índice General

	Página
Introducción	1
Antecedentes	4
• Cáncer	5
• Tratamientos contra el cáncer	7
• Complejos de coordinación con platino	8
○ Aplicaciones terapéuticas	8
○ Mecanismo de acción	8
○ Desventajas	8
• Cobre	9
○ Toxicidad	9
○ Absorción	9
○ Distribución	9
○ Metabolismo	10
○ Excreción	10
• Efectos del cobre sobre la salud	10
• Casiopeínas [®]	12
• Casiopeína III-ia [®]	16
○ Solubilidad	16
○ Estabilidad	16
○ Actividad	17
○ Toxicidad	17
○ Mecanismo de acción	18
○ Metabolismo	18
• Desarrollo de nuevos fármacos	19
○ Estudios preclínicos	19
○ Estudios clínicos	20

▪ Fase I	20
▪ Fase II	20
▪ Fase III	20
• Cultivo celular	21
• Cultivo celular como herramienta en biofarmacia	21
• Transporte epitelial de fármacos en cultivo celular	23
○ Control de calidad de la membrana celular	26
• Transporte de fármacos en membranas celulares y tejidos intestinales	27
○ Difusión simple	27
▪ Paracelular	28
▪ Transcelular	28
▪ Transporte activo	28
• Uniportadores	28
• Antiportadores	28
• Simportadores	28
▪ Difusión facilitada	28
• Células MDCK	30
Hipótesis	31
Objetivos	33
Metodología	35
• Equipo y material	36
○ Método de cuantificación	36
○ Cultivo celular	37
• Reactivos	38
○ Método de cuantificación	38
○ Cultivo celular	38
• Material biológico	39
• Estándares	39
• Preparación de soluciones	40
○ Metodología analítica	40

▪ Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH=8	40
▪ Medio de transporte	40
○ Cultivo celular	41
▪ Medio de cultivo suplementado (DMEM)	41
○ Ensayo de permeabilidad	42
● Procedimiento experimental	42
○ Optimización de la metodología analítica	42
○ Validación	43
▪ Validación del sistema	44
• Linealidad	44
• Repetibilidad	44
▪ Validación del método analítico	45
• Selectividad	45
• Linealidad	45
• Precisión	46
○ Repetibilidad	46
○ Reproducibilidad	46
• Estabilidad	47
○ Corta	47
○ Muestra procesada	47
○ Ciclos de congelación-descongelación	47
• Límite de detección	48
• Límite de cuantificación	48
○ Cultivo celular	49
▪ Descongelamiento de la línea celular	49
▪ Cuantificación celular	49
▪ Confluencia y cultivo stock	49
▪ Disociación celular	50
○ Ensayos de citotoxicidad	50
▪ Tinción con sulforrodamina B	52
▪ Cl_{50}	52

○ Estudio de permeabilidad	52
▪ Preparación del cultivo celular en las celdas Transwell	52
▪ Medición de la resistencia transepitelial	53
▪ Transporte Apical-Basolateral	53
▪ Transporte Basolateral-Apical	53
▪ Integridad de la membrana con Lucifer Yellow	54
Resultados y análisis de resultados	55
• Optimización de la metodología analítica	56
• Validación	56
• Validación del sistema	57
○ Linealidad	57
○ Repetibilidad	57
• Validación del método analítico	58
○ Selectividad	58
○ Linealidad	60
○ Precisión	61
▪ Repetibilidad	61
▪ Reproducibilidad	61
○ Estabilidad	62
▪ Corta	62
▪ Muestra procesada	63
▪ Ciclos congelación-descongelación	64
○ Límite de detección	66
○ Límite de cuantificación	67
• Ensayos de citotoxicidad	68
• CI_{50}	71
• Estudios de permeabilidad	72
Conclusiones	82
Bibliografía	84

Índice de tablas

Tabla		Página
1	Curva de calibración de Casiopeína® III-ia en fase móvil	44
2	Curva de calibración de Casiopeína® III-ia en medio de transporte	46
3	Resultados de repetibilidad del sistema	57
4	Resultados de linealidad del método	60
5	Resultados de repetibilidad del método	61
6	Resultados de reproducibilidad del método	61
7	Resultados de estabilidad corta	62
8	Resultados de estabilidad de la muestra en proceso	63
9a	Resultados de estabilidad en los tres primeros ciclos de congelación-descongelación	64
9b	Resultados de estabilidad en los últimos dos ciclos de congelación-descongelación	65
10	Resultados de límite de cuantificación	67
11	Resultados de la validación y criterios de aceptación	68
12	Porcentaje de inhibición celular	70
13	Concentración obtenida de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 7 µg/mL en dirección apical-basolateral	72
14	Concentración obtenida de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 5 µg/mL en dirección apical-basolateral	72
15	Concentración obtenida de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 3 µg/mL en dirección apical-basolateral	73
16	Concentración obtenida de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 7 µg/mL en dirección basolateral-apical	73
17	Concentración obtenida de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 5 µg/mL en dirección basolateral-apical	73
18	Concentración obtenida de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 3 µg/mL en dirección basolateral-apical	74
19	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia aplicando una	

	concentración de 7 µg/mL en dirección apical-basolateral	75
20	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 5 µg/mL en dirección apical-basolateral	76
21	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 3 µg/mL en dirección apical-basolateral	76
22	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 7 µg/mL en dirección basolateral-apical	76
23	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 5 µg/mL en dirección basolateral-apical	77
24	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia aplicando una concentración de 3 µg/mL en dirección basolateral-apical	77
25	Coefficientes de permeabilidad aparente	79
26	Relación del coeficiente de permeabilidad en ambas direcciones	79

Índice de figuras

Figura		Página
1	Estructura de la Casiopeína® III-ia	16
2	Etapas del desarrollo de un medicamento	19
3	Pirámide de complejidad entre el uso de un ser vivo y fases isotrópicas lipofílicas	22
4	Esquema del sistema de cultivo para estudios de permeabilidad	25
5	Rutas involucradas en la absorción intestinal	27
6	Esquema de distribución para la administración de Casiopeína® III-ia en placas de 96 pozos	51
7	Gráfica de linealidad del sistema	57
8	Cromatograma de Casiopeína® III-ia en fase móvil	58
9	Cromatograma del medio de transporte	58
10	Cromatograma de ketorolaco en fase móvil	59
11	Cromatograma de Casiopeína® III-ia en medio de transporte	59
12	Linealidad del método	60
13	Placa de 96 pozos teñida con sulforrodamina B	69
14	Gráfica de inhibición celular	70
15	Gráfica del análisis Probit	71
16	Concentración de Casiopeína® III-ia obtenida en dirección apical basolateral	74
17	Concentración de Casiopeína® III-ia obtenida en dirección basolateral-apical	75
18	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia en dirección apical-basolateral	78
19	Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia en dirección basolateral-apical	78
20	Comparación de permeabilidad en las tres concentraciones y ambas direcciones	80

I N T R O D U C C I Ó N

El cáncer es un conjunto de enfermedades que tienen como característica común la proliferación descontrolada de células transformadas y poco diferenciadas que no responden a los procesos homeostáticos del organismo, con lo que se permite la invasión de tejidos cercanos o a distancia.

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015.

Es por ello que en México, un grupo de investigadores de la facultad de química de la UNAM se dio a la tarea de diseñar, sintetizar y evaluar una familia de compuestos llamada Casiopeínas[®].

Las Casiopeínas[®] son un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) con centro metálico, que en esfera de coordinación presentan un ligante bidentado tipo diimina (N-N) y otro aminoacidato (N-O) o donador (O-O) siguiendo una geometría cuadrada plana o pirámide de base cuadrada.

Esta familia de compuestos ha demostrado tener una importante actividad anticancerígena y en el caso de la Casiopeína[®] III-ia puede tener una futura aplicación dentro de la terapéutica oncológica.

En el presente trabajo se desarrolló la metodología para evaluar la permeabilidad aparente de la Casiopeína[®] III-ia en células MDCK dividido en tres etapas.

En la primera etapa se evaluó la concentración a la cual la Casiopeína[®] III-ia afecta directamente a las células MDCK y se obtuvo como resultado la CI_{50} de $13.9 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$.

En la segunda etapa, se optimizó y validó una metodología bioanalítica para cuantificar Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte. Para la validación se empleó Ketorolaco como estándar interno evaluando: linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, estabilidad, límite de detección y límite de cuantificación; cumpliendo con los requisitos que establece la NOM-177-SSA1-1998, cumpliendo satisfactoriamente con cada uno de ellos y comprobando que la Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte es estable durante 72 horas a -20°C.

En la tercera etapa, se evaluó la permeabilidad aparente empleando las células MDCK a tres diferentes concentraciones en dirección Apical-Basolateral y Basolateral-Apical demostrando que el transporte de Casiopeína[®] III-ia se lleva a cabo mediante difusión pasiva.

A N T E C E D E N T E S

Cáncer

La palabra cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular.

El cáncer es un conjunto de enfermedades que tienen como característica común la proliferación descontrolada de células transformadas y poco diferenciadas que no responden a los procesos homeostáticos del organismo, con lo que se permite la invasión de tejidos cercanos o a distancia (metástasis) ^[1]

El cáncer o neoplasia maligna se clasifica de cuatro maneras principales, de acuerdo al tipo celular y tejido a partir del cual se desarrollan. El primer tipo son los carcinomas, aquellos que se desarrollan a partir del epitelio; el segundo tipo son los sarcomas, el que se desarrolla a partir del tejido conectivo o células musculares; el tercer tipo es el derivado del sistema nervioso; y por último se encuentran las leucemias, las cuales son tipos de cáncer que se derivan de células hematopoyéticas. Cada una de estas categorías tiene múltiples subdivisiones de acuerdo al tipo celular específico, la ubicación del cáncer en el cuerpo, y la estructura del tumor ^[2]. Es por lo anterior que cada tipo de cáncer tiene características que reflejan su origen, por lo cual dos tipos de cáncer distintos son dos enfermedades completamente diferentes.

Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual son los siguientes:

- Pulmón
- Estómago
- Hígado
- Colon

- Mama

Los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial (ordenados según el número de defunciones mundiales) son los siguientes:

- En mujeres
 - Mama
 - Pulmón
 - Estómago
 - Colon-recto
 - Cuello uterino
- En hombres
 - Pulmón
 - Estómago
 - Hígado
 - Colon-recto
 - Esófago
 - Próstata

Aunque existen muchas causas que originan este grupo de padecimientos, éstas se pueden agrupar en los siguientes grupos:

- Predisposición genética
- Factores ambientales
- Factores ambientales interaccionando con predisposiciones genéticas
- Factores desconocidos

En el Instituto Nacional de Cancerología de México se ha publicado información sobre sus registros de diagnóstico de cáncer presentes en los pacientes que acuden a dicha institución considerando la edad de los individuos y la aparición de tumores. El cáncer cérvico uterino representó el 24% de todos los pacientes con cáncer, y por frecuencia, ocupó el primer lugar. El cáncer de órganos genitales,

junto con los tumores de mama, representaron más del 50% de tumores en mujeres mexicanas ^[3].

Tratamientos contra el cáncer

En la actualidad existen diversos tratamientos contra el cáncer como

- Quimioterapia
- Radioterapia
- Cirugía
- Inmunoterapia
- Terapia hormonal

La quimioterapia es el tratamiento de elección para ciertas afecciones malignas principalmente cuando no se ha controlado la enfermedad; uno de los problemas más importantes en la aplicación de este tratamiento es la resistencia que presentan los tumores a los fármacos aplicados. ^[4]

Dentro de la quimioterapia se han desarrollado diferentes fármacos que solos o en combinación han sido efectivos en los tratamientos de cáncer sobre todo las nuevas combinaciones y estrategias son las que permiten buenos resultados en tumores antes invulnerables.

Por si sola la quimioterapia es muy útil en el tratamiento de leucemias, linfomas malignos, tumores de testículos entre otras. También se utiliza como tratamiento adyuvante complementario del tratamiento quirúrgico del cáncer de mama y de colon. Así como antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor y facilitar la operación (quimioterapia neoadyuvante) ^[5]

Complejos de coordinación con platino ^{[6][7]}

Entre los agentes quimioterapéuticos más empleados se encuentran los compuestos de coordinación de platino, identificados como agentes citotóxicos.

Actualmente el cisplatino es uno de los compuestos más efectivos en sistemas tumorales experimentales.

Aplicaciones terapéuticas

Tratamiento de tumores sólidos

Buena respuesta de cánceres de:

- Vejiga
- Cabeza
- Cuello
- Endometrio

Mecanismo de acción

Interactúa con el ADN formando intermediarios electrofílicos que actúan en reacciones de sustitución nucleofílica para formar uniones covalentes con el ADN, desnaturalizando la cadena de ADN.

Daño de mitocondria celular, inhibiendo ATPasa, alterando transporte celular y ocasionalmente causando apoptosis, necrosis y muerte celular.

Desventajas.

- Toxicidad: induce daño y necrosis en el riñón, ototoxicidad, neurotoxicidad y mielosupresión.
- Resistencia del tratamiento en algunos tumores.

Cobre

El cobre es un metal de transición con número atómico 29 y masa atómica de 63.546 g/mol. Ocupa el lugar número 26 de los elementos más abundantes en la corteza terrestre. Es esencial en los sistemas biológicos. Sus propiedades químicas permiten su participación en procesos que involucran la transferencia de electrones asociadas con enzimas oxidativas.

La concentración de cobre dentro de las células no excede de 10^{-15} M.

Una gran parte de los complejos de coordinación de este ión presentan coloración azul o verde debido a la existencia de banda ancha y asimétrica entre 600 y 900nm. [8]

Toxicidad [9]

Los niveles fisiológicos normales de cobre en el cuerpo están sujetos a la cantidad y velocidad con la que se absorbe, distribuye y se excreta.

Absorción

Se ingiere a través de la dieta y es absorbido en una cantidad de 2 mg al día a través del estómago y el intestino delgado, viéndose afectado por la competencia con otros metales como el zinc, hierro y cadmio. En ratas se absorbe principalmente en el duodeno

Distribución [8]

Aún no se ha aclarado el cómo llega a la sangre, pero una vez estando ahí conduce el metal hasta los tejidos periféricos y el hígado en donde se generan oxidasas.

En promedio un adulto sano de 70 Kg de peso tiene 110mg de cobre que aproximadamente se distribuye de la siguiente forma:

- Suero o plasma de 0.3-1.4mg/L

- Hueso: 46mg
- Músculo: 26mg
- Hígado: 10mg
- Cerebro: 9mg
- Sangre: 6mg
- Riñones: 3mg
- Corazón: 1.5mg

Metabolismo

El cobre libre es controlado por las metalotioneínas y aminoácidos con la asociación de enzimas cobre-dependientes.

El metabolismo del cobre consiste mayoritariamente de su transferencia con varios ligantes orgánicos; los más notables son los grupos sulfhidrilo e imidazol en aminoácidos y proteínas. La vida media del cobre inyectado en humanos normales es de aproximadamente 4 semanas.^[10]

Excreción^[9]^[12]

El cobre se excreta principalmente por vía biliar; el cobre biliar es regresado al intestino y excretado por las heces.

Normalmente el cobre se excreta en la orina, en un porcentaje de 0.5 a 3 % diariamente, lo que equivale de 15 a 36 µg cada 24 horas.

Cuando el cobre se administra vía intravenosa, la excreción biliar no incrementa proporcionalmente con la dosis, ya que el transporte hepatobiliar se satura, aumentando la excreción del cobre inalterado.^[11]

Efectos del cobre sobre la salud^[8]

El cobre puede ser significativamente tóxico, pese a que es un elemento esencial para los organismos superiores. Los márgenes entre las concentraciones

necesarias y las concentraciones tóxicas, están muy próximas. En humanos, la ingestión de grandes cantidades de cobre pueden causar diferentes síntomas como:

- Vómito severo
- Diarrea
- Hemólisis
- Necrosis hepática
- Hematuria
- Proteinuria
- Taquicardia
- Convulsiones
- Coma, hasta la muerte

Casiopeínas[®] [13]

Los compuestos que contienen metales se están estudiando extensamente debido a su importancia enzimática, estructural y roles reactivos en los procesos biológicos [14]. En los últimos años sus propiedades han despertado interés en el desarrollo de nuevos medios de utilizar metales o agentes que los contienen en la modulación de sistemas biológicos y en la búsqueda de su uso potencial en medicina.

Algunos grupos de investigación han reportado el desarrollo de compuestos anticancerígenos conteniendo metales [15][16]. La actividad citotóxica de un complejo metálico, el cual está altamente relacionado con una actividad antitumoral, se ha encontrado que esta mediada por la identidad del metal y los ligandos unidos a este, y en muchos casos un factor puede dominar en otro. [15]

La investigación actual se centra en el interés del diseño racional de nuevos complejos de cobre como agentes potenciales antitumorales. El cobre es un metal de transición esencial relacionado altamente con aspectos de procesos de la vida y especialmente participando en la biología redox [14]. Debido a sus propiedades como un metal reactivo redox, el cobre y sus complejos tienen la habilidad de catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar la modificación oxidativa de componentes celulares (lípidos, proteínas y DNA) e intervenir en el balance redox en la célula, y/o en el proceso de señal celular relacionado con reacciones redox [15][17].

Se han sintetizado, caracterizado y patentado una serie de nuevos agentes antineoplásicos basados en complejos con quelatos mixtos de complejos de cobre (II) nombrados Casiopeínas[®] [18][19] con fórmula general [(Cu(N-N)(α -L-aminoacidato)] NO₃ y [Cu(N-N)(O-O)]NO₃, donde el donador N-N es una diimina sustituida aromática (1,10-fenantrolina) ó (2,2'-bipiridina) y el donador O-O es un acetilacetato (*acac*) o salicilaldehidato (*sala*).

Las bipyridinas 2,2 sustituidas (*bipi*) y las fenantrolinas 1,10 sustituidas (*fen*) son ligandos donadores de nitrógeno bidentados con una relativa alta afinidad al cobre [20-22], sus sistemas de anillo aromático extendido permite que sus ligandos se unan al DNA por interacciones intercaladas y no intercaladas aún si son ligandos libres o en complejos metálicos [15][23]. Los ácidos α -L-amino se seleccionaron como ligandos secundarios debido a su afinidad con los complejos de cobre (II) (*bipi*) y (*fen*) [24][25], y su baja toxicidad. Los complejos *acac* y *salal* tienen también buena afinidad a los complejos de cobre (II) (*fen*) [24], y pueden modular las propiedades redox del centro metálico.

Los datos químicos y estructurales reportados hasta el momento demuestran que el centro de cobre (II) y sus complejos ternarios se colocan ligeramente con una geometría cuadrado plano distorsionada [26].

Durante el desarrollo de estas moléculas se tomaron en cuenta cuatro aspectos fundamentales:

1. La inclusión de un metal esencial en lugar del platino, lo que disminuye su toxicidad.
2. La formación de quelatos que favorecen la orientación "cis" alrededor del ion metálico
3. La asociación de moléculas con capacidad quelatante que le confiere diferentes niveles de hidrofobicidad con sustituyentes periféricos que pueden modificar las propiedades de los compuestos.
4. La capacidad del Cobre (II) de reducirse a Cobre (I), que favorece la generación de especies reactivas de oxígeno. [13,27,28]

Estas características se reflejan en las propiedades de los complejos en términos de su solubilidad, potencial electroquímico, capacidad de transporte a través de membranas y estabilidad, de tal manera que se lleve a cabo una interacción de estos compuestos con el ADN, lo cual se propone como mecanismo de acción. [29]

La Casiopeína[®] III-ia demostró actividad anticancerígena en modelos *in vitro*, al evaluar la inhibición del crecimiento de un cultivo celular empleando líneas tumorales humanas y murinas. En líneas tumorales se utilizaron concentraciones 500 veces menores de Casiopeína[®] III-ia comparadas con el cisplatino para inhibir el 50% del crecimiento celular; empleando líneas de carcinoma cérvico-uterino humano (HeLa, SiHa), de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de colon (HCT-15).^[30]

Estas consideraciones han permitido el estudio de la actividad potencial antitumoral de estos complejos de cobre (II). Una hipótesis es que la naturaleza, número y posición de los sustituyentes en los ligandos diimina, así como la modificación del acidato α -L-amino ó el donador O-O tendrán un efecto, ya sea en la selectividad o en el grado de actividad biológica mostrada por los complejos ternarios de cobre (II). Este efecto se puede deber a la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los complejos, por ejemplo, la conducta redox del centro metálico o la solubilidad acuosa del complejo.

Algunos complejos de esta familia se han probado *in vivo* e *in vitro* y han mostrado actividad antitumoral^{[31][32]}, genotóxica^[33] y citotóxica^{[34][33]}. Su modo de acción se ha elucidado en base a la evidencia que se basa en que estos compuestos pueden inhibir la proliferación celular y producir muerte celular dosis-dependiente por apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de activación de caspasas^{[31][35]}. La apoptosis observada puede ser el resultado de una o varias señales que permiten el efecto final. Estas señales pueden estar mediadas por generación de ROS^[33], por la toxicidad mitocondrial observada^[31, 36,37], ó ambos, y pueden tener un papel importante, sólo o cooperativamente, en la regulación de la muerte celular inducida por este tipo de complejos. La inhibición de la respiración y la síntesis de ATP se pueden observar en la mitocondria como resultado del daño en varios sitios mitocondriales diferentes de una manera dosis-dependiente que compromete los procesos dependientes de energía en las células^[38]. La inhibición, la proliferación celular^{[33][31]} y la degradación del DNA^[33,31,39] con la presencia de agentes reductores es simultánea a la generación de

ROS, en varios estudios sugieren que la oxidación del DNA observada en la células pueden provocar la muerte celular. Por otro lado, existe también la posibilidad de interacciones directas de los complejos con el DNA por intercalación o no intercalación como se espera para estos complejos debido a la fracción aromática planar de sus ligandos diimina ^[15,23,40]. Como sea, el blanco celular, puede ser otro, aparte de la mitocondria y el DNA; la administración *in vivo* de los complejos de esta familia produce daños severos en los eritrocitos que se expresan como anemia hemolítica ^[41]. Estas células están fuera de los blancos celulares ya mencionados, es por ello que se tiene la hipótesis de que existen otros blancos celulares que están involucrados en el mecanismo. En suma, a nivel molecular, la evidencia apunta a varios blancos biológicos que pueden ser dañados mediante mecanismos heterogéneos que trabajan simultáneamente.

Dos de los complejos más estudiados en varios modelos *in vivo* e *in vitro* son [(Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)] NO₃ (casiopeína IIIa) y [Cu(4,7'-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)]NO₃ (casiopeína II-gly), ambos complejos han mostrado propiedades citotóxicas, proapoptóticas y antitumorales ^[34,31-35]. Con base en estos resultados, los complejos tipo [(Cu(N-N)(*acac*)] NO₃ y [Cu(N-N)(*gly*)]NO₃ con varios sustituyentes en el ligando diimina se seleccionaron para estudios de relación estructura-actividad (QSAR) donde se encontró que la presencia del anillo aromático central en los complejos tipo *fen*, es necesario para preservar la actividad antiproliferativa. Las ecuaciones QSAR mostraron una fuerte relación entre el IC₅₀ y el potencial de media-onda (E_{1/2}), los complejos más activos son los que tienen el oxidante más débil y el cambio de ligandos secundarios *acac* a *gly* tiene menos influencia en la actividad biológica que los cambios en el ligando diimina

Casiopeína III-ia[®]

[Cu (4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO₃, polvo azul cristalino, cuyo peso molecular es de 444.93 con dos moléculas de agua, su fórmula condensada es C₁₇H₁₉CuN₂O₂•NO₃ ; pka de 8.25 y tiene un coeficiente de reparto de 0.3580^[42].

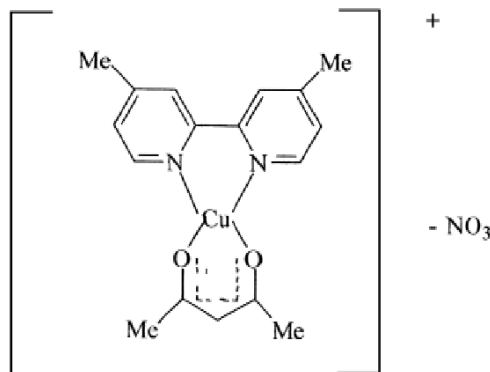


Figura 1. Estructura de la Casiopeína[®] III-ia^[43]

En su estructura la Casiopeína[®] III-ia tiene como centro metálico el Cu²⁺: acetilacetonato como ligante bidentado donador de oxígeno y 4,4'-dimetil bipyridina como ligante bidentado donador de nitrógeno con una geometría cuadrado plano.

Solubilidad

A temperatura ambiente (19-22°C) tiene buena solubilidad en los siguientes disolventes, presentando una mayor disolución en:

Agua> metanol> etanol> solución salina al 9%> soluciones fisiológicas pH=7.4

Estabilidad

Presenta inestabilidad a la luz en solución

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

Bajo condiciones de congelación y protegida de la luz, la Casiopeína[®] III-ia es estable en plasma humano y en sangre por 72 horas, en orina por 24 horas, en

metanol por 96 horas y en solución amortiguadora de fosfatos 64mM a pH= 7.4 es estable por un lapso de 10 días y por 24 horas a 37°C.

Disuelta en metanol, a temperatura ambiente y protegida de la luz, es estable por 24 horas

En solución acuosa y en refrigeración durante 16 días, solo tuvo un 3.8% de degradación ^[43]

Estable en solución de cloruro de sodio al 0.9% durante nueve días.

Estable en solución dextrosada al 5% durante cuatro días.

Estable en solución de Hartman durante cuatro semanas. ^[22]

Actividad

Este compuesto ha demostrado tener ligera genotoxicidad en linfocitos humanos *in vitro*^[23], actividad citostática y citotóxica tanto *in vivo* como *in vitro*, actividad antineoplásica sobre líneas de carcinoma cervico-uterino (HeLa) y carcinoma de células escamosas de cérvix (SiHa) ^[13].

Actividad en mitocondrias hepáticas de rata: actúa como inhibidor de la fosforilación oxidativa. Colapsa el potencial transmembranal; siendo el efecto inhibitorio dependiente del tiempo de exposición y de la concentración. ^[45]

Toxicidad

En estudios realizados sobre la toxicidad aguda en ratas se obtuvieron las dosis letal 50 y la dosis letal 90

Dosis letal 50 en rata macho Wistar es de 14.36mg/Kg por vía intraperitoneal y 5.51mg/Kg por vía intravenosa.

Dosis letal 90 en rata macho Wistar es de 15.44mg/Kg por vía intraperitoneal, y de 7.73mg/Kg por vía intravenosa. ^[46]

Su toxicidad está regida aparentemente por el donador (N-N) así como por los compuestos que poseen acetilacetato como segundo ligante, ^[28] interacciona con el ADN superenrollado y lineal, ^[29] aunque la familia III de las Casiopeínas[®] presenta una menor intensidad de interacción a diferencia de otras Casiopeínas[®] de la familia I y II. ^{[47][48]}

Mecanismo de acción

Se cree que es capaz de inducir muerte en células HeLa mediante mecanismos de apoptosis mientras que en otras Casiopeínas[®] la muerte celular se debe principalmente a mecanismos de necrosis o empleando necrosis y apoptosis. ^[49]

Ha demostrado ser un agente altamente recombinante con la línea celular SPD8, por lo cual su mecanismo de acción pudiera ser por inhibición de las topoisomerasas I y II. Induce acción recombinogénica débil en *Drosophila*. ^[50]

Hay evidencia de que esta molécula actúa como inhibidor de la fosforilación oxidativa. ^[51]

Metabolismo

Aunque aún no se sabe con precisión como es el metabolismo sobre este tipo de fármacos, existen evidencias de que las Casiopeínas[®] son activadas por algunas enzimas; por lo que se ha demostrado que los linfocitos humanos de sangre periférica cuentan en su conformación con algunas estructuras de la familia del citocromo P-450, involucrado en el metabolismo de xenobióticos.

Desarrollo de nuevos fármacos

El desarrollo de un medicamento es un proceso complejo y extenso constituido por varias etapas, que abarcan desde el descubrimiento de una molécula, hasta la aprobación de un fármaco para su uso comercial, donde las probabilidades de éxito son bajas. En realidad el proceso de investigación es costoso, complicado y lento, además de no ofrecer garantías de ser favorable ^[52]; para los medicamentos en general, tan solo el 20% de los descubrimientos, conducen a una molécula candidata, de las cuales solamente el 10% alcanzan el registro comercial. ^[53]

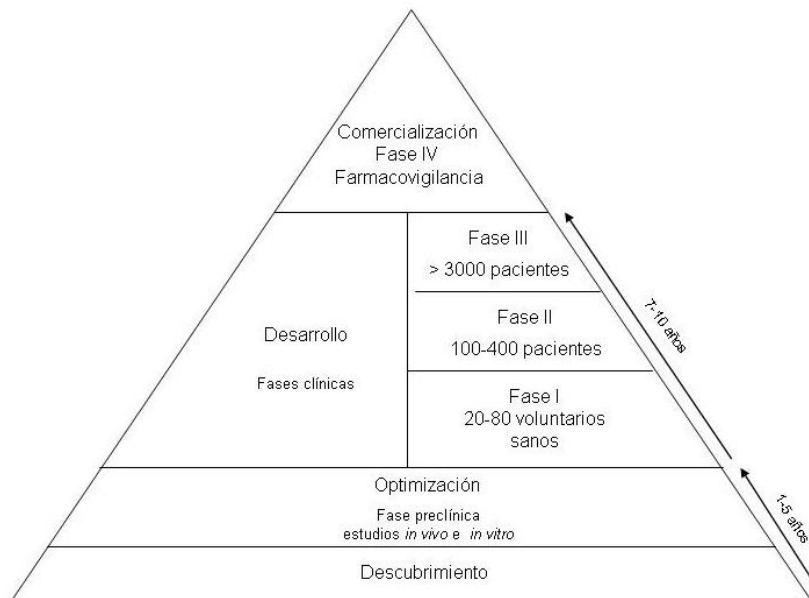


Figura 2. Etapas del desarrollo de un medicamento ^[creación propia]

Estudios preclínicos

En estos estudios, se debe obtener información sobre el comportamiento del fármaco que asegure su uso en estudios clínicos iniciales, en los cuales se evalúa:

- Efectos farmacológicos mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*.
- Toxicidad: Efectos tóxicos a través de pruebas *in vivo* como *in vitro*. Toxicidad aguda en por lo menos dos especies diferentes. Toxicidad a corto plazo así como la toxicidad de los metabolitos.

- Efectos genotóxicos mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*
- Farmacocinética: estudios de absorción y metabolismo, además de la velocidad de excreción del fármaco y los metabolitos.

Estudios clínicos ^[54]

Fase I

Se lleva a cabo el ajuste de dosis en un número de 20 a 80 voluntarios sanos. Se establece la seguridad del producto, las dosis toleradas, así como sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Fase II

Los estudios se realizan en un número de 100-400 pacientes, para determinar la eficacia y seguridad terapéutica. Se evalúan los posibles efectos secundarios.

Fase III

Se prueban las moléculas candidatas en más de 3000 pacientes para monitorear la eficacia y los efectos secundarios frente a diferentes agentes de eficacia comprobada.

Finalmente cuando el fármaco pasa todas las fases del desarrollo con resultados satisfactorios, se solicita la aprobación para el registro del nuevo medicamento para su comercialización. Una vez en el mercado, comienza la fase clínica IV o **farmacovigilancia**, donde se continúan haciendo evaluaciones periódicas con el medicamento a la venta, para establecer la seguridad del producto y detectar la frecuencia de reacciones adversas y efectos secundarios a largo plazo. (Figura 2)

Cultivo celular

Un cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro* manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas ^[64]; se refiere a un cultivo derivado de células dispersas tomadas de un tejido original, de un cultivo primario, de una línea celular, o de una célula extraída por disgregación química, mecánica o enzimática. ^[65]

Ventajas:

- Permiten un control fino y preciso del medio ambiente como pH, temperatura y CO₂.
- Se pueden controlar las concentraciones de nutrientes.
- Homogeneidad de la muestra en cuanto a morfología y composición.
- Pueden almacenarse a bajas temperaturas por periodos largos de tiempo.
- Motivaciones éticas impidiendo el sacrificio de uno o pocos animales.
- Uso de reactivos en pequeñas cantidades. ^[65]

Cultivo celular como herramienta en biofarmacia ^[55]

En el diseño y desarrollo de fármacos, se deben emplear sistemas adecuados para evitar la pérdida de compuestos prometedores en una etapa avanzada del desarrollo debido a la absorción insuficiente y por consecuencia la falta de absorción en el organismo.

Aunado a la toxicidad, las características farmacocinéticas se encuentran entre las causas por las que fallan los nuevos compuestos una vez que se aplican en estudios clínicos, por lo que se han seguido varias estrategias para establecer herramientas para la predicción del paso de los compuestos a través de una barrera *in vivo*.

Entre las estrategias destacan métodos computacionales basados en parámetros fisicoquímicos como el coeficiente de reparto en sistemas bifásicos (octanol-agua), además se han establecido varios niveles de complejidad para estudios de

permeabilidad; que van desde el uso de animales hasta el uso de fases isotrópicas lipofílicas (figura 3)

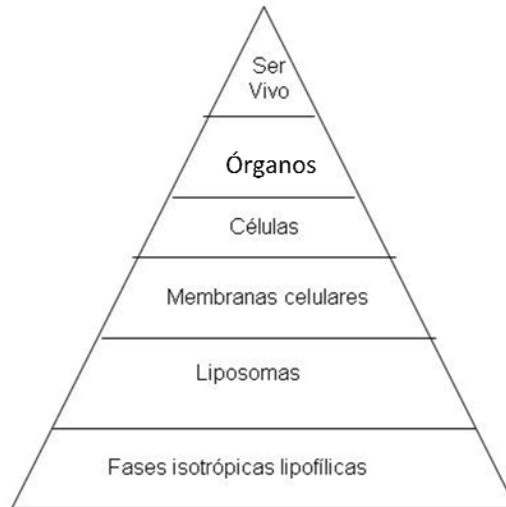


Figura 3. Pirámide de complejidad. El cultivo celular representa un nivel intermedio de complejidad entre el uso de un ser vivo y fases isotrópicas lipofílicas. ^[55]

Cuando se detectan las características de un sistema de permeabilidad, la elección de un sistema de prueba representa un problema entre la elección de un sistema de alto rendimiento con bajo potencial predictivo y un sistema de bajo rendimiento con alto potencial predictivo, es por ello que el cultivo celular ocupa una posición intermedia en la pirámide de complejidad para estudios de permeabilidad además de el uso de varias líneas celulares de origen epitelial y endotelial para estudios de permeabilidad *in vitro* para simular barreras *in vivo* como el epitelio del tracto gastrointestinal, mucosa nasal, piel y la barrera hematoencefálica. ^[55]

Transporte epitelial de fármacos en cultivo celular ^[56]

La determinación de la absorción oral es una parte importante en el desarrollo de nuevos compuestos. Por consiguiente, es de gran importancia realizar estudios de absorción intestinal de los mismos. En general se emplean dos métodos para estudios de absorción. Los modelos animales basados en el aislamiento del intestino *in situ*, donde el fármaco se administra al interior del intestino y se cuantifica la proporción que desaparece y/o la que aparece en sangre. En los modelos alternativos *in vitro* se aíslan segmentos del intestino y se montan en una cámara de Ussing. En este caso el segmento de intestino se emplea como membrana semipermeable entre la cámara donadora y la receptora. El desarrollo de estos métodos alternativos ha hecho posible caracterizar varios factores de modo que determinen el transporte transepitelial de fármacos.

Aunque los modelos se han usado frecuentemente a través de los años, hay algunos inconvenientes. En primer lugar no son de origen humano. Segundo, son relativamente complicados y en consecuencia sólo se puede hacer un limitado número de experimentos. Tercero, la duración del experimento a menudo es limitada desde unos pocos minutos a pocas horas; además de que la desintegración gradual de los fragmentos de intestino en los modelos *in vitro* representa un problema, por lo que se desarrolla un modelo de absorción simple y reproducible que consiste en cultivar células intestinales en membranas permeables. En tal modelo se pueden realizar un gran número de experimentos simultáneamente y durante periodos relativamente largos, usando membranas de células como:

Caco-2: células diferenciadas de adenocarcinoma colorrectal humano que forman una monocapa de enterocitos polarizados parecidos a los del intestino delgado.

HT-29: células productoras de mucina procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano grado II ^[57]

TC-7: subclona de la línea celular Caco-2^[58]

T-84: línea celular adenocarcinoma de colon, la cual se he utilizado como modelo para estudios de secreción epitelial de cloruros, además de que produce y secreta mucina en cultivo.^[59]

ECV304: aislada originalmente de la vena de cordón umbilical humano. Esta línea celular proporciona las características para simular la barrera hematoencefálica en co-cultivo con astrocitos; a diferencia de un cultivo primario, esta línea es de fácil manejo y de adecuada reproducibilidad.^[55]

MDCK: proveniente de epitelio renal de perro, posee una morfología epitelial distintiva, características anatómicas y funcionales de células tubulares normales de mamífero como la formación de uniones estrechas y la presencia de microvellosidades además de que se ha estudiado ampliamente con respecto a genética, composición lipídica, expresión de proteínas y otros parámetros.^[60, 61]

MDR1-MDCK: son células MDCK tipo II a las cuales se les transfirió el gen *mdr-1* que codifica para producir grandes cantidades de glicoproteína-P (P-gp).^[55]

En general, las células se cultivan sobre soportes porosos (Figura 4) en medios de cultivo celular típicos como DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, y 1% de antibiótico (penicilina estreptomycin).

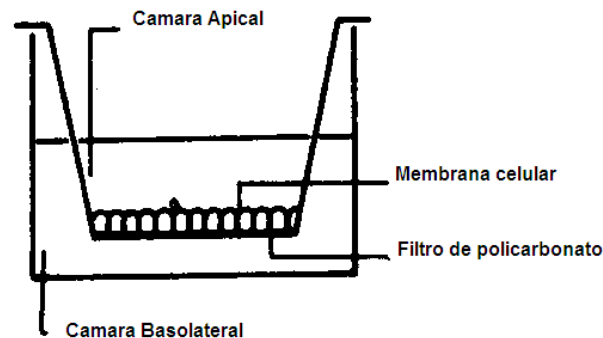


Figura 4 Representación esquemática del sistema de cultivo para determinar la permeabilidad aparente ^[56]

Las células se cultivan a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Los experimentos de transporte se realizan sustituyendo el medio de cultivo por una solución amortiguadora como HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ajustada a pH 7.4; a intervalos regulares se determina la concentración del fármaco en el compartimento donador y una vez obtenida la concentración se calcula el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) como: ^[57]

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{C_0 A}$$

Donde

P_{app}: es el coeficiente de permeabilidad aparente (cm/s)

$\frac{dQ}{dt}$: Es la velocidad de transporte del fármaco (µg/mL)

C₀: es la concentración inicial en el compartimento donador (µg/mL)

A: es la superficie de la monocapa (cm²)

El coeficiente de permeabilidad aparente se usa para cuantificar el transporte en las dos cámaras del sistema de difusión. Es necesario mantener condiciones sink durante todo el experimento lo que significa que la cinética de transferencia sigue un máximo en la cámara receptora de un 10% de la cantidad de fármaco aplicado. Es necesario llevar un experimento control con membranas sin células.

Control de calidad de la membrana celular

Se realiza al inicio y al final de cada estudio para comprobar si la membrana ha mantenido su integridad, al inicio se mide la resistencia transepitelial, que está directamente determinada por las propiedades de las uniones celulares (tight junctions), las cuales se encargan de regular el paso de fluidos y sustancias entre las células que componen el epitelio. En general los epitelios impermeables, poseen una elevada cantidad de uniones celulares y por lo tanto alta resistencia eléctrica al contrario de los epitelios semipermeables, con menor cantidad de uniones celulares y por lo tanto baja resistencia eléctrica.^[62]

Al finalizar el experimento, para comprobar si la membrana ha mantenido su integridad durante todo el proceso de transporte se añade a la superficie apical un marcador de la absorción sin importar la dirección del experimento, generalmente se emplea Lucifer Yellow, como marcador fluorescente altamente soluble en agua. El Lucifer Yellow al ser altamente soluble en agua, no debe atravesar la membrana por que el agua no pasa por las uniones celulares^[67]; es por ello que si menos del 1% del Lucifer Yellow atraviesa la membrana durante el mismo tiempo experimental en las mismas condiciones, quiere decir que la membrana celular ha mantenido su integridad.^[57]

Transporte de fármacos en membranas celulares y tejidos intestinales.

El transporte de fármacos a través del epitelio intestinal es un proceso dinámico complejo. Este incluye el paso de compuestos a través de varias rutas funcionales en paralelo. (Figura 5)

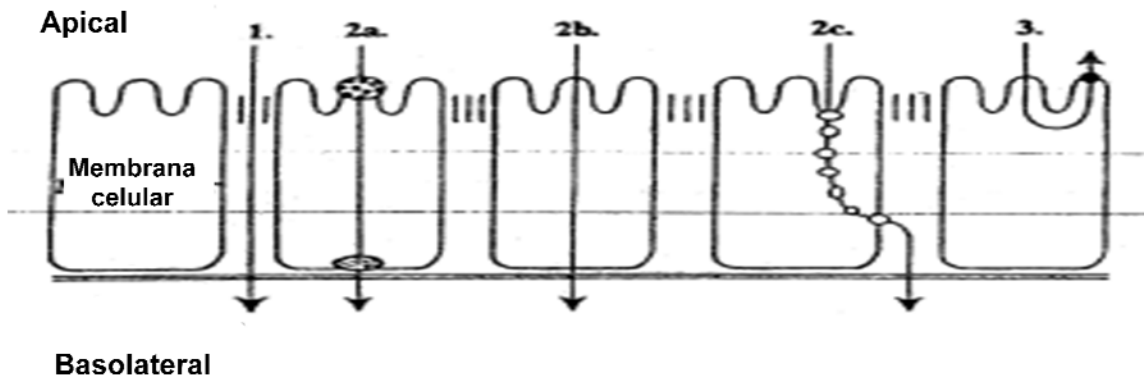


Figura 5: Rutas involucradas en la absorción intestinal (1) Ruta paracelular; (2) Ruta transcelular (2 a) Difusión facilitada mediada por acarreadores; (2b) Difusión pasiva; (2c) Endocitosis mediada por acarreadores; (3) Eflujo mediado por acarreadores^[63]

Difusión simple

Es la forma más utilizada por la mayoría de los fármacos para transportarse en los organismos vivos. Los factores que afectan la velocidad de este proceso son:

- El gradiente de concentración del compuesto en ambos lados de la membrana
- Parámetros que intervienen en la facilidad de movimiento al interior lipofílico de la membrana como:
 - Tamaño molecular
 - Grado de ionización
 - Coeficiente de partición

En este tipo de transporte existen dos rutas:

Paracelular: Esta ruta implica el movimiento del fármaco a través de los espacios intercelulares y representa la principal vía de acceso para muchos fármacos hidrofílicos.

Transcelular: Esta ruta implica el movimiento de la sustancia a través de las membranas celulares y representa la principal vía de acceso para muchos fármacos relativamente lipofílicos.

Transporte activo

Este tipo de transporte se realiza en contra de un gradiente de concentración, es el paso de sustancias desde un medio de poco concentrado a un medio muy concentrado. Para que se lleve a cabo este tipo de transporte es necesario el aporte de energía. Por lo regular se utilizan tres tipos de transportadores:

Uniportadores: Se emplean proteínas que transportan una molécula en un solo sentido a través de la membrana.

Antiportadores: Este mecanismo involucra proteínas que transportan una sustancia en un sentido mientras que simultáneamente transportan otra en sentido opuesto.

Simportadores: Emplea proteínas que transportan una sustancia junto con otra.

Difusión facilitada

Este tipo de transporte no es utilizado por los fármacos ya que es necesario:

- El uso de un acarreador
- Un gradiente de concentración

Por lo tanto no implica un gasto de energía y es un proceso saturable.

Las membranas celulares también pueden emplearse para dilucidar el mecanismo de la permeabilidad. Si se observa que el coeficiente de permeabilidad aparente

aumenta linealmente al aumentar la concentración del fármaco; el transporte no está saturado, si no varía el transporte del fármaco sin importar la dirección del mismo, se puede llegar a la conclusión de que el transporte es pasivo y no activo.

Si el transporte de la parte basolateral a la apical es significativamente mayor que el de la parte apical a la basolateral, es probable que el fármaco este siendo expulsado activamente de las células por un cotransportador de membrana como glicoproteína-P.

Para aclarar si otros transportadores de membrana participan en la absorción, se pueden realizar estudios de inhibición competitiva con inhibidores conocidos para cada transportador.

Para evaluar si un compuesto se absorbe a través de la vía paracelular o de la transcelular, se pueden abrir artificialmente las uniones celulares con sustancias como EDTA; si la permeabilidad aparente del compuesto no se afecta por la apertura de las uniones, se puede suponer que el fármaco se transporta a través de la vía transcelular.^[57]

Células MDCK

Una línea celular se define según el National Cancer Institute como células de un tipo único de origen humano, animal o vegetal que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio principalmente para fines de investigación.

Son células de epitelio renal de perro, aislada en 1958 por S.H. Madin y N.B. Darby de una hembra cocker spaniel cuando la criopreservación aún no se encontraba disponible; es una de las líneas celulares más estudiadas con respecto a genética, composición lipídica, expresión de proteínas y otros parámetros. Posee una morfología epitelial distintiva, características anatómicas y funcionales de células tubulares normales de mamífero como la formación de uniones estrechas y la presencia de microvellosidades. Recientemente se han utilizado para estudios de permeabilidad por que alcanzan la confluencia en membranas de policarbonato en 2 días, alcanzando la fase estacionaria en 7 días con una densidad celular de 5×10^5 células/cm². Es fácil de manejar ya que los experimentos de permeabilidad pueden realizarse entre 7 y 14 días después de inocular las células. ^[55]

HIPÓTESIS

Debido a las características fisicoquímicas de la Casiopeína III-ia[®] como su bajo peso molecular, solubilidad en agua y coeficiente de reparto de 0.35, atravesará la membrana celular mediante difusión pasiva.

O B J E T I V O S

Objetivo general

- Evaluar la permeabilidad aparente de la Casiopeína[®] III-ia en células MDCK.

Objetivos particulares

- Conocer la concentración máxima a la cual la Casiopeína[®] III-ia afecta en forma significativa a las células MDCK.
- Optimizar y validar el método bioanalítico para cuantificar Casiopeína[®] III-ia en solución Salina de Hank (Medio de transporte).
- Desarrollar la metodología para evaluar la permeabilidad aparente de la Casiopeína[®] III-ia en células MDCK.

M E T O D O L O G Í A

Equipo y material

Método de cuantificación

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Technologies 1100
 - Detector UV-Vis de arreglo de diodos (DAD)
 - Sistema de desgasificación en línea
 - Bomba cuaternaria/isocrática
 - Automuestreador
 - Sistema de recolección de datos HP-Chemstation para sistemas Agilent LC y LC/MS
- Columna Symmetry[®] C18 3.5 μ m 4.6x150mm Waters[®]
- Balanza analítica Sartorius
- Equipo de purificación de agua Milli-Q
- Sistema de filtración para disolventes (Equipo de filtración Millipore, membrana Millipore tipo HVLP 0.45 μ m para filtrar solventes orgánicos y tipo HA 0.45 μ m para filtrar solventes acuosos)
- Potenciómetro Thermo Orion Modelo 410
- Espátula Cromo-Níquel
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Viales para equipo cromatográfico color ámbar con tapones y capacidad de 1500 μ L maraca Agilent
- Pipetas automáticas con puntas intercambiables de plástico
- Matraces volumétricos con capacidad de 10 y 1000mL
- Vasos de precipitado (100, 250 y 500 mL)
- Tubos de ensaye
- Gradilla para tubos de ensaye
- Piseta de plástico
- Papel aluminio

Cultivo celular

- Centrífuga Becton Dickinson J 600
- Campana de flujo laminar clase II Telstar mini-V / PCR
- Lector de microplacas Labsystems Multiskan MS
- Fluorometro Perkin Elmer LS 50B
- Incubadora con CO₂ Lab-line
- Microscopio Invertido Iroscope SI-PH
- Refrigerador
- Ultracongelador (-70°C) Revco®
- Vortex
- Microscopio óptico Olympus CH-2
- Bomba de vacío Cole Palmer® L-79200-0
- Agitador oscilatorio LAB-LINE
- Pipeta automática multicanal (20-100 µL)
- Puntas de plástico para pipetas automáticas nuevas y estériles
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- Criotubos
- Termómetro
- Cajas de cultivo de 25 y 75 cm² (Costar)
- Placas de 96 pozos tipo ELISA(Costar)
- Placas con 12 celdas Transwell estériles Corning® No cat. 3401
- Pipetas Pasteur de vidrio estériles
- Gradillas para tubos Falcon
- Pipetas serológicas de 1, 5, 10 y 25 mL (Corning)
- Gradillas para tubos Eppendorf
- Tubos cónicos Falcon de 15mL, 50mL, de propileno, nuevos y estériles
- Sistema de filtración Corning® de 250mL con membrana de acetato de celulosa de .22µm estéril
- Cámara de Neubauer (Marienfeld®)
- Tinajas estériles

- Matraz kitastato con manguera para vacío
- Multímetro digital (Steren)
- Gasas estériles

Reactivos

Método de cuantificación

- Metanol grado HPLC TecnoLab[®]
- Agua desionizada
- Fosfato de sodio monobásico monohidratado J.T Baker[®]
- Fosfato de sodio dibásico anhidro J.T Baker[®]
- Solución reguladora (biftalato) pH 4, Lote H39C19 grado RA, J.T. Baker.
- Solución reguladora (fosfatos) pH 7, Lote H43C08 grado RA, J.T. Baker.
- Solución reguladora (boratos) pH 10, Lote H44C20 grado RA, J.T. Baker.

Cultivo celular

- Agua destilada
- Tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO)
- Tris- base 10mM (pH=10.5)
- Suero fetal bovino SFB (GIBCO)
- Aminoácidos no esenciales (GIBCO)
- Antibióticos (penicilina/estreptomicina) (GIBCO)
- Ácido acético glacial (J.T. Baker)
- Etanol 70%
- Solución de cloruro de benzalconio al 12% (KRITT)
- DMSO concentrado (J.T. Baker)
- Medio de cultivo D-MEM (GIBCO)
 - 4.5 g/L D-Glucosa
 - 110 mg/L piruvato de sodio
 - L-glutamina

- Sulforrodamina B 0.4% (p/V)
- Ácido acético 1%
- Ácido tricloroacético 10%
- Azul tripano 0.4% (GIBCO)
- Sales para preparar 1L de Solución amortiguadora de Hank (MP Biomedical)
 - Cloruro de sodio
 - Dextrosa anhidro
 - Cloruro de potasio
 - Cloruro de calcio dihidratado
 - Sulfato de magnesio anhidro
 - Fosfato de potasio monobásico anhidro
 - Fosfato de sodio dibásico anhidro
 - Rojo de fenol
- Solución inyectable de glucosa al 5 % (Dextrabott)
- HEPES sal de sodio reactivo ultrapuro (J.T.Baker)

Material biológico

- Línea celular MDCK donada por la Dra. Lilián Yépez Mulia de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Laboratorio de Parasitología en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Estándares

- Casiopeína[®] III-ia Lote: 182MBG170106
- Estándar secundario Ketorolaco trometamina
 - Lote: TB07003
 - Pureza 100.75% B.H.
 - Laboratorios Grin
- Lucifer Yellow (Sigma Aldrich)

Preparación de soluciones**Metodología Analítica:****Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH= 8**

Pesar por separado 0.085g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 1.33g de fosfato de sodio dibásico anhidro, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000mL, disolver con agua desionizada llevando a un volumen aproximado de 950mL, ajustar el pH a 8.00 ± 0.05 si es necesario, utilizando NaOH 0.01M o ácido fosfórico 0.01M; una vez ajustado llevar al aforo.

Medio de transporte (solución amortiguadora de Hank adicionado con glucosa 10mM y HEPES 10mM)

Pesar 2.6029 g de HEPES, transferir a un matraz volumétrico de 1000mL, agregar 36 mL de solución inyectable de glucosa 5% y el contenido de un frasco para preparar solución amortiguadora de Hank, disolver con agua desionizada llevando a un volumen aproximado de 900mL, ajustar el pH a 7.4, si es necesario utilizar NaOH 1N ó HCl 1N, una vez ajustado el pH, llevar al aforo.

Solución stock de Casiopeína[®] III-ia en metanol (1mg/mL)

Pesar 0.0100g de Casiopeína[®] III-ia, colocar en un matraz volumétrico de 10mL y llevar al aforo con metanol.

Solución stock de Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte (1mg/mL)

Pesar 0.0100g de Casiopeína[®] III-ia, colocar en un matraz volumétrico de 10mL y llevar al aforo con medio de transporte.

Solución de trabajo de Casiopeína[®] III-ia 10µg/mL en fase móvil

Tomar 100µL de la solución stock de Casiopeína[®] III-ia 1mg/mL, colocar en un matraz volumétrico de 10mL y llevar al aforo con fase móvil.

Solución de trabajo de Casiopeína[®] III-ia 10µg/mL en medio de transporte

Tomar 100µL de la solución stock de Casiopeína[®] III-ia 1mg/mL, colocar en un matraz volumétrico de 10mL y llevar al aforo con medio de transporte.

Solución stock de ketorolaco

Pesar 0.0100g de ketorolaco trometamina, colocar en un matraz volumétrico y llevar al aforo con metanol.

Cultivo celular.

Estudios de toxicidad.

Etanol al 70% para limpieza

Medir 700mL de Alcohol etílico absoluto y llevar a un volumen de 1000mL.

Medio de cultivo suplementado (D-MEM)

En condiciones asépticas, en la campana de flujo laminar, agregar a un frasco de medio de cultivo no suplementado, 50mL de suero fetal bovino, 5mL de aminoácidos no esenciales y 5mL de antibióticos (penicilina-estreptomina), agitar suavemente hasta homogeneizar el medio de cultivo.

Solución stock de Casiopeína[®] III-ia en agua estéril (5µg/µL)

Pesar exactamente 0.00100g de Casiopeína[®] III-ia y llevar a un volumen de 200µL con agua esterilizada previamente.

Ácido tricloroacético al 10%

Medir 50mL de ácido tricloroacético concentrado y llevar a un volumen de 500mL con agua destilada.

Ácido acético al 1%

Medir 10mL de ácido acético glacial y llevar aun volúmen de 1000mL con agua destilada.

Solución de sulforrodamina B al 0.4% (p/v)

Pesar exactamente 1g de sulforrodamina B y llevar a un volumen de 250mL con ácido acético al 1%.

Solución Tris-Base 10mM (pH=10.5)

Pesar exactamente 1.21g de Tris Base, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000mL, disolver con agua destilada llevando a un volumen de aproximado de 950mL; ajustar el pH a 10.5, utilizando NaOH 0.01M o HCl 0.01M, una vez ajustado llevar al aforo.

Ensayo de permeabilidad

Medio de transporte estéril

El medio de transporte se esteriliza en condiciones asépticas, dentro de la campana de flujo laminar; se emplea un sistema de filtración Corning® con una membrana de 0.22µm.

Lucifer yellow (100µg/mL)

Pesar con exactitud 0.00200g de Lucifer Yellow, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 20mL y llevar al aforo con medio de transporte

Procedimiento experimental

Optimización de la metodología analítica

Se toman como base las condiciones cromatográficas reportadas por Huerta Palacios (2008).

Fase móvil: Metanol HPLC: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8 (40:60)

Fase estacionaria: Columna Xterra RP18® Waters, 250x4.6mm, 5µm

Velocidad de flujo: 1mL/min.

Longitud de onda: 296nm

Estándar interno: Metilparabeno 2.5µg/mL

Volumen de inyección: 20µL

Tiempo de corrida: 10 minutos

Probar con distintas condiciones, amentando el volumen de inyección, para observar mayor intensidad de la señal, se varía la velocidad de flujo y la fase estacionaria para disminuir en la medida de lo posible, el tiempo de retención sin que interfiera con las señales de la matriz biológica. Si existe interferencia alguna, se cambia el estándar interno

Para cada condición se utilizan tres soluciones:

- Solución de Casiopeína[®] III-ia 5µg/mL disuelta en fase móvil, preparada a partir de la solución stock de 1mg/mL en metanol.
- Solución de Casiopeína[®] III-ia 5µg/mL, preparada a partir de la solución stock de 1mg/mL en medio de transporte.
- Medio de transporte.

También se prueban las siguientes condiciones:

Fase móvil: Metanol HPLC: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8 (40:60)

Fase estacionaria: Columna Symmetry[®] C18 3.5µm 4.6x150mm Waters[®]

Velocidad de flujo: 0.5mL/min.

Longitud de onda: 296nm

Estándar interno: Ketorolaco 40µg/mL

Volumen de inyección: 50µL

Tiempo de corrida: 15 minutos

Validación

Para la validación del método de cuantificación de Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte, se utilizó la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Se determinan los siguientes parámetros de desempeño:

Validación del sistema

Se evalúa:

- **Linealidad**

En un solo día, se corren tres curvas de Casiopeína[®] III-ia en fase móvil a las siguientes concentraciones:

Tabla 1. Curva de calibración de Casiopeína[®] III-ia disuelta en fase móvil

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (μL)	Solución
12	120	Stock
7	70	Stock
5	50	Stock
1.5	1500	Trabajo
1	1000	Trabajo
0.5	500	Trabajo

A partir de la solución stock de Casiopeína[®] III-ia 1mg/mL disuelta en metanol llevando a un volumen total de 10mL.

Una vez preparadas las 3 curvas de calibración, tomar 500 μL de cada concentración por separado y colocarlos en viales para cromatógrafo y agregar a cada una de las muestras, 20 μL de la solución stock de ketorolaco, la concentración del ketorolaco en el vial es de 40 $\mu\text{g/mL}$.

- **Repetibilidad**

En un solo día y por separado, preparar cinco veces la concentración más alta de la curva (12 $\mu\text{g/mL}$) y antes de procesar las muestras, agregar al vial 20 μL de la solución stock de ketorolaco.

Validación del método analítico

Se evalúa:

- **Selectividad**

Se corren a las condiciones establecidas las siguientes muestras:

- *Blanco de fase móvil*: Metanol: Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01M pH=8.
- *Blanco de disolvente*: medio de transporte (solución amortiguadora de Hank adicionado con glucosa 10mM y HEPES 10mM).
- *Casiopéina en fase móvil*: Casiopéina[®] III-ia 12µg/mL; se toman 120µL de la solución stock 1mg/mL disuelta en metanol y se lleva a un volumen de 10mL con fase móvil.
- *Estándar interno en fase móvil*: Ketorolaco 40µg/mL; se toman 400µL de la solución stock de Ketorolaco y se llevan a un volumen de 10mL con fase móvil.
- *Casiopéina con estándar interno disuelto en medio de transporte*: Casiopéina[®] III-ia 12µg/mL; se toman 120µL de la solución stock 1mg/mL disuelta en medio de transporte y se lleva a un volumen de 10mL con medio de transporte. A 500µL de esta solución se le agregan 20µL de la solución stock de ketorolaco.

- **Linealidad**

En un solo día, se corren tres curvas de Casiopéina[®] III-ia en medio de transporte a las siguientes concentraciones:

Tabla 2. Curva de calibración de Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte

Concentración (µg/mL)	Alícuota (µL)	Solución
12	120	Stock
7	70	Stock
5	50	Stock
1.5	1500	Trabajo
1	1000	Trabajo
0.5	500	Trabajo

A partir de la solución stock de Casiopeína[®] III-ia 1mg/mL disuelta en medio de transporte llevando a un volumen total de 10mL.

Una vez preparadas las 3 curvas de calibración, tomar 500µL de cada concentración por separado y colocarlos en viales para cromatógrafo y agregar a cada una de las muestras, 20µL de la solución stock de ketorolaco, la concentración del ketorolaco en el vial es de 40µg/mL.

- **Precisión**

Se evalúa:

- **Repetibilidad:**

Se preparan en un solo día tres puntos control de Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte por quintuplicado (0.7, 3.0 y 10µg/mL) de forma independiente y se analizan según los parámetros correspondientes.

- **Reproducibilidad**

Preparar de manera independiente y por quintuplicado tres puntos control de Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte (0.7, 3.0 y 10µg/mL) el segundo y el tercer día de

validación y se analizan según los parámetros correspondientes. Es necesario preparar cada día una curva de calibración para interpolar los datos de los puntos control.

- **Estabilidad**

Se realizan tres tipos de estabilidades:

- **Corta**

Preparar muestras de Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte a tres niveles (0.7, 3.0 y 10µg/mL) por triplicado y mantenerlos a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 24 horas, una vez transcurrido el tiempo, analizar.

- **Muestra procesada**

Preparar por triplicado Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte a tres niveles (0.7, 3.0 y 10µg/mL) y colocarlos en el inyector. Realizar una inyección cada 2 horas durante 6 horas.

- **Ciclos de congelación-descongelación**

Preparar muestras de Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte a tres niveles (0.7, 3.0 y 10µg/mL) por triplicado. Se analizan de la siguiente manera:

1. Analizar el día de preparación y congelar la muestra (-20°C)
2. Descongelar a las 24 horas, tomar una alícuota, analizarla y volver a congelar
3. Descongelar a las 48 horas, tomar una alícuota, analizarla y volver a congelar
4. Descongelar a las 72 horas, tomar una alícuota, analizarla y volver a congelar
5. Descongelar a los 7 días, tomar una alícuota, analizar y volver a congelar.

6. Descongelar a los 15 días, tomar una alícuota y analizar
Preparar una curva fresca de Casiopeína[®] III-ia disuelta en medio de transporte el día que se toma la alícuota para interpolar los datos

- **Límite de detección**

Calcular en base a 3 veces el nivel de ruido

- **Límite de cuantificación**

Determinar la mínima concentración que puede ser cuantificada de manera exacta y precisa

Cultivo celular

Descongelamiento de la línea celular

Retirar el criotubo del ultracongelador a -70°C , descongelar con frotación manual de manera paulatina hasta que el hielo inicial luzca como suspensión líquida, una vez descongelado y dentro de la campana de flujo laminar agregar la suspensión celular a un tubo Falcon que contenga 10mL de medio DMEM no suplementado, Centrifugar durante 5 minutos a 1500rpm y desechar el sobrenadante con la ayuda de la bomba de vacío. Resuspender el botón celular con 1mL de medio de cultivo suplementado.

Cuantificación celular

Se colocan 20 μL de suspensión celular y 80 μL de azul tripano en un tubo Eppendorf; una vez mezclado perfectamente se transfieren aproximadamente 20 μL a cada una de las 2 secciones de la cámara de Neubauer. Se cuenta el número de células no teñidas por mm^2 con el objetivo de 10x en los 4 cuadrantes de 16 cuadros cada uno y se realiza un promedio de las células en los 4 cuadrantes Para calcular el número de células por mL se emplea el siguiente cálculo

$$C=N \times 5 \times 10\ 000$$

Donde:

C= células por mL

N= promedio de las células

5= Factor de dilución empleado (20:80)

10 000= factor de conversión de la cámara.

Confluencia y cultivo stock.

Sembrar en cajas de cultivo celular de acuerdo a la capacidad de estas alrededor de 300 000 a 500 000 células, se incuban a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa durante una hora. Una vez transcurrido ese tiempo, cambiar el medio de cultivo. Es necesario revisar diariamente el cultivo

para estimar el porcentaje de confluencia y el desarrollo adecuado de la morfología. Cambiar el medio de cultivo cada 48 horas. Cuando el cultivo alcance del 70- 90% de confluencia tripsinizar.

Disociación celular

Aspirar el medio de cultivo de las cajas de tal forma que no se altere la monocapa de células adherida al fondo de la caja y agregar Tripsina-EDTA 0.25% según la capacidad de la caja (2mL para la caja de 25cm² y 4mL para la caja de 75cm²), incubar a 37°C ± 2°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, dar pequeños golpecitos para favorecer la disociación, observar paulatinamente al microscopio y una vez que las células se encuentran desprendidas y disgregadas individualmente, adicionar 10 mL de medio DMEM no suplementado y agitar vigorosamente. Colocar la suspensión en un tubo Falcon de 15mL y centrifugar a 1500rpm durante 15 minutos. Aspirar el sobrenadante; resuspender el paquete celular en 1mL de medio de cultivo suplementado.

Ensayos de citotoxicidad

Preparar una suspensión celular de una concentración de 7.5x10⁵ células/mL. Agregar 100µL de medio de cultivo suplementado en cada pozo de las placas para cultivo de 96 pozos tipo ELISA, colocar 20µL de la suspensión celular en cada pozo (aproximadamente 15 000 células), incubar a 37°C ± 2°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, aspirar con mucho cuidado el medio de cultivo en cada pozo; adicionar 90 µL de medio de cultivo suplementado fresco y 10µL de las siguientes concentraciones:

A partir de la solución stock de Casiopeína[®] III-ia 5µg/mL en agua estéril preparar las siguientes soluciones: (Las soluciones se preparan 10 veces más concentradas para que en cada pozo la concentración real sea de 1, 3, 5, 10 y 15µg/mL).

Concentración (µg/mL)	Alícuota (µL)	Solución	Volumen de H ₂ O estéril (µL)
150	30	Stock	970
100	20	Stock	980
50	500	100µg/mL	500
30	300	100µg/mL	700
10	100	100µg/mL	900

Es necesario dejar un blanco de proliferación que contenga células con el medio de cultivo suplementado. Se administra en la placa según el siguiente modelo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	1	3	5	10	15	B	1	3	5	10	15
B	B	1	3	5	10	15	B	1	3	5	10	15
C	B	1	3	5	10	15	B	1	3	5	10	15
D												
E	B	1	3	5	10	15	B	1	3	5	10	15
F	B	1	3	5	10	15	B	1	3	5	10	15
G	B	1	3	5	10	15	B	1	3	5	10	15
H												

Figura 6 muestra el esquema de distribución en la administración de Casiopeína[®] III-ia en la placa de 96 pozos.

Una vez adicionada la Casiopeína[®] III-ia, incubar a 37°C ± 2°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante 24 horas exactas. Al término del periodo de incubación, aspirar el medio de cultivo y fijar las células con 100µL de ácido tricloroacético al 10% durante 1h a 4°C, posteriormente lavar con agua destilada y secar a temperatura ambiente.

Tinción con sulforrodamina B

A cada pozo agregar 50µL de la solución de sulforrodamina B al 0.4% e incubar 40 minutos a temperatura ambiente. Lavar 5 veces con una solución de ácido acético al 1% y secar a temperatura ambiente. Al secar la placa por completo, solubilizar el colorante con la solución de Tris Base 10mM durante 5 minutos agitando suavemente. Leer en un detector de microplacas a una longitud de onda de 564nm

CI₅₀

Determinar para cada concentración la capacidad para inducir el 50% de la inhibición de la capacidad proliferativa.

La absorbancia del blanco de proliferación corresponde al 100% Calcular el porcentaje que permanece de células teñidas (vivas) considerando el número de pozos por concentración y el promedio de la respuesta. Se puede utilizar el siguiente cálculo

$$ABS_c \rightarrow 100\%$$

$$ABS_p \rightarrow x \%$$

Donde:

ABS_c= absorbancia promedio del control

ABS_p= absorbancia promedio por concentración

Una vez que se obtienen los resultados de porcentajes de proliferación y concentraciones, se procesan con el programa StatPlus 2007.

Estudio de permeabilidad

Preparación del cultivo celular en las celdas Transwell

En cada celda Transwell colocar aproximadamente 67 200 células en la cámara apical e incubar a 37°C ± 2°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Cambiar el medio de cultivo cada 24 horas hasta el día 5 para realizar el estudio de permeabilidad.

Medición de la Resistencia Transepitelial

A los 3 días de inocular las celdas Transwell, medir la resistencia transepitelial de la siguiente forma:

1. Sustituir el medio de cultivo de cada celda con el medio de transporte.
2. Medir la resistencia transepitelial a través de la monocapa colocando la sonda corta en la solución del inserto y la sonda larga sumergirla en el medio de transporte de la cámara basolateral.

Repetiendo el mismo procedimiento para cada celda y es de suma importancia no tocar el filtro que contiene la monocapa de células para no alterarla una resistencia de $180-250\Omega\text{cm}^2$ se considera óptima.

Estudio de permeabilidad

Transporte Apical-Basolateral (A-B):

Eliminar el medio de transporte de cada celda, adicionar en la parte apical 0.5 mL de la solución de prueba de Casiopeína[®] III-ia y en la parte basolateral 1.5 mL de medio de transporte nuevo a 37 °C. Colocar la placa en agitación orbital a 80 rpm y a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Después de un periodo de 15 min, muestrear de la parte basolateral de la celda.

Transporte basolateral-apical (B-A):

Eliminar el medio de transporte de cada celda, adicionar 1.5 mL de la solución de prueba en la parte basolateral de Casiopeína[®] III-ia y en la parte apical 0.5 mL de medio de transporte nuevo a 37 °C. colocar la placa en agitación orbital a 80 rpm y a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Después de un periodo de 15 min, muestrear de la parte apical.

Emplear soluciones de Casiopeína[®] III-ia 3, 5 y 7µg/mL disuelta en medio de transporte para ambas direcciones. Muestrear a los 15, 30,45, 60 y 90 min.

Al finalizar el estudio de transporte verificar la integridad de la membrana celular.

Integridad de la membrana con Lucifer Yellow

Sin importar la dirección en la que se lleva a cabo el experimento, colocar 0.5 mL de una solución de Lucifer Yellow (100µg/mL) en la parte apical de la celda y 1.5 de medio de transporte nuevo a 37°C. Colocar la placa en agitación orbital a 80 rpm y a 37 °C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa durante 90 min, al finalizar el ensayo, tomar el volumen total de la parte basolateral y leer en un fluorómetro a una longitud de 485nm de excitación y 538nm de emisión.

Las muestras se leen en un fluorómetro localizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el departamento de Neuroquímica del edificio de investigación en neurofisiología con la ayuda de las Dras. Sonia Galván y Christina Trejo.

R E S U L T A D O S

Y

A N Á L I S I S D E R E S U L T A D O S

Optimización de la metodología analítica

Al probar las condiciones reportadas por Huerta Palacios (2008) no se obtiene separación entre las señales de Casiopeína[®] III-ia y el medio de transporte, la señal de estándar interno no está definida y prolonga hasta 19 minutos la corrida.

Al probar las siguientes condiciones:

Fase móvil: Metanol HPLC: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8 (40:60)

Fase estacionaria: Columna Symmetry[®] C18 3.5 μ m 4.6x150mm Waters[®]

Velocidad de flujo: 0.5mL/min.

Longitud de onda: 296nm

Estándar interno: Ketorolaco 40 μ g/mL

Volumen de inyección: 50 μ L

Tiempo de corrida: 15 minutos

Se logra aumentar la respuesta al disminuir las concentraciones con un volumen de inyección de 50 μ L. Con las condiciones establecidas, se obtienen cromatogramas que muestran señales definidas de medio de transporte, Casiopeína[®] III-ia y ketorolaco aislados así como la separación de las señales en combinación. Con el uso de esta fase estacionaria aumenta la resolución de las señales y por lo tanto favorece la selectividad del método. Aunque uno de los puntos críticos del método es el pH de la solución amortiguadora de fosfatos; ya que en un uso continuo a pH =8 puede acortar la vida de la fase estacionaria.

Validación

Cada uno de los parámetros de desempeño, cumplió con los requisitos que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 según los criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia. Arrojando los siguientes resultados:

Validación del sistema

- **Linealidad**

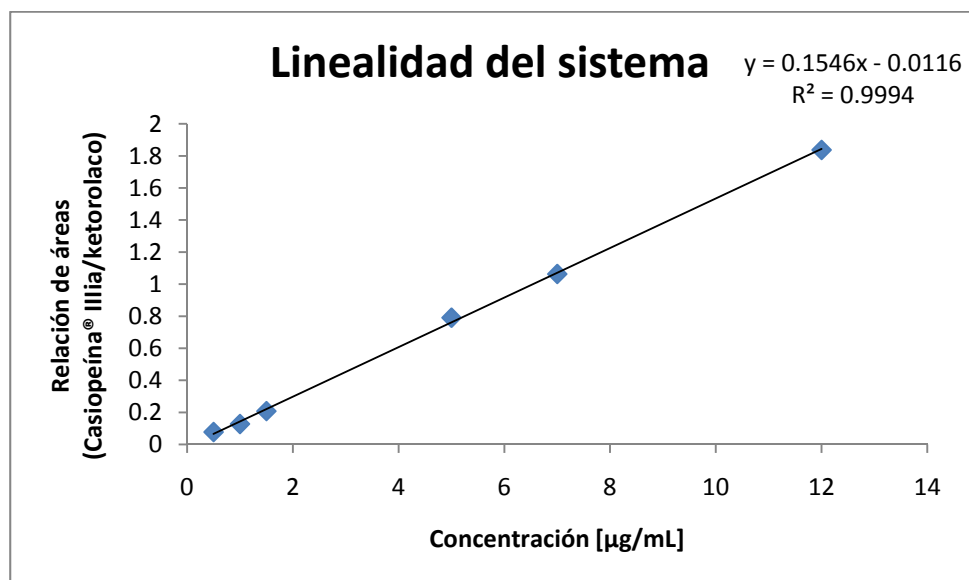


Figura 7.linealidad del sistema desarrollado para cuantificar Casiopeína® III-ia en medio de transporte

Se puede observar en la figura 7 que el sistema muestra proporcionalidad directa entre la concentración y la respuesta relacionando el área de la Casiopeína® III-ia y el área del estándar interno. Mostrando un coeficiente de correlación mayor a 0.99

- **Repetibilidad**

Repetibilidad Casiopeína® III-ia 12µg/mL en fase móvil		
TR	AUC	Concentración real (µg/mL)
5.041	1036.73291	12.88
5.134	1009.56842	12.55
5.224	1015.32611	12.62
5.313	989.65466	12.31
5.384	1009.73468	12.55
	PROMEDIO	12.58
	SD	0.20
	%CV	1.64

Tabla 3. Resultados de repetibilidad obtenidos del procesamiento de los datos de Casiopeína® III-ia 12µg/mL

Se verificó que el %CV de la concentración real de las determinaciones fuera menor al 15% en las 5 muestras preparadas en un solo día.

Con los resultados obtenidos en la validación del sistema, nos permite decir que el sistema cumple con las especificaciones de linealidad y repetibilidad para poder emplearlo con la matriz biológica.

Validación del método analítico

- Selectividad

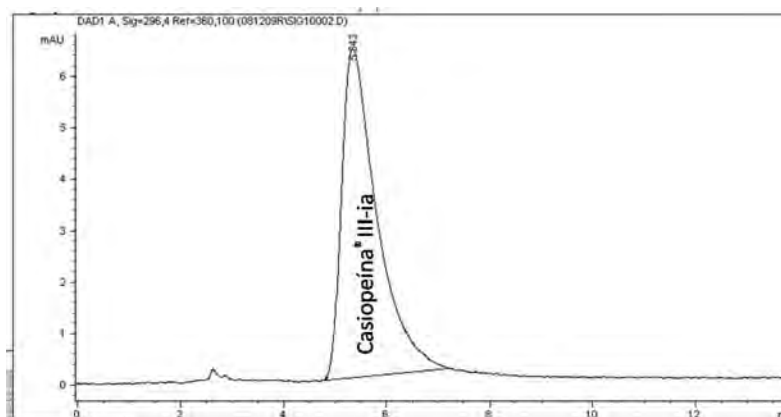


Figura 8. Cromatograma de Casiopeína® III-ia 12µg/mL disuelta en fase móvil $t_r=5.8$ min

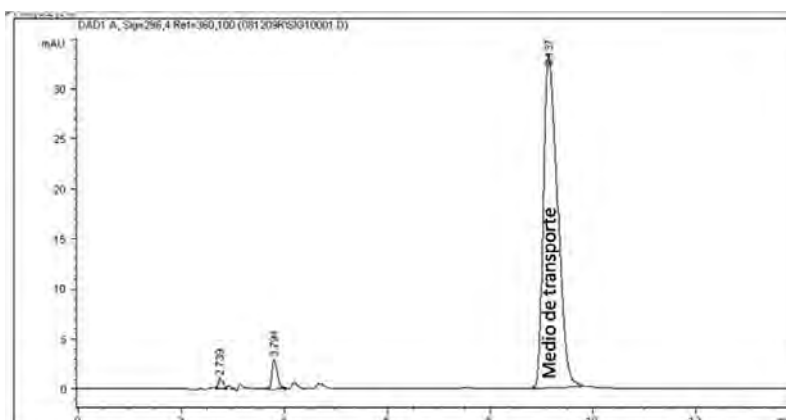


Figura 9. Cromatograma blanco de medio de transporte. $t_r=3.7$ y 9.4 min

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

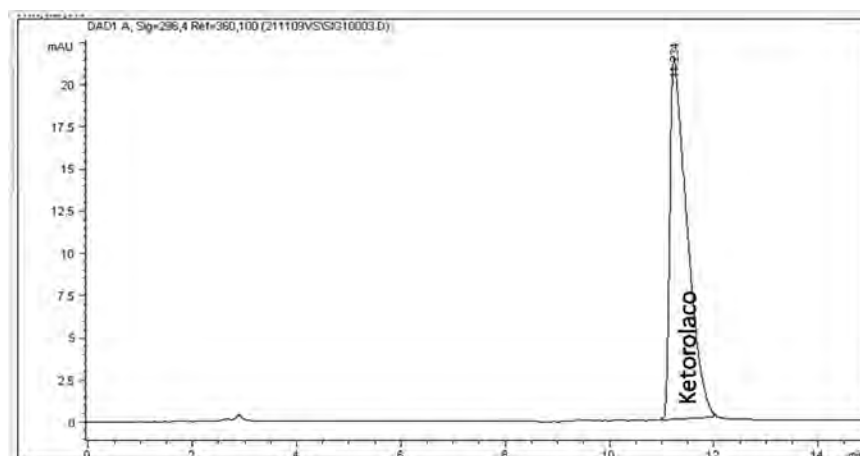


Figura 10. Cromatograma de Ketorolaco 40µg/mL disuelto en fase móvil $t_r=11.2$ min.

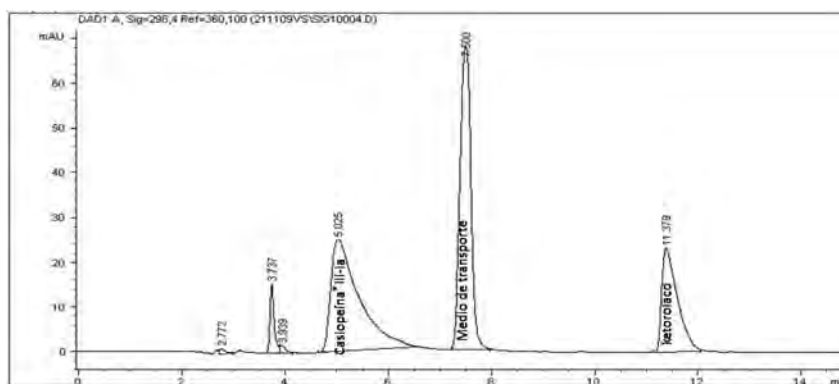


Figura 11. Cromatograma de Casiopeína[®] III-ia 12µg/mL en medio de Transporte y Ketorolaco 40µg/mL como estándar interno.

En las figuras anteriores se muestran los cromatogramas típicos de cada uno de los componentes de la muestra, y se puede apreciar que cada señal tanto de la Casiopeína[®] III-ia y el Ketorolaco se encuentran aisladas y sin interferencias con la señales generadas por el medio de transporte.

Los compuestos evaluados presentan los siguientes tiempos de retención:

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Casiopeína® III-ia 5 min

Ketorolaco 11.2 min

Medio de transporte 3.7 y 9.4 min.

- Linealidad**

Tabla 4. Resultados obtenidos utilizando el método para cuantificar Casiopeína® III-ia en medio de transporte donde R1, R2 y R3 es el cociente del área entre la Casiopeína® III-ia y el Ketorolaco.

Concentración Casiopeína® III-ia. (µg/mL)	R1	R2	R3	PROMEDIO	SD	%CV
0.5	0.0555	0.0504	0.0499	0.0519	0.0031	5.9844
1	0.1380	0.1264	0.1293	0.1312	0.0060	4.5921
1.5	0.2021	0.1967	0.1900	0.1963	0.0061	3.0937
5	0.8605	0.7872	0.7624	0.8033	0.0510	6.3479
7	1.3057	1.1240	1.1048	1.1782	0.1108	9.4085
12	2.1433	1.8846	1.8690	1.9656	0.1540	7.8354
r	0.9992	0.9997	0.9998			
r ²	0.9984	0.9995	0.9997			

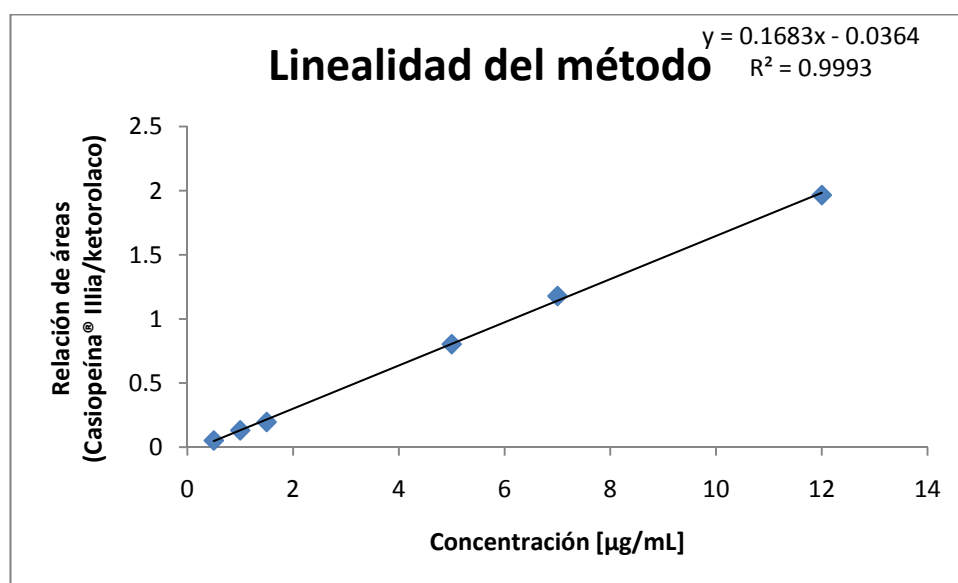


Figura 12. Linealidad del método para cuantificar Casiopeína® III-ia en medio de transporte

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

- **Precisión**
 - **Repetibilidad**

Tabla 5. Resultados obtenidos de los puntos control (0.7, 3 y 10µg/mL) de Casiopeína[®] III-ia en un solo día de análisis

Réplica	Concentración experimental control bajo(µg/mL)	Concentración experimental control medio (µg/mL)	Concentración experimental control alto (µg/mL)
1	0.78	2.96	9.94
2	0.72	2.97	10.01
3	0.78	2.83	9.76
4	0.78	2.82	10.05
5	0.79	2.80	9.63
PROMEDIO	0.77	2.88	9.88
SD	0.03	0.08	0.18
%CV	3.66	2.87	1.81

- **Reproducibilidad**

Tabla 6. Resultados obtenidos de los puntos control (0.7, 3 y 10µg/mL) de Casiopeína[®] III-ia en dos días de análisis

Día de análisis	Réplica	concentración experimental control bajo(µg/mL)	concentración experimental control medio (µg/mL)	concentración experimental control alto (µg/mL)
Día 1	1	0.70	3.00	10.17
	2	0.70	3.14	10.24
	3	0.71	3.00	10.07
	4	0.69	3.04	10.05
	5	0.65	3.00	10.12
Día 2	1	0.72	2.95	10.03
	2	0.69	3.13	9.96
	3	0.71	3.04	10.02
	4	0.68	3.01	10.10
	5	0.69	3.18	9.91
	PROMEDIO	0.70	3.05	10.07
	SD	0.02	0.07	0.10
	%CV	2.70	2.44	0.98

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

- **Estabilidad**

- **Corta**

Tabla 7. Resultados obtenidos al procesar puntos control en medio de transporte; los cuales se procesaron después de permanecer 24 horas a temperatura ambiente protegidos de la luz.

Concentración nominal	Réplica	Concentración experimental (µg/mL)	Concentración recuperada a 24 horas (µg/mL)	% Recobro
0.7	1	0.70	0.67	96.35
	2	0.70	0.69	99.07
	3	0.71	0.70	99.72
	PROMEDIO	0.71	0.69	98.38
	SD	0.01	0.01	
	%CV	1.18	1.82	
3	1	3.00	2.66	88.74
	2	3.14	3.16	105.27
	3	3.00	2.89	96.34
	PROMEDIO	3.05	2.90	96.79
	SD	0.08	0.25	
	%CV	2.61	8.55	
10	1	10.17	9.62	96.15
	2	10.24	9.65	96.47
	3	10.07	9.67	96.68
	PROMEDIO	10.16	9.64	96.43
	SD	0.09	0.03	
	%CV	0.88	0.28	

Las muestras procesadas a las 24 horas presentan un 96% de recobro, por lo tanto un 4% de degradación no es significativo y se declara un resultado satisfactorio; las muestras de Casiopeína® III-ia en medio de transporte se pueden analizar a las 24 horas, siempre y cuando estas se mantengan protegidas de la luz y a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

○ Muestra procesada

Tabla 8. Resultados obtenidos por el procesamiento de los puntos control en medio de transporte expuestos a temperatura ambiente dentro del cromatógrafo

Réplica	Concentración experimental (µg/mL)	Concentración recuperada 2 horas (µg/mL)	% Recobro	Concentración recuperada 4 horas (µg/mL)	% Recobro	Concentración recuperada 6 horas (µg/mL)	% Recobro
1	0.70	0.65	93.40	0.70	99.66	0.71	102.03
2	0.72	0.69	98.04	0.69	98.99	0.71	101.75
3	0.78	0.68	97.76	0.68	97.57	0.69	99.09
PROMEDIO	0.73	0.67	96.40	0.69	98.74	0.71	100.95
SD	0.04	0.02		0.01		0.01	
%CV	5.23	2.70		1.08		1.61	
1	3.00	3.00	99.98	2.95	98.28	3.01	100.28
2	3.14	3.00	99.88	3.13	104.27	3.18	105.85
3	3.04	3.04	101.18	3.04	101.33	3.06	102.00
PROMEDIO	3.06	3.01	100.35	3.04	101.29	3.08	102.71
SD	0.07	0.02		0.09		0.09	
%CV	2.31	0.72		2.96		2.78	
1	10.17	10.24	102.44	10.07	100.65	10.05	100.46
2	10.12	10.13	101.29	10.03	100.28	9.96	99.57
3	10.02	10.10	100.99	9.91	99.07	10.00	100.01
PROMEDIO	10.10	10.16	101.57	10.00	100.00	10.00	100.01
SD	0.08	0.08		0.08		0.04	
%CV	0.79	0.75		0.83		0.45	

Los resultados de la tabla 8 muestran que durante cada intervalo de tiempo de muestreo y en las 6 horas exposición en el cromatógrafo, las muestras no presentan signos de degradación alguna, presentando de 98 a 100% de recobro en los tres niveles por lo que se descarta degradación de las muestras de Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte, por lo que es posible colocarlas desde el inicio de la corrida en el cromatógrafo.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

○ Ciclos congelación-descongelación

Tabla 9a. Resultados de estabilidad en los tres primeros ciclos de congelación- descongelación de Casiopeína® III-ia en medio de transporte expuesto a -20°C.

Réplica	Concentración real (µg/mL)	% Recobro	24 horas		48 horas		72 horas	
			Concentración (µg/mL)	% Recobro	Concentración (µg/mL)	% Recobro	Concentración (µg/mL)	% Recobro
1	0.78	110.90	0.72	102.18	0.59	84.74	0.55	77.86
2	0.72	102.63	0.67	95.24	0.64	91.57	0.53	75.63
3	0.78	111.14	0.72	102.36	0.61	86.56	0.56	79.36
PROMEDIO	0.76	108.23	0.70	99.93	0.61	87.62	0.54	77.62
SD	0.03		0.03		0.02		0.01	
%CV	4.48		4.06		4.04		2.41	
1	2.96	98.76	2.66	88.60	2.43	80.85	2.13	70.97
2	2.97	98.94	2.71	90.49	2.45	81.70	2.09	69.57
3	2.83	94.25	2.64	87.84	2.47	82.35	2.11	70.48
PROMEDIO	2.92	97.32	2.67	88.98	2.45	81.64	2.11	70.34
SD	0.08		0.04		0.02		0.02	
%CV	2.73		1.53		0.92		1.01	
1	9.94	99.36	8.98	89.85	9.06	90.62	7.34	73.39
2	10.01	100.13	9.25	92.45	8.52	85.23	7.05	70.46
3	9.76	97.61	8.98	89.79	8.35	83.53	6.86	68.55
PROMEDIO	9.90	99.04	9.07	90.70	8.65	86.46	7.08	70.80
SD	0.13		0.15		0.37		0.24	
%CV	1.30		1.68		4.28		3.44	

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 9b. Resultados de estabilidad en los últimos ciclos de congelación-descongelación de Casiopeína® III-ia en medio de transporte expuesto a -20°C

Réplica	Concentración real (µg/mL)	% Recobro	7 días		14 días	
			Concentración (µg/mL)	% Recobro	Concentración (µg/mL)	% Recobro
1	0.78	110.90	0.38	54.33	1.03	147.05
2	0.72	102.63	0.38	53.93	0.90	129.03
3	0.78	111.14	0.38	54.67	0.83	119.04
PROMEDIO	0.76	108.23	0.38	54.31	0.92	131.71
SD	0.03		0.00		0.10	
%CV	4.48		0.68		10.78	
1	2.96	98.76	2.43	81.08	3.99	132.98
2	2.97	98.94	2.60	86.72	3.52	117.28
3	2.83	94.25	2.52	83.90	3.19	106.17
PROMEDIO	2.92	97.32	2.52	83.90	3.56	118.81
SD	0.08		0.08		0.40	
%CV	2.73		3.36		11.34	
1	9.94	99.36	8.79	87.89	13.31	133.15
2	10.01	100.13	8.76	87.57	10.84	108.36
3	9.76	97.61	8.77	87.73	13.02	130.20
PROMEDIO	9.90	99.04	8.77	87.73	12.39	123.90
SD	0.13		0.02		1.35	
%CV	1.30		0.18		10.93	

Como se observa en los resultados de la tabla 9a, las muestras de Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte no muestran degradación significativa durante las primeras 24 horas en los tres niveles, mientras que a partir de las 48 horas se observa una degradación paulatina del 13 al 20 % y a las 72 horas se observa una degradación del 30% en los tres niveles. Al comparar los resultados de la tabla 9a y 9b, a los 7 días se observa que hay un aumento en el porcentaje de recobro de Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte en el punto medio y en el punto bajo mientras que disminuye en el punto bajo. A los 14 días se observa un aumento en el porcentaje de recobro en los 3 niveles mucho mayor al de la concentración inicial. Por lo que las muestras de Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte almacenadas a -20°C solo son estables durante las primeras 24 horas, a las 48 horas hay una disminución de la cantidad de Casiopeína[®] III-ia en el medio de transporte en un 20%.

- **Límite de detección**

El área bajo la curva que corresponde al nivel de ruido es de 6.1835 mAU*s; por lo que tres veces el nivel de ruido equivale a 18.5506 e interpolando ese valor en una curva de calibración corresponde a una concentración de 0.44µg/mL.

Como el límite de detección es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.; este método puede detectar hasta una concentración de 0.44µg/mL de Casiopeína[®] III-ia.

- **Límite de cuantificación**

Es la menor concentración de Casiopeína[®] III-ia que puede determinarse con precisión y exactitud en las condiciones establecidas; analizándose la concentración más baja en el intervalo de trabajo (0.5µg/mL)

Tabla 10. Resultados obtenidos del procesamiento por quintuplicado de Casiopeína[®] III-ia 0.5µg/mL en medio de transporte para determinar el límite de cuantificación donde R es el cociente entre el área de la Casiopeína[®] III-ia y el área del Ketorolaco

Réplica	R	Concentración experimental (µg/mL)
1	0.0555	0.59
2	0.0504	0.55
3	0.0499	0.56
4	0.0519	0.57
5	0.0553	0.56
PROMEDIO	0.0526	0.57
SD	0.0027	0.01
%CV	5.0733	2.28

Como se observa en los resultados de la tabla 10, la Casiopeína[®] III-ia se puede cuantificar con exactitud y precisión a 0.5µg/mL

La validación del método es la adecuada y cumple con los criterios de aceptación para un método bioanalítico que establece la NOM-177-SSA1-1998.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 11 Resultados de la validación y criterios de aceptación

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultados
Linealidad del sistema	$r^2=0.99$	$r^2=0.9994$
Repetibilidad del sistema	$\%CV \leq 2\%$	$\%CV= 1.6419\%$
Linealidad del método	$r^2=0.99$	$r^2=0.9993$
Repetibilidad del método	$\%CV \leq 15\%$	$\%CV$ de 1.8 -3.6 %
Reproducibilidad del método	$\%CV \leq 15\%$	$\%CV$ de 0.98-2.7%
Estabilidad corta	$DEA \leq 15\%$	DEA del 2 al 4%
Estabilidad muestra procesada	$DEA \leq 15\%$	DEA menor al 5%
Estabilidad ciclo de congelación-descongelación	$DEA \leq 15\%$	DEA menor al 15% hasta las 72 horas.
Límite de detección	No necesario	0.44 μ g/mL
Límite de cuantificación	$\%CV \leq 20\%$	0.57 \pm 5.07%

Según los resultados de la tabla 11 y al comparar los criterios de aceptación con los resultados, la mayoría de los parámetros cumple con lo establecido exceptuando la estabilidad de los ciclos de congelación-descongelación después de las 72 horas donde se degrada la muestra con mayor velocidad y al finalizar el periodo de exposición aumenta la concentración inicial.

Ensayos de citotoxicidad

En la figura 13 se muestra un ejemplo de las placas de 96 pozos en donde se observa la coloración de sulforrodamina B y como se modifica respecto a la concentración del fármaco aplicado; cuando hay una mayor concentración del fármaco, disminuye la proliferación celular y por lo tanto se presenta una coloración menor respecto al control donde las células crecen normalmente sin tratamiento alguno.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

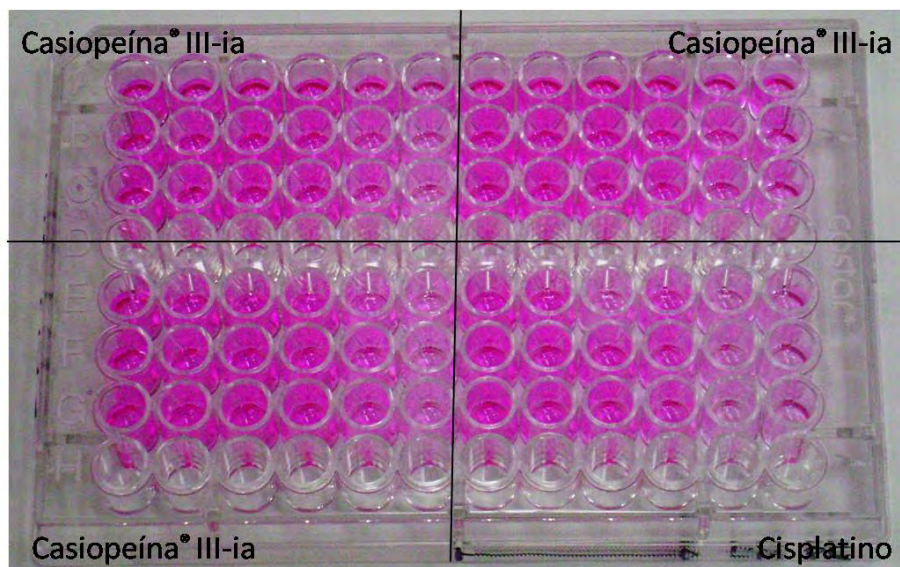


Figura 13. Placa de 96 pozos teñida con sulforrodamina B distribuidas en 4 cuadrantes independientes en los cuadrantes del 1 al 3 tratados con Casiopéina® III-ia y en el cuadrante 4 Cisplatino

Como se muestra en la figura 13, la placa teñida con sulforrodamina B, presenta una tendencia de decoloración al aumentar la concentración del fármaco aplicado. La sulforrodamina B es un colorante aniónico de color rosa intenso, que disuelto en ácido acético, con dos grupos sulfónicos permite la unión electrostática de aminoácidos básicos pertenecientes a las proteínas que se fijaron con ácido tricloroacético al 10% por lo que el porcentaje de las células teñidas corresponde al número de células que permanecen vivas a las 24 horas de administrar el fármaco relacionando directamente la absorbancia del colorante con la supervivencia celular.

Al procesar la placa en el lector de microplacas, se obtiene la absorbancia de cada pozo, los cuales se promedian y se determina el porcentaje de inhibición celular tomando como el 100% la absorbancia del control negativo; los resultados correspondientes se muestran en la tabla 12.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 12. Porcentaje de inhibición celular con la línea MDCK aplicando Casiopeína® III-ia

Concentración en pozo (µg/mL)	Porcentaje de inhibición celular														PROMEDIO	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
1	100	100	100	91.7	92.9	100	92.4	100	100	100	100	100	100	90.1	97.7	3.90
3	94.8	100	100	92.5	94.2	99	84.8	100	100	100	100	97.6	100	82.2	96.1	5.92
5	90.9	99.8	88.1	89.8	84.5	86.5	82.2	100	100	100	100	92.1	100	80.6	92.5	7.39
10	44.5	50.3	62.3	44.5	34	57.2	45	82.5	84.2	95.2	81.7	76.2	80.8	57.3	64.0	19.15
15	28.8	29.7	34.4	28.8	25.1	35.4	22.6	74	73	63.6	63.6	72.8	72.3	61.3	49.0	21.01

Al relacionar el promedio del porcentaje de la inhibición celular, se hace evidente la disminución de la absorbancia en relación directa con el aumento de la concentración de la Casiopeína® III-ia lo que puede observarse en la figura 14.

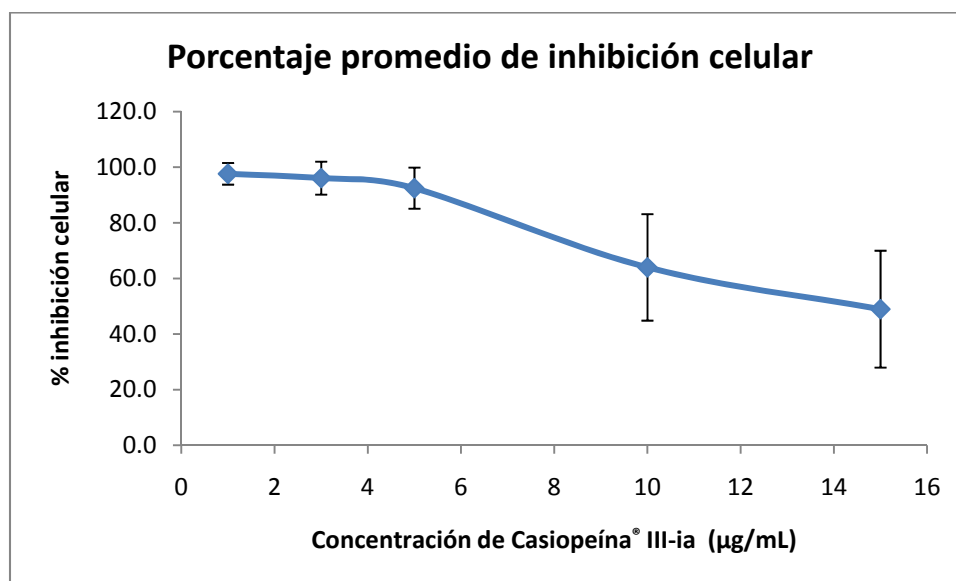


Figura 14. Gráfica de inhibición celular con la línea MDCK aplicando Casiopeína® III-ia

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al relacionar la tabla 12 con la figura 14, se demuestra la relación directa entre el porcentaje de inhibición celular y la concentración de fármaco administrado y la desviación estándar del porcentaje de inhibición celular para cada concentración.

CI₅₀

Al procesar los resultados del porcentaje de inhibición celular en el programa StatPlus 2007 se obtiene que la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de Casiopeína® III-ia en células MDCK es de $13.9 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$.

En el programa StatPlus 2007 se realiza un análisis probit obteniendo la gráfica de la figura 15.

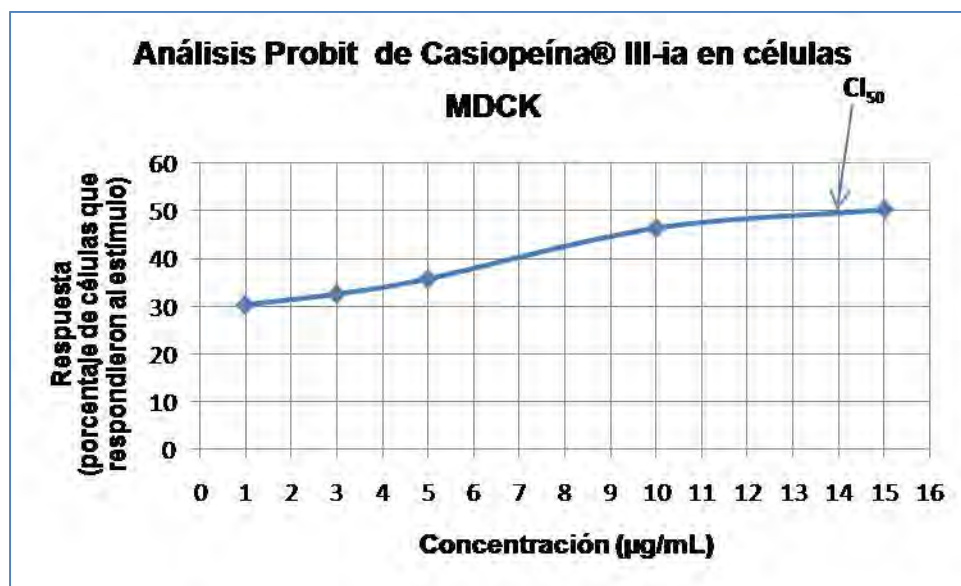


Figura 15. Gráfica correspondiente al análisis Probit de Casiopeína® III-ia en células MDCK

La figura 15 relaciona gráficamente el porcentaje de células que responden al estímulo con la concentración de Casiopeína® III-ia administrada se señala con una flecha el lugar donde se interpola el 50% de las células que

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

responden al estímulo proporcionando la concentración inhibitoria media de Casiopeína[®] III-ia en la línea celular.

Estudios de permeabilidad

En las siguientes tablas (13, 14, 15, 16, 17 y 18) se presenta la concentraciones de Casiopeína[®] III-ia en los diferentes tiempos de muestreo. En los estudios de transporte se emplean 4 insertos para cada una de las direcciones del estudio (Apical-Basolateral y Basolateral-Apical.). En el estudio de transporte, se emplean 3 concentraciones, en este caso 7, 5 y 3 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 13. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en el estudio de transporte en dirección apical-basolateral. Colocándose una concentración de 7 $\mu\text{g/mL}$ en la cámara apical

Tiempo (min)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)				PROMEDIO	SD
	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4		
15	0.73	0.77	0.83	0.80	0.78	0.04
30	0.92	0.94	0.97	0.95	0.94	0.02
45	1.05	1.07	1.03	1.02	1.04	0.03
60	0.97	0.92	1.02	0.98	0.97	0.04
90	1.09	1.14	1.10	1.24	1.14	0.07

Tabla 14. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en el estudio de transporte en dirección apical-basolateral. Colocándose una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ en la cámara apical

Tiempo (min)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)				PROMEDIO	SD
	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4		
15	0.64	0.65	0.65	0.68	0.66	0.02
30	0.78	0.77	0.80	0.77	0.78	0.01
45	0.82	0.84	0.87	0.87	0.85	0.03
60	0.81	0.87	0.85	0.83	0.84	0.02
90	0.86	0.89	0.90	0.84	0.87	0.03

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 15. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en el estudio de transporte en dirección apical-basolateral. Colocándose una concentración de 3 µg/mL en la cámara apical

Tiempo (min)	Concentración (µg/mL)				PROMEDIO	SD
	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4		
15	0.61	0.59	0.57	0.58	0.59	0.01
30	0.64	0.66	0.65	0.65	0.65	0.01
45	0.69	0.68	0.65	0.68	0.67	0.02
60	0.67	0.68	0.66	0.69	0.68	0.02
90	0.70	0.65	0.69	0.66	0.68	0.02

Tabla 16. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en el estudio de transporte en dirección basolateral-apical. Colocándose una concentración de 7 µg/mL en la cámara basolateral

Tiempo (min)	Concentración (µg/mL)				PROMEDIO	SD
	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4		
15	1.27	1.31	1.43	1.37	1.35	0.07
30	1.25	1.21	1.24	1.28	1.25	0.03
45	1.00	1.12	1.19	1.10	1.10	0.08
60	1.04	0.99	1.24	1.19	1.12	0.12
90	1.59	1.62	1.63	1.53	1.59	0.05

Tabla 17. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en el estudio de transporte en dirección basolateral-apical. Colocándose una concentración de 5 µg/mL en la cámara basolateral

Tiempo (min)	Concentración (µg/mL)				PROMEDIO	SD
	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4		
15	1.05	1.13	1.07	1.11	1.09	0.04
30	0.99	0.97	0.96	1.03	0.99	0.03
45	0.98	0.94	0.88	0.93	0.93	0.04
60	0.94	1.02	0.96	0.98	0.98	0.03
90	1.40	1.32	1.45	1.33	1.37	0.06

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 18. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en el estudio de transporte en dirección basolateral-apical. Colocándose una concentración de 3 µg/mL en la cámara basolateral

Tiempo (min)	Concentración (µg/mL)				PROMEDIO	SD
	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4		
15	0.77	0.88	0.86	0.82	0.83	0.05
30	0.81	0.79	0.80	0.81	0.80	0.01
45	0.72	0.73	0.72	0.74	0.73	0.01
60	0.75	0.71	0.81	0.74	0.75	0.04
90	0.95	1.01	1.07	1.00	1.01	0.05

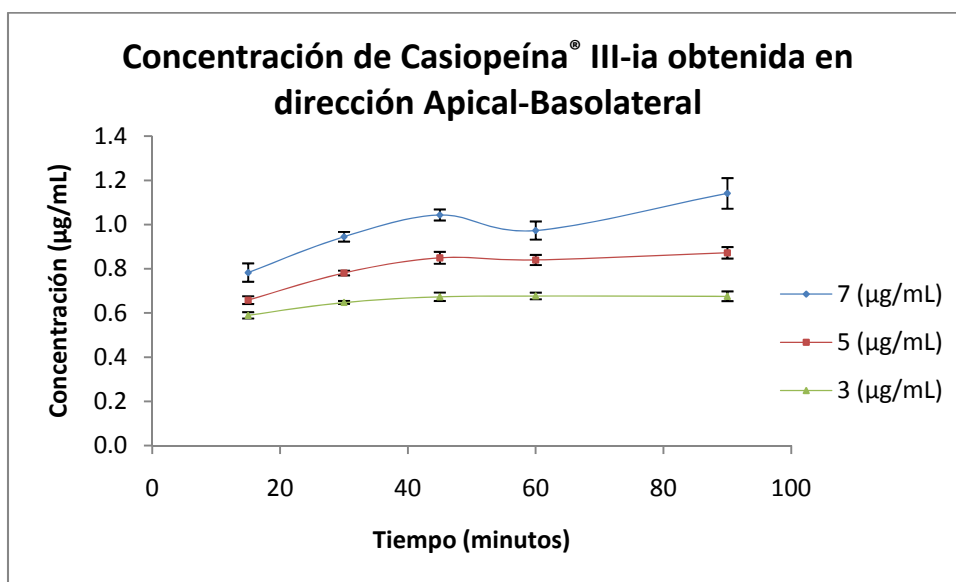


Figura 16. Concentración de Casiopeína[®] III-ia obtenida en dirección apical-basolateral

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

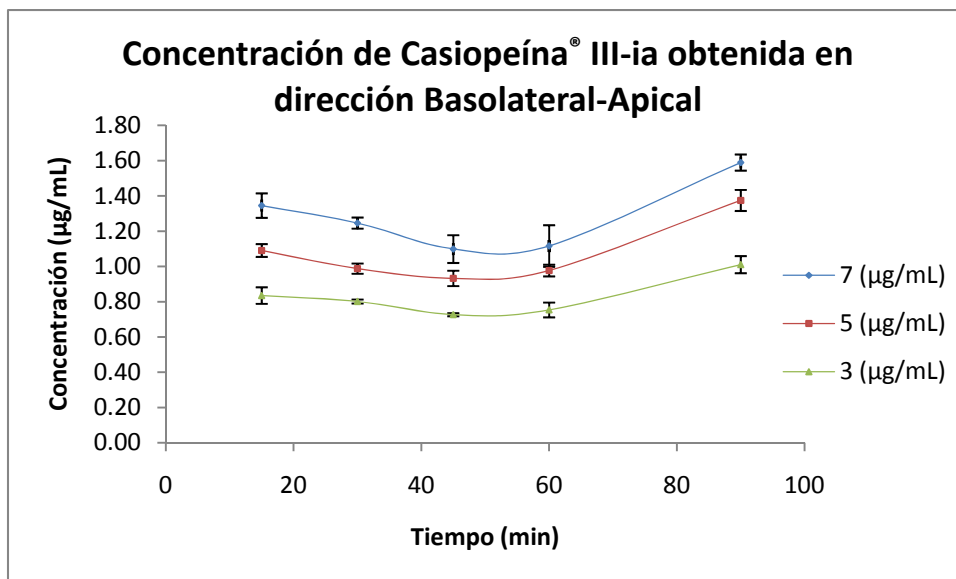


Figura 17. Concentración de Casiopeína® III-ia obtenida en dirección basolateral-apical

Como en el paso a través de membrana no corresponde a una pendiente, para obtener la constante de velocidad de difusión, se procede a calcular la cantidad total transportada en cada intervalo de tiempo. Como se observa la tendencia en la figura 16 y 17, el transporte se satura a los 45 minutos; mostrando un aumento o disminución de la concentración dependiendo de la dirección del estudio a los 60 minutos lo que indica que probablemente a ese tiempo se activen algunos transportadores presentes en la membrana celular como la glicoproteína P.

Tabla 19. Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia en cada intervalo de tiempo en dirección apical-basolateral. Colocándose una concentración inicial de 7 µg/mL en la cámara apical

Tiempo (min)	inserto 1	inserto 2	inserto 3	inserto 4	PROMEDIO	SD	%CV
0	0	0	0	0	0	0	0
15	1.10	1.16	1.25	1.20	1.17	0.06	5.30
30	1.98	2.06	2.14	2.09	2.07	0.07	3.25
45	2.95	3.04	3.04	2.98	3.00	0.05	1.50
60	3.71	3.71	3.89	3.77	3.77	0.09	2.30
90	4.69	4.80	4.86	4.98	4.83	0.12	2.49

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 20. Cantidad acumulada de Casiopeína[®] III-ia en cada intervalo de tiempo en dirección apical-basolateral. Colocándose una concentración inicial de 5 µg/mL en la cámara apical

Tiempo (min)	inserto 1	inserto 2	inserto 3	inserto 4	PROMEDIO	SD	%CV
0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.96	0.98	0.98	0.98	0.98	0.01	0.90
30	1.71	1.70	1.74	1.74	1.72	0.02	1.14
45	2.41	2.45	2.52	2.52	2.47	0.05	2.12
60	3.09	3.19	3.21	3.21	3.17	0.06	1.80
90	3.83	3.94	3.99	3.99	3.94	0.08	1.93

Tabla 21. Cantidad acumulada de Casiopeína[®] III-ia en cada intervalo de tiempo en dirección apical-basolateral. Colocándose una concentración inicial de 3 µg/mL en la cámara apical

Tiempo (min)	inserto 1	inserto 2	inserto 3	inserto 4	PROMEDIO	SD	%CV
0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.91	0.88	0.86	0.88	0.88	0.02	2.44
30	1.47	1.48	1.45	1.46	1.46	0.01	0.82
45	2.07	2.06	1.98	2.05	2.04	0.04	1.88
60	2.62	2.63	2.54	2.63	2.61	0.04	1.72
90	3.22	3.15	3.14	3.17	3.17	0.04	1.16

Tabla 22. Cantidad acumulada de Casiopeína[®] III-ia en cada intervalo de tiempo en dirección basolateral-apical. Colocándose una concentración inicial de 7 µg/mL en la cámara basolateral

Tiempo (min)	inserto 1	inserto 2	inserto 3	inserto 4	PROMEDIO	SD	%CV
0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.64	0.66	0.71	0.69	0.67	0.03	5.15
30	1.26	1.26	1.34	1.33	1.30	0.04	3.22
45	1.76	1.82	1.93	1.88	1.85	0.07	4.02
60	2.28	2.31	2.55	2.47	2.40	0.13	5.36
90	3.07	3.12	3.36	3.23	3.20	0.13	4.04

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 23. Cantidad acumulada de Casiopeína[®] III-ia en cada intervalo de tiempo en dirección basolateral-apical. Colocándose una concentración inicial de 5 µg/mL en la cámara basolateral

Tiempo (min)	inserto 1	inserto 2	inserto 3	inserto 4	PROMEDIO	SD	%CV
0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.52	0.57	0.54	0.55	0.55	0.02	3.33
30	1.02	1.05	1.02	1.07	1.04	0.03	2.40
45	1.51	1.52	1.46	1.53	1.51	0.03	2.29
60	1.98	2.03	1.94	2.02	1.99	0.04	2.19
90	2.68	2.69	2.66	2.69	2.68	0.01	0.53

Tabla 24. Cantidad acumulada de Casiopeína[®] III-ia en cada intervalo de tiempo en dirección basolateral-apical. Colocándose una concentración inicial de 3 µg/mL en la cámara basolateral

Tiempo (min)	inserto 1	inserto 2	inserto 3	inserto 4	PROMEDIO	SD	%CV
0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.39	0.44	0.43	0.41	0.42	0.02	5.64
30	0.79	0.83	0.83	0.81	0.82	0.02	2.21
45	1.15	1.20	1.19	1.18	1.18	0.02	1.70
60	1.53	1.55	1.60	1.55	1.56	0.03	1.84
90	2.01	2.06	2.13	2.05	2.06	0.05	2.56

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

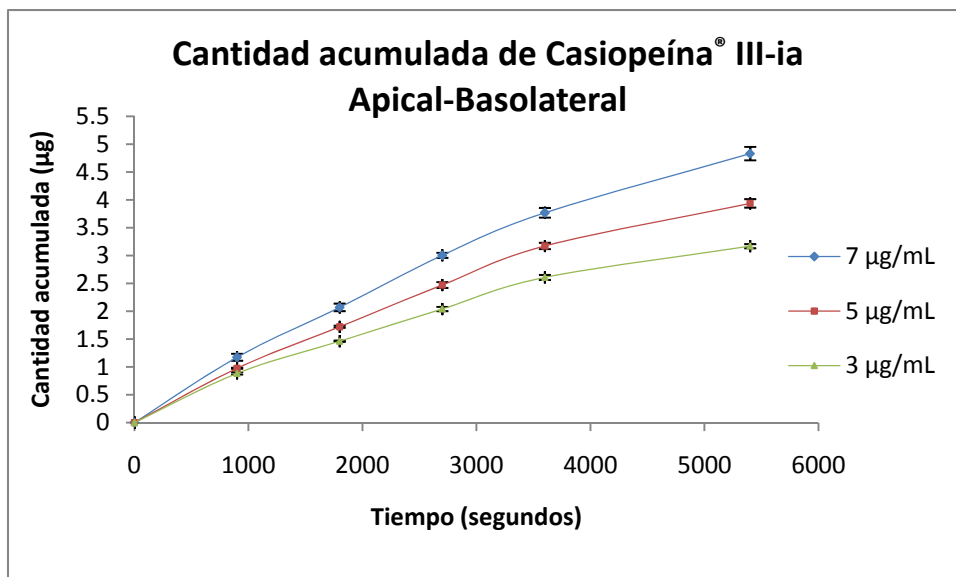


Figura 18. Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia determinado en dirección Apical-Basolateral

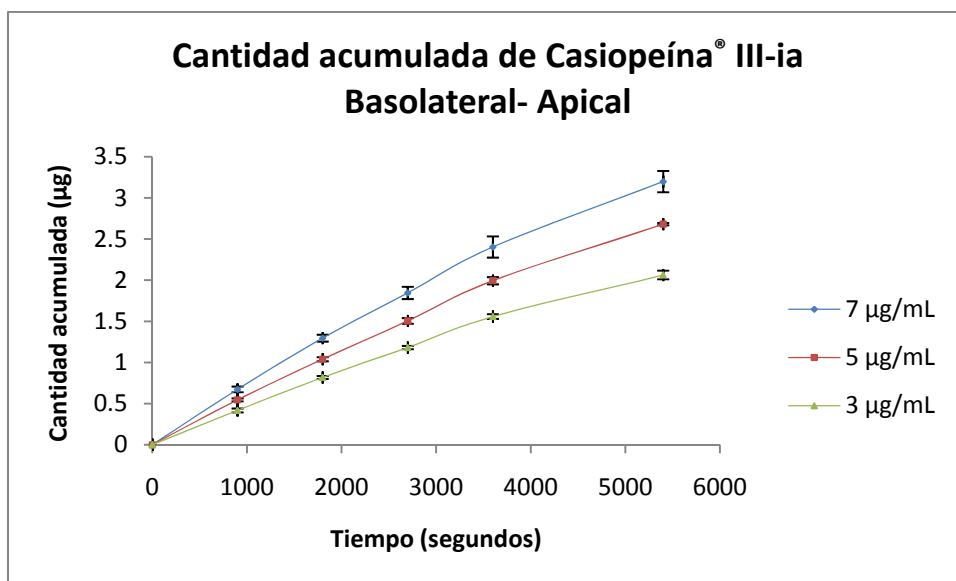


Figura 19. Cantidad acumulada de Casiopeína® III-ia determinado en dirección Basolateral-Apical

Con los resultados de las gráficas correspondientes a la cantidad acumulada en ambas direcciones (figura 18 y 19), se obtiene la velocidad de difusión del fármaco (dQ/dt) calculando la pendiente de cada una de las concentraciones y con la ecuación mencionada en la metodología obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 25. Coeficientes de permeabilidad aparente (Papp) de Casiopeína® III-ia

Concentración administrada (µg/mL)	Papp (x10⁻⁵cm/s) Apical-Basolateral	Papp (x10⁻⁵cm/s) Basolateral-Apical
7	11.49	7.6
5	12.95	9.25
3	18.17	12.11

Los resultados de la tabla 25 muestran que el coeficiente de permeabilidad aparente, se ve afectado por la concentración; se observa que al administrar una concentración mayor de Casiopeína® III-ia, disminuye el coeficiente de permeabilidad aparente.

Para identificar la posible presencia de mecanismos de transporte activo para los compuestos en la línea celular, se determinó el valor de la relación de transporte Basolateral-Apical/Apical-Basolateral cuyos resultados se muestran en la tabla 24.

Tabla 26. Relación del Papp en las cinéticas de ambas direcciones de Casiopeína® III-ia

Concentración administrada (µg/mL)	Relación Basolateral-Apical/ Apical-Basolateral	Relación Apical-Basolateral/ Basolateral-Apical
7	0.6667	1.5
5	0.7143	1.4
3	0.6667	1.5

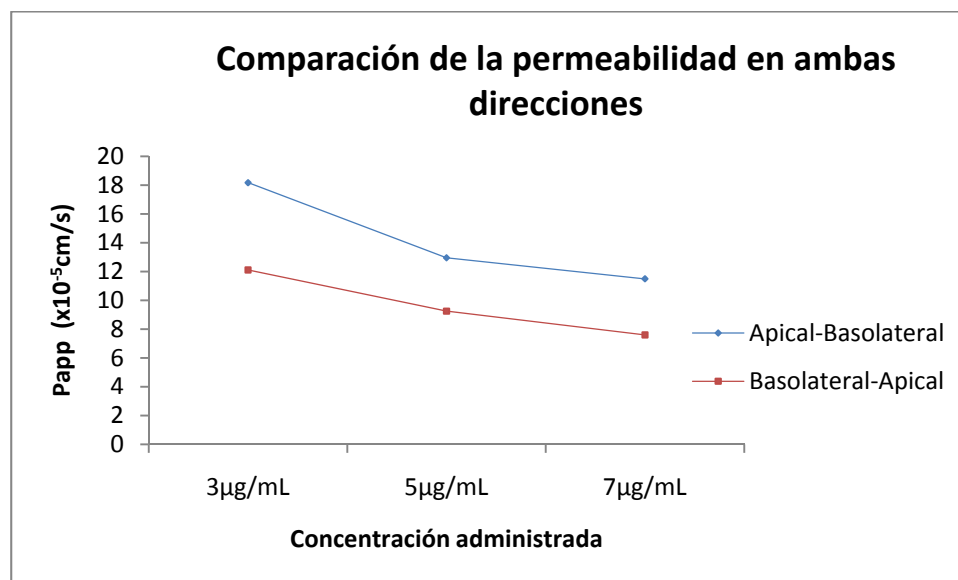


Figura 20. Gráfica de comparación de la permeabilidad aparente en dirección Apical-Basolateral Vs. Basolateral-Apical

La membrana gastrointestinal está compuesta de una capa de mucus, una capa de células estratificada y por células formando criptas intestinales, las cuales aumentan el área de absorción de fármacos. Para el caso de la línea celular MDCK, que morfológicamente es muy parecida estructuralmente pero no fisiológicamente a las células que componen el tracto gastrointestinal, al comparar los valores de permeabilidad aparente que se muestran en la tabla 25, con los valores que algunos autores reportan^[66] del coeficiente de permeabilidad aparente y se pueden correlacionar con la permeabilidad en humanos de la siguiente manera:

Compuestos con un $P_{app} \leq 0.1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ son compuestos que se absorben pobremente (0-20%)

Compuestos con un P_{app} entre 0.1 y $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ son compuestos que se absorben moderadamente (20-70%)

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Compuestos con un $Papp \geq 1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ son compuestos que se absorben bien (70-100%)

Esto ubica a la Casiopeína[®] III-ia en compuestos que se absorben bien entre un 70 y 100%.

Con la finalidad de determinar si existe algún mecanismo de transporte diferente a la difusión pasiva, involucrado en el transporte de estos compuestos a través de la línea celular MDCK, se determinó la relación entre el $Papp$ calculado entre las dos cinéticas Basolateral-Apical/Apical-Basolateral. Se considera que si existe una relación de más de tres magnitudes, en la cinética de transporte de los compuestos, entonces existe un mecanismo de transporte en el paso a través de membrana de los compuestos. Si $B-A/A-B = 3$ entonces existe un proceso de reflujó del compuesto a través de la línea celular, provocado por alguno de los transportadores existentes en la membrana basolateral de la línea celular. Además si $A-B/B-A = 3$ entonces existe un proceso de transporte activo involucrado en el transporte del compuesto hacia el lado basolateral de la línea celular MDCK provocado por algún transportador localizado en la membrana apical de las células.

Con respecto a lo anterior y los resultados de la tabla 26, fueron menores a 3, por lo que no existe ningún proceso de transporte activo involucrado en el paso a través de membrana de la Casiopeína[®] III-ia. Lo cual indica que la Casiopeína[®] III-ia atraviesa la membrana por un proceso de difusión pasiva.

Es de gran importancia considerar que aunque el modelo de la monocapa de la línea celular MDCK nos proporciona información a cerca de la permeabilidad de Casiopeína[®] III-ia, nos da una idea de cómo puede ser la distribución del fármaco en el organismo.

C O N C L U S I O N E S

- Se logró optimizar y validar la metodología para cuantificar Casiopeína[®] III-ia en medio de transporte cumpliendo con los parámetros de desempeño que establece la NOM-177-SSA1-1998.
- Mediante estudios de toxicidad aguda, analizando los resultados mediante un análisis Probit se logró conocer la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de Casiopeína[®] III-ia en células MDCK que fue de 13.9± 0.15µg/mL.
- Se desarrolló una metodología adecuada para la evaluación de la permeabilidad aparente de Casiopeína[®] III-ia en células MDCK, realizando el ensayo en dirección Apical-Basolateral y Basolateral-Apical, al calcular el coeficiente de permeabilidad aparente para cada dirección y comparándolas en relación Basolateral-Apical/Apical-Basolateral, y Apical-Basolateral/Basolateral-Apical se puede decir que el transporte de Casiopeína[®] III-ia se lleva a cabo mediante difusión pasiva ubicándola en compuestos que se absorben bien, entre un 70 y un 100% por lo que se puede clasificar como un fármaco permeable.
- Los resultados comprueban la hipótesis de que la Casiopeína[®] III-ia atraviesa la membrana celular mediante difusión pasiva favoreciendo la distribución de la misma en el organismo al administrarse por vía intraperitoneal.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Macdonald F., Ford C.H. , Casson A.G. *Molecular Biology of Cancer*. Advanced Text. Ed. BIOS Scientific Publishers, (2004)
- [2] Alberts, B. Johnson, A. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Ed. Garland Science. 4a edición. EUA. 2002. Capítulo 23
- [3] Mc Gregor, D. Carcinogenicity. En *Fundamental Toxicology for Chemists*. Editado por Duffus, J.H., Worth, G.J The Royal society of Chemistry. UK. 1996, 90-99.
- [4] López-Lara Martín Francisco, González San Segundo Carmen, Santos Miranda Juan Antonio, Sanz Rubiales Álvaro. *Manual de oncología clínica*. Valladolid, España 1999, Págs. 13-28
- [5] *El cáncer, epidemiología, etiología y prevención*. Madrid España: ediciones Hercort and Elsevier science imprit, 2002
- [6] Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena edición México: Mc Graw Hill Interamericana, 1996. Sección X. Vol. II
- [7] Kendrick, Maureen. *Metals in Biological System* Ed.Ellis Horwood limited Great Britain 1992.
- [8] Casas, J. Sergio. *Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis. Madrid España 2002
- [9] Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR), Toxicological profiles for copper 2004, Atlanta G: A. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Source <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles> (mayo 2009)

- [10] Stoeppler, RFM Herber and. *Trace element analysis in Biological specimens* Ed. Elsevier. Netherlands, 1994. Vol. 15 Techniques and instrumentation in analytical chemistry.
- [11] Schewederski, Wolfgang Kavin and Brigthe. *Bioinorgánica chemistry inorganic element in the Chemistry of life and introduction and guide*. Ed. Inorganic Chemistry a Textbook series by Wiley and sons, 1994 Chapter 10.
- [12] Komatsu, Yutaka. *Excretion of copper complexed with thiomolybdate into the bile and blood in LEC rats*. Chemical Biological Interaction 124, 2000 Págs. 217-231.
- [13] Mark Title[®]: CASIOPEINA. Reg. 407543 SECOFI. 1992.
- [14] J.J.R. Fraústo da Silva, R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements– The Inorganic Chemistry of Life*, Oxford University Press, Oxford, 1991.
- [15] A.W. Ruili Huang, David G. Covell, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 1009–1039.
- [16] S.P. Fricker, *Metal Compounds in Cancer Therapy*, Chapman & Hall, London, 1994.
- [17] L.M. Gaetke, C.K. Chow, *Toxicology* 189 (2003) 147–163.
- [18] L. Ruiz-Azuara, United States Patent 1992, vol. RE 35,458, February 18, 1997.
- [19] L. Ruiz-Azuara, United States Patent 1996, vol. 5,576,326.
- [20] W.A.E. McBryde, D.A. Brisbin, H. Irving, *J. Chem. Soc.* (1962) 5245–5253.

- [21] H.I.a.D.H. Mellor, J. Chem. Soc. (1962) 5237–5245.
- [22] H.I.a.D.H. Mellor, J. Chem. Soc. (1962) 5222–5237.
- [23] M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sasano, H. Shindo, M. Palaniandavar, W.E. Antholine, J. Inorg. Biochem. 89 (2002) 163–173.
- [24] L. Gasque, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, J. Inorg. Biochem. 48 (1992) 121–127.
- [25] W.L. Kwik, K.P. Ang, G. Chen, J. Inorg. Nucl. Chem. 42 (1980) 303–313.
- [26] A. Alvarez-Larena, J.L. Briansó-Penalva, J.F. Piniella, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Ferrer-Sueta, Acta. Crystallogr. C 51 (1995) 852–854.
- [27] L. Ruiz-Azuara. *Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agent*. U.S. Patent. April 21 (1992) Number 5, 107,005. U.S. Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997)
- [28] L. Ruiz-Azuara. *Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methyl phenanthroline complexes to be used as anticancerigenic agent*. U.S. Patent. Pat. No. 5,576,326. November 19 (1996).
- [29] L.Gasque, L. Ruiz-Ramirez. R. Moreno-Esparza *Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10 phenanthroline*, Journal of Inorganic Biochemistry, 48 (2) 121, 1992.
- [30] I Gracia Mora, L. Ruiz Ramírez, C. Gómez Ruiz, M. Tinoco Méndez, et al *Knigt's Move in the Periodic Table, from Platinum to Copper. New anticancer*

compounds, Casiopeínas [®], *In vitro evaluation*. Metal based Drugs. 8. (1) 19-28 2001.

[31] C. Trejo-Solis, G. Palencia, S. Zuniga, A. Rodriguez-Ropon, L. Osorio-Rico, S.T. Luvia, I. Gracia-Mora, L. Marquez-Rosado, A. Sanchez, M.E. Moreno-Garcia, A. Cruz, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Ramirez, S. Rodriguez-Enriquez, J. Sotelo, *Neoplasia* 7 (2005) 563–574.

[32] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solis, C. Gomez-Ruiz, E. Rodriguez-Aguilera, L. Macias-Rosales, E. Cortes-Barberena, C. Cedillo-Pelaez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, V. Madrid-Marina, F. Constantino-Casas, *Biomaterials* 21 (2008) 17–28.

[33] R. Alemon-Medina, M. Brena-Valle, J.L. Munoz-Sanchez, M.I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 219–228.

[34] I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, A. Márquez-Quiñones, L. Romero-De Lira, A. Marín-Hernández, L. Macías-Rosales, M.E. Bravo-Gómez, *Met-Based Drugs* 8 (2001) 19–28.

[35] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramirez, G.E. Kass, L.R. Kelland, R.M. Orr, M. Dobrota, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 1–5.

[36] L. Hernandez-Esquivel, A. Marin-Hernandez, N. Pavon, K. Carvajal, R. Moreno- Sanchez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212 (2006) 79–88.

[37] A. Marin-Hernandez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramirez, R. Moreno-Sanchez, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1979–1989.

[38] S. Rodriguez-Enriquez, P.A. Vital-Gonzalez, F.L. Flores-Rodriguez, A. Marin-Hernandez, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Sanchez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215 (2006) 208–217.

[39] A. Rivero-Muller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Plant, L. Ruiz, M. Dobrota, *Chem. Biol. Interact.* 165 (2007) 189–199.

[40] R. Moreno-Esparza, S. Escalante-Tovar, L. Ruiz-Ramirez, *Acta. Crystallogr. A* 58 (Suppl.) (2002) C18.

[41] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramirez, J.A. Howarth, M. Dobrota, *Toxicology* 194 (2003) 103–113

[42] Viveros Alpizar, A. *Determinación del pka y coeficiente de partición de la Casiopeína® III-ia*. Tercera jornada de trabajo de Casiopeína® UNAM 1998

[43] Fuentes Noriega Inés, Ruiz-Ramírez Lena, Tovar Tovar Araceli, Rico-Morales Héctor, Gracia-Mora Isabel. *Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína® III-ia in rat plasma* *Journal of Chromatography B*, 772 (2002) 115-121

[44] María Elena Bravo-Gómez, Juan Carlos García-Ramos, Isabel Gracia-Mora, Lena Ruiz-Azuara, *Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N–N)(acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N–N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®)* *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2009) 299-309.

[45] Marín Hernández Álvaro, Gracia Mora Isabel, Ruiz Azuara Lena, Moreno Sánchez Rafael, *Toxic effect of copper based antineoplastic drugs (Casiopeínas®)* *Biochemical Pharmacology*, 65, (2003) 1979-1989

[46] Rivera Huerta Marisol, Macías Rosales Lucía, Gracia Mora Isabel. *Toxicidad aguda en rata y ratón de las Casiopeínas® II-gly y III-ia*. Segundo congreso Nacional de Química Médica y Diabetes. Septiembre 2006

[47] Fuentes Noriega Inés, Novelo Torres Alma Miriam, Ruiz Ramírez Lena, Macías Rosales Lucía. *Cinética in vitro de un nuevo fármaco antineoplásico (Casiopeína[®] Illia)* Primer congreso en Casiopeínas[®]. Diciembre 2002, p.115-120.

[48] Tovar Tovar Araceli, Ruiz Ramírez Lena, Campero Celis Antonio. *Interacción entre Casiopeínas y adenina*. Primer congreso en Casiopeínas[®]. Diciembre 2002, p. 121-128.

[49] Rodríguez Aguilera Ernesto, Téllez Martínez Eloína Mireya, Macías Rosales Lucía, Gracia Mora Isabel. *Estimación del porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis en células HeLa, inducida por cinco Casiopeínas de la familia III*. Primer congreso en Casiopeínas. Diciembre 2002, Pág. 49-55

[50] De la Rosa Duque M. E. *Recombinogenic effects induced by Casiopeína[®] III as detected by reverse mutations in SPD8 cells*. 3ª Jornada de trabajo de Casiopeínas[®]. UNAM 1998, p. 37-39.

[51] Marín Hernández A., Rodríguez Hernández S. *Evaluación del efecto antineoplásico sobre el metabolismo energético en mitocondrias y células*. 4ª Jornada de trabajo en Casiopeínas[®]. Diciembre 2000, p. 59.

[52] Emilio John, Dan Luckabaugh. Manual of Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration. Feb 1998 <http://www.fda.gov/cder>.

[53] Pauwels, R. *Aspects of successful drug Discovery and development*, Antiviral Research. 2006; 71:77-89

[54] Hidalgo, I.J., *Memorias del curso: Uso de cultivos celulares como sistema modelo para la predicción de absorción intestinal de fármacos*. Fecha 5-7 julio 1999.

[55] Annette Braun, Sibyle Hämmerle, Kayoshi Suda, Barbara Rothen-Rutishauser, Maja Günthert, Stefanie D. Krämer, Heidi Wunderli-Allenspach. *Cell cultures as a tools in biopharmacy*. European Journal of pharmaceutical Sciences 11 Suppl. 2 (2000) S51-S60

[56] Artursson, P. (1990) *Epithelial transport of drugs in cell culture I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 79:476-482

[57] Aulton Michael. E, *La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas 2ª E.D* Elsevier España, S. A pp 257-260.

[58] X.C. Wu, J.R. Williford, S. Gokhin, S. Lee, M.R. Davis, P. Sheffels, X. Wang, J. Migeon, and M.C. Bodinier *The TC7 Cell Monolayer is a Valuable in vitro Intestinal Epithelial Model for Membrane Permeability Screening* Cerep, Inc., Redmond, WA 98052 USA.

[59] D.J Mc Cool, M A Marcon, J. F Forstner, and G. G Forstner. *The T 84 human colonic adenocarcinoma cell line produces mucin in culture and releases it in response to various secretagogues*. Research Institute, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada. Biochem. J . (1990) 276, 491-500.

[60] Di L, Kerns E. *Profiling drug-like properties in discovery research*. Current Opinion in Chemical Biology 2003, 7: 402-408.

[61] Li, AP. *Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties*. Drug Discovery Today 2005; 2(2):179-185

[62] Arthur C. Guyton and John E. Hall . *Textbook of Medical Physiology*, 11th Edition. Elsevier, 2006. En su edición en español: Arthur C. Guyton y John E. Hall. *Tratado de Fisiología Médica*, 11ª Ed. Ediciones Harcourt, Madrid, 2006.

[63] Praveen v. Balimane, Saeho Chong, Richard A. Morrison, *Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (2000) 301-312.

[64] Artursson P, Palm K, Luthman K. *Caco-2 Monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 46(1-3): 27-43.

[65] R, Ian Freshney *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, fifth edition © 2005 John Wiley & Sons, Inc.

[66] Yee S. (1997) *In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man-fact or myth*. *Pharmaceutical Research* 14(6): 763-766.

[67] Kovbasnjuk Olga, Leader Weinstein Alan, Spring Kenneth *Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp 6526-6530, May 1998 *Physiology*.