



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

*“Influencia del Tiempo de la lesión Medular sobre la  
Farmacocinética de la Ciprofloxacina en mono Rhesus”*

**T E S I S**

QUE COMO REQUISITO PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JESÚS DANIEL MONTOYA VEGA

DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS:

DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO

PAPIIT IN-221706



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## *AGRADECIMIENTOS:*

➤ *A Dios: Por estar siempre presente en mi vida y porque gracias a él tengo a los seres queridos que me rodean, muchas gracias.*

➤ *A tí Papa: TE DEDICO ESTA TESIS. Finalmente cumplí este paso en mi vida; no tengo palabras para agradecerte todo lo mucho que hiciste por nosotros, para agradecer que nunca por difícil que fuera la situación te diste por vencido y nunca nos faltó nada.*

*Gracias papa por ser el hombre que fuiste y gracias por enseñarme con el ejemplo. No tengo ni un mal recuerdo de tí y quiero seguir tus pasos; quiero dejar un gran ejemplo a mis hijos y dejarles las*

*bases para un buen futuro, tal como lo hiciste tú.*

*Quiero dejar impreso un escrito tuyo.*

*A mi esposa: que no piense en estos momentos de despedida, sino en los últimos momentos que vivimos felices.*

*A mis hijos: que sigan los ejemplos que se les inculcaron y que cumplan siempre sus metas.*

*A mi madre: que los años que le quedan de vida los disfrute al lado de quien más confianza y más tranquila se sienta.*

*A Dios: que cuide a mis seres queridos y que me tenga en cuenta al momento de mi hora*

*Vicente Jorge Montoya Hernández. 30 de Mayo del 2008.*

*Siendo creyente, se que desde donde te encuentras estas muy orgulloso de nosotros y aunque te has apartado físicamente yo te llevo día a día en mis recuerdos GRACIAS POR HABER SIDO*

*MI PADRE, MI HÉROE.*  
*volveremos a ver.*

*Nos*

➤ *A mí mamá: Infinitas gracias mamá por tus horas de desvelos, por la educación que me has dado, por todo el amor brindado y por haberme cuidado desde el primer día que llegue a este mundo. En tan pocos renglones no te puedo agradecer tanto que me has y sigues dando; solo te pido que sigas adelante junto con todos nosotros. Que Dios te bendiga mamá.*

➤ *A mí esposa: Gracias mi amor por todo tu apoyo, por seguirme empujando para alcanzar metas, por ser una excelente madre y excelente compañera, siempre juntos, y sabes que cuentas con mi apoyo*

*para que ahora tu alcances tus metas, adelante flaquita. Te amo.*

- *A mis hermanos: Jorge, Israel y Mayela. Gracias por ser mis amigos y por su apoyo incondicional, se que siempre contare con su apoyo y de igual forma tienen todo mi apoyo, seguiremos el ejemplo que nuestro padre nos dio y sé que está orgulloso de cada uno de nosotros.*
- *A mis hijos: Rosa Isela, Vicente Daniel y Ángel Issac. Gracias angelitos por estar conmigo, son mi mayor tesoro y el mejor regalo de la vida, son una de mis mayores alegrías día con día, ustedes me motivan a ser mejor y les prometo que seguiré*

*superándome para darles lo mejor porque ustedes lo merecen.*

- *A mis abuelos, tíos, primos, sobrinos, cuñados, suegros y amigos: todos ustedes también son parte importante de este logro, ya que me han acompañado en esta travesía. Gracias.*
  
- *A la Dra. Leticia Cruz: No tengo como agradecerle la confianza que me ha brindado y la oportunidad para poder terminar este gran esfuerzo que usted sabe que me ha costado tanto, gracias por su valioso tiempo, por sus enseñanzas y por su amistad. Muchas gracias Dra.*
  
- *Finalmente gracias a Proyecto Camina por brindarme la confianza para*

*desarrollar la parte experimental de este trabajo, en especial al Dr. Guízar.*

Este proyecto de tesis fué desarrollado en el laboratorio investigación Proyecto Camina y soportado por el programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT IN 221706-3)



---

**ÍNDICE**

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Farmacocinética.....	3
2.1.1. Absorción.....	3
2.1.2. Distribución.....	4
2.1.3. Metabolismo.....	6
2.1.4. Excreción.....	7
2.1.5. Estudios Farmacocinéticos.....	8
2.1.6. Infusión intravenosa.....	10
2.2. Unión a proteínas plasmáticas.....	13
2.3. Validación.....	14
2.4. Ciprofloxacina.....	16
2.4.1. Parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina.....	17
2.4.2. Indicaciones Terapéuticas.....	17
2.5. Organización del Sistema Nervioso de los Vertebrados.....	18
2.6. Sistema Nervioso Central (SNC).....	19
2.6.1. Sistema Nervioso Autónomo (SNA).....	19
2.6.2. Divisiones del sistema autónomo periférico.....	20
2.6.2.1. Sistema nervioso simpático.....	22

---

---

2.6.2.2. Sistema nervioso parasimpático.....	23
2.7. Lesión Traumática de Medula Espinal (LTME).....	26
2.7.1. Etapas de la Lesión Medular.....	27
2.7.2. Alteraciones farmacocinéticas reportadas por lesión medular.....	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4. OBJETIVO GENERAL.....	31
4.1. Objetivos particulares.....	31
5. HIPÓTESIS.....	32
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
6.1. Materiales.....	34
6.2. Reactivos.....	34
6.3. Equipo e Instrumentación.....	35
6.4. Manejo de los primates sometidos a investigación.....	35
6.4.1. Antes del tratamiento quirúrgico.....	35
6.4.2. Tratamiento quirúrgico.....	36
6.4.3. Después del tratamiento quirúrgico.....	37

---

---

6.5. Preparación de la curva de calibración previa al estudio farmacocinético.....	37
6.5.1. Preparación de la solución de ciprofloxacina.....	38
6.5.2. Preparación de la solución estándar interno.....	38
6.5.3. Preparación de la solución de ácido perclórico (HClO <sub>4</sub> ) al 6 %.....	39
6.6. Método bioanalítico utilizado para el análisis cromatográfico.....	39
6.6.1. Sistema Cromatográfico.....	39
6.6.2. Preparación de la fase móvil.....	39
6.7. Estudio farmacocinético.....	40
6.7.1. Manejo y análisis de las muestras biológicas de los primates sometidos al estudio.....	40
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	41
7.1. Método Analítico.....	41
7.2. Curva de calibración.....	41
7.3. Precisión y exactitud intradía.....	43
7.4. Estudio Farmacocinético.....	46
7.5. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra previo a la lesión medular (Sham).....	46
7.6. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra a las 24 h posteriores a la cirugía.....	51
7.7. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra a los 15 días posteriores a la cirugía.....	56
7.8. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra a los 60 días posteriores a la cirugía.....	59

---

8. CONCLUSIONES..... 65

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 66

## 1. INTRODUCCIÓN

La lesión traumática de la medula espinal (LTME), es sin duda un problema en materia de salud, ya que tiene efectos devastadores en el individuo que la sufre presentándose un nuevo estilo de vida al que tiene que enfrentarse. Con esto vienen cambios en el aspecto emocional, físico y en el aspecto metabólico, trayendo como consecuencia una serie de alteraciones en el organismo, todos estos cambios pueden modificar de una manera significativa la farmacocinética de algunos fármacos<sup>(4,5,10,15,24 y 26)</sup>

En el campo clínico es difícil hasta el momento establecer una farmacoterapia racional en personas con LTME, ya que existe una gran variabilidad entre estos individuos, entre algunos de ellos están: la intensidad de la lesión, el nivel en el que ocurre tal lesión, el estadio de la misma los cuales generan diversas alteraciones sistémicas y metabólicas; además de otros factores que juegan un papel importante como la edad, raza, género y volumen corporal<sup>(10)</sup>

Hasta el momento diversos estudios acerca de la influencia de la lesión medular sobre la disposición de algunos fármacos se han publicado, donde reportan cambios en parámetros farmacocinéticos atribuibles a los cambios metabólicos y sistémicos presentes en la lesión medular tanto en la etapa crónica (estudios clínicos) y aguda (estudios experimentales) de la misma.

En la etapa aguda de la lesión medular los estudios realizados en modelos experimentales (estudios realizados en ratas) sugieren un mayor cambio en la farmacocinética de algunos fármacos, ante la dificultad ética de evidenciar estas observaciones en estudios clínicos sistemáticos, el presente proyecto evaluó la influencia de lesión traumática de médula espinal a 24 horas, 15 días y 2 meses después de la lesión sobre la farmacocinética de un antibiótico (ciprofloxacina) empleado para contrarrestar infecciones en vías urinarias, padecimiento común en pacientes con lesión medular, empleando un modelo de lesión medular por compresión en monos Rhesus hembras y cuantificando la presencia del fármaco en plasma por cromatografía líquida de alta resolución.

Se pudo determinar que la LTME provoca cambios significativos en la farmacocinética de la ciprofloxacina 24 horas después de la lesión en área bajo la curva, depuración y tiempo de vida media; en tanto a los 15 y 60 días después de la lesión no se observan cambios farmacocinéticos tan marcados.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Farmacocinética.<sup>(1,7,13)</sup>

Es el estudio de la evolución temporal, de las concentraciones del fármaco y sus metabolitos en fluidos, tejidos y excretas biológicas. El estudio esta en función de la evaluación de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción que permite la construcción de modelos matemáticos para interpretar los datos obtenidos. El método más utilizado para la caracterización farmacocinética de un medicamento consiste en presentar el organismo como un sistema de compartimentos. La farmacocinética tiene por objeto el estudio y caracterización, referidos al tiempo de los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción de los medicamentos (ADME), mediante la utilización de modelos matemáticos en un contexto fisiológico y farmacológico.

Reduce los datos experimentales a cifras o parámetros significativos y utiliza estos datos reducidos para formular previsiones acerca de los resultados de futuros ensayos para cuya realización se requeriría tiempos y costos excesivos. Para producir sus efectos característicos, un medicamento debe estar presente en concentraciones apropiadas en sus sitios de acción. Aunque las concentraciones alcanzadas dependen de la cantidad de medicamento administrado, el grado y la velocidad de absorción, distribución, unión o depósito en los tejidos, metabolismo y excreción.

### 2.1. Absorción <sup>(1,7)</sup>

La absorción es el proceso farmacocinético que presenta cualquier medicamento administrado por vía no intravenosa, y puede describirse como la velocidad a la que un medicamento deja su sitio de administración y el grado o la medida en que lo hace, sin embargo, lo más importante es la biodisponibilidad este es un término usado para indicar el grado en que un medicamento llega a su sitio de acción o a un líquido biológico desde el cual el medicamento tiene acceso a su mecanismo de acción.

Hay muchos factores que influyen en la absorción del medicamento como:

- a) Solubilidad del medicamento, ya que los medicamentos administrados en solución acuosa se absorben más rápidamente que los que están en solución oleosa, suspensión o forma sólida, porque se mezclan fácilmente con la fase acuosa en el sitio de acción.
- b) La concentración del medicamento.
- c) La circulación en el sitio de absorción, entre mayor flujo sanguíneo debido al masaje o aplicación local de calor aumenta la absorción, un flujo sanguíneo menor producido por agentes vasoconstrictores, shock u otros factores patológicos pueden disminuir la absorción.
- d) Área de la superficie absorbente a la que se expone un medicamento. Los medicamentos se absorben muy rápidamente en grandes superficies como el epitelio alveolar pulmonar, la mucosa intestinal y, en algunos casos, también la piel. La superficie absorbente esta determinada en gran medida a la vía de administración.
- e) Tamaño de partícula

Cada uno de estos factores, juntos o por separado puede tener profundos efectos sobre la eficacia y la toxicidad de un fármaco.

### **2.1.2. Distribución <sup>1,7</sup>**

Después que un fármaco se absorbe o se inyecta en el torrente sanguíneo se distribuye en los líquidos intersticial y celular. Las formas de distribución de los fármacos dependen de factores fisiológicos y de ciertas propiedades fisicoquímicas de estas. La fase inicial de distribución determinada por el gasto cardíaco y la circulación sanguínea regional.



El corazón, hígado, riñón, encéfalo y otros órganos muy irrigados reciben casi todos los fármacos durante los primeros minutos después de la absorción la llegada del fármaco al músculo, la mayoría de las vísceras; la piel y la grasa en cambio es más lenta y estos tejidos pueden requerir desde minutos o varias horas para alcanzar el equilibrio. La segunda fase de distribución de un fármaco también está limitada por el flujo sanguíneo e involucra una fracción de la masa corporal mucho más grande que la primera fase. Junto con estas formas de distribución de la circulación sanguínea, actúan otros factores que determinan la velocidad de difusión de los fármacos en los tejidos.

La difusión en el compartimiento intersticial se produce rápidamente debido a la gran permeabilidad de las membranas endoteliales capilares (excepto encéfalo). Los fármacos poco liposolubles que atraviesan las membranas tienen una redistribución restringida y, por ende, también son restringidos sus sitios potenciales de acción.

La distribución puede estar limitada a causa de la unión del fármaco a proteínas del plasma, especialmente la albúmina para los fármacos ácidos y la glucoproteína alfa-ácida para los fármacos básicos. Un fármaco que se liga totalmente y con firmeza no tiene acceso a los sitios celulares de acción, ni puede metabolizarse ni eliminarse. Los fármacos pueden acumularse en los tejidos en concentraciones mayores que las esperadas de acuerdo con el equilibrio de fusión, como resultados de gradientes de pH, uniones con constituyentes intracelulares o disolución en la grasa. El fármaco que se ha acumulado en un tejido determinado puede servir como reservorio, prolongando la acción del fármaco en ese mismo tejido o en un lugar distante al que llega por la circulación.

Si el fármaco almacenado se halla en equilibrio con la del plasma y se libera cuando la concentración plasmática declina, la concentración del fármaco en el plasma y en su lugar de acción resulta sostenida y se prolongan sus efectos farmacológicos. Sin embargo, si el reservorio del fármaco tiene gran capacidad y se llena rápido, se altera tanto la distribución del fármaco inicialmente se requiere mayor cantidad para alcanzar una concentración terapéuticamente efectiva en el órgano efector.

### 2.1.3. Metabolismo <sup>(7)</sup>

La mayoría de los fármacos son metabolizados antes de ser eliminados del organismo. Las reacciones de metabolización de los fármacos se han clasificado en términos generales en procesos de fase I y de fase II.

Los procesos de fase I llevan a cabo oxidación, reducción e hidrólisis, reacciones que proporcionan un grupo funcional para aumentar la polaridad de la molécula de fármaco y crear un lugar adecuado para el metabolismo de fase II. Los procesos de fase II consisten en reacciones de conjugación o síntesis en las cuales un grupo químico voluminoso se fija a la molécula. Esto suele aumentar la hidrosolubilidad y facilita la excreción del metabolito fuera del organismo. Las enzimas metabolizadoras de fármacos tienen amplias especificidades de sustrato y la especificidad de las enzimas es más relativa que absoluta.

Por lo general, las enzimas que metabolizan los fármacos están presentes en múltiples formas y las diferencias en la expresión genética entre unos individuos y otros pueden contribuir a diferencias entre individuos en el metabolismo de los fármacos. Muchos factores de la dieta pueden influir sobre las enzimas metabolizadoras de fármacos entre otros:

- La proporción de proteínas.
- Carbohidratos.
- Alimentos vegetales que contienen flavonoides.
- Alimentos asados y/o ahumados ricos en hidrocarburos aromáticos policíclicos.

A veces, dos fármacos competirán para su metabolismo por la misma enzima, con el resultado de una tasa metabólica reducida para uno o ambos fármacos. Este proceso se denomina “inhibición”.

#### 2.1.4. Excreción <sup>(7)</sup>

Los fármacos se eliminan del organismo sin modificarse o bien como metabolitos. Los órganos excretores, excepto el pulmón, eliminan con mayor eficiencia compuestos polares que sustancias de gran liposolubilidad. Por esto los fármacos liposolubles no se eliminan fácilmente hasta que se metabolizan a compuestos más polares. El riñón es el órgano más importante en la eliminación de fármacos y sus metabolitos. Las sustancias excretadas en las heces son principalmente fármacos ingeridos, no absorbidos o metabolitos excretados en bilis y no reabsorbidos en el tracto gastrointestinal.

La excreción de fármacos por la leche es importante, porque es la fuente potencial de efectos farmacológicos indeseables para el lactante.

Excreción renal de los fármacos y sus metabolitos en la orina implica tres procesos:

- Filtración glomerular.
- Secreción tubular activa
- Reabsorción tubular pasiva

Excreción biliar y fecal muchos metabolitos de drogas formadas en el hígado se excretan en el tracto intestinal con la bilis. Estos metabolitos pueden excretarse en las heces, pero es más común que se reabsorban y se excreten eventualmente en la orina.

### 2.1.5. Estudios Farmacocinéticos <sup>(8,11,13)</sup>

Los estudios farmacocinéticos son una aproximación hipotética y simplificada que permite describir el sistema biológico en términos matemáticos. A través de los cuales podemos definir los parámetros farmacocinéticos tales como: vida media, volumen de distribución, constante de eliminación, depuración, concentración máxima entre otras.

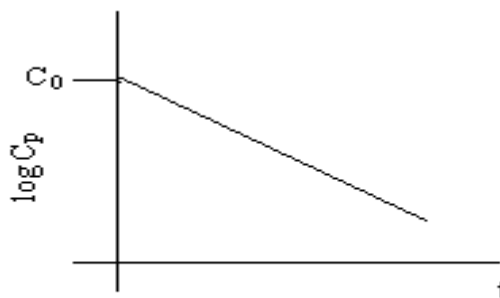


Figura 1. Gráfica semilogarítmica de Cp vs t

Esta es la representación del logaritmo de la concentración plasmática de un fármaco frente al tiempo, que es compatible con el modelo farmacocinética monocompartimental abierto del fármaco después de una dosis parenteral. La extrapolación de esta línea al tiempo cero produce una estimación de la concentración inicial del medicamento ( $C_0$ ) en el compartimiento si su distribución fuera instantánea, cuya ecuación es:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Tomando logaritmos naturales de ambos miembros resulta:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

Si la unión relativa de un medicamento a los componentes de los tejidos y fluidos es esencialmente independiente de la concentración de dicho medicamento, la relación entre la concentración de medicamento en los distintos tejidos y fluidos es constante. Por consiguiente, existirá una relación constante entre la concentración plasmática  $C$  y la cantidad de medicamento en el organismo.

$$X = VC$$

La constante de proporcionalidad  $V$  de esta ecuación resulta expresada en unidades de volumen y se conoce como volumen aparente de distribución. Esta constante, a pesar de su nombre, no tiene normalmente un significado fisiológico directo y no supone un volumen real.

El volumen aparente de distribución en una dosis intravenosa se puede obtener mediante la siguiente relación:

$$V = \frac{\text{DosisIV}}{C_o}$$

La constante de velocidad de eliminación de primer orden aparente,  $k$ , puede calcularse a partir de la pendiente de la recta que es igual a  $-k/2.303$  sin embargo, resulta más fácil determinar  $k$  mediante la fórmula:

$$V = \frac{0.693}{t_{1/2}}$$

En la que  $t_{1/2}$  es el tiempo necesario para que la concentración de medicamento en plasma o sangre se reduce a la mitad.<sup>13</sup>

### 2.1.6. Infusión intravenosa <sup>(7,24)</sup>

En aquellos casos en que la velocidad de entrada del fármaco al torrente sanguíneo se realiza de acuerdo con un proceso cinético de orden cero, como es el caso de una administración continua a velocidad constante (infusión intravenosa) y cuando la velocidad de eliminación desde el sistema es de tipo exponencial, la cantidad de fármaco tiende a acumularse hasta alcanzar un estado de equilibrio estacionario. Este equilibrio significa que la cantidad de fármaco en el sistema ha aumentado hasta un valor máximo, que se mantiene constante, lográndose un nivel constante o estacionario. En este estado estacionario, la velocidad de eliminación se iguala con la velocidad de entrada del fármaco al volumen de distribución.

El estado estacionario puede ser alterado si se modifica la velocidad a la cual se administra la infusión y por cambio de la constante de velocidad de eliminación o ambos parámetros. Cualquiera de estos cambios da lugar a un nuevo estado estacionario.

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

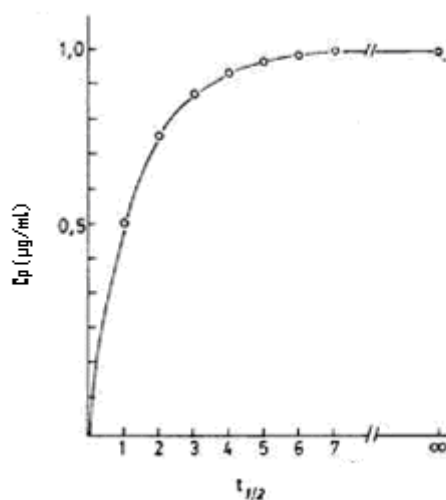


Figura 2 Concentración de un fármaco en plasma durante una infusión intravenosa a velocidad constante.

Para la mayoría de los fármacos, la eliminación del fármaco del plasma sigue un proceso de primer orden. Por lo tanto, en un modelo monocompartimental abierto, el fármaco infundido sigue una entrada de orden cero y una salida del organismo de primer orden. La modificación de la cantidad de fármaco en el cuerpo en cualquier tiempo ( $dD_f/dt$ ) durante la infusión, es la velocidad de entrada menos la velocidad de salida del fármaco.

$$dD_f/dt = R - KD_f \quad (Ec.1)$$

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

$$C_p = (R/V_dK)(1 - e^{-Kt}) \quad (Ec. 2)$$

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

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

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

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

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

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



## 2.2. Unión a proteínas plasmáticas<sup>(1,14)</sup>

Muchos medicamentos se ligan a proteínas del plasma; los fármacos ácidos lo hacen predominantemente con la albúmina que es la proteína plasmática mayoritaria (40 g/L), y los alcalinos con la  $\alpha_1$ -glucoproteína ácida. La unión con otras proteínas se produce en un grado mucho menor. Por lo común es reversible y a veces se observa enlaces covalentes de medicamentos reactivos, como los alquilantes.

Del total del fármaco, la fracción plasmática que habrá de unirse dependerá de la concentración de aquel, su afinidad por los sitios de unión y el número de estos últimos.

Si la concentración es pequeña (menor que la constante de disociación de unión a proteínas plasmáticas), la fracción ligada estará en función del número de sitios de unión y de la constante de disociación. En caso de que la concentración exceda la constante de disociación, la fracción ligada estará en función del número de sitios de acción y de la concentración del medicamento.

La unión de un medicamento a proteínas plasmáticas, limita su concentración en los tejidos y en su sitio de acción, porque solo el fármaco libre está en equilibrio entre uno y otro lado de las membranas. La unión también limita la filtración glomerular del medicamento; sin embargo la unión a proteínas plasmáticas no suele limitar la secreción tubular renal, ni la biotransformación, porque tales procesos disminuyen la concentración del medicamento libre, lo cual va seguido inmediatamente de la disociación del complejo fármaco-proteína.

### 2.3. Validación <sup>(9,22,31)</sup>

La validación de métodos analíticos para estudios de farmacocinética, incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método particular para la determinación cuantitativa de la concentración de la sustancia de interés o serie de sustancias de interés en una matriz biológica particular es confiable para la aplicación deseada a través de parámetros analíticos. Algunas de las técnicas bioanalíticas más comúnmente empleadas son: 1) métodos químicos (ejem. cromatografía de gases o de líquidos de alta resolución y varios procedimientos con cromatografía de masas directa y en combinación con otras técnicas) y 2) métodos biológicos, basados estos en procedimientos de inmunoensayos (ejem. técnica enzimática de inmunoensayo multiplicativa, métodos microbiológicos etc.)

Los parámetros esenciales para asegurar la aceptabilidad del método analítico son: la estabilidad de la sustancia de interés en la matriz bajo las condiciones en que se llevarán a cabo el estudio, la precisión y exactitud, la especificidad y el intervalo lineal de la función-respuesta en que se está trabajando.

*Estabilidad de la muestra analítica:* Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

*Precisión del sistema:* Verificación de que el sistema (instrumento), opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

*Linealidad del sistema:* Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos, son proporcionales entre la concentración y la respuesta analítica (mV, absorbancia, unidades de fluorescencia, etc.) dada por el equipo.

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

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

*Precisión:* Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

*Precisión intermedia:* Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

*Repetibilidad:* Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un mismo analista a las mismas condiciones de análisis en el mismo laboratorio.

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

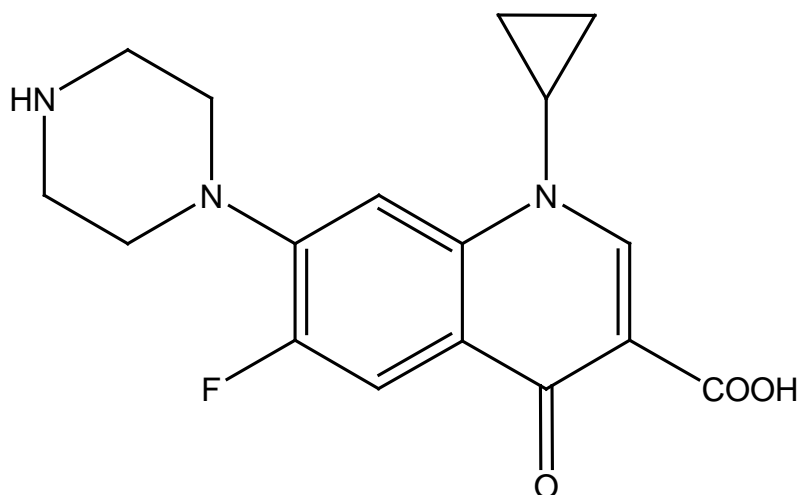
*Límite de detección:* Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones establecidas.

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

*Robustez:* Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

## 2.4. Ciprofloxacina <sup>(14,20)</sup>

Estructura química:



*Nombre químico:* 1-Ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxílico.

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

*Peso Molecular:* 331.35 gramos/mol.

*Descripción y solubilidad.* Polvo cristalino amarillo pálido, poco soluble en agua, ligeramente soluble en ácido acético y en metanol; muy ligeramente soluble en alcohol anhidro; casi insoluble en acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, hexano y en cloruro de metileno.

*El pKa* de la ciprofloxacina es de 6.09, 8.74

#### 2.4.1. Parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina.<sup>(20)</sup>

- Biodisponibilidad por vía oral (F) 60 %
- Excreción urinaria 65 %
- Fijo en plasma: 30 %
- Depuración: 25.2 L/h/70Kg
- Volumen de distribución 130 L/70Kg
- Vida media 4.1h

La ciprofloxacina es una fluoroquinolona, que como uso clínico da buen resultado para el tratamiento de infecciones en vías urinarias, aún cuando sean producidas por bacterias multiresistentes como *Pseudomonas*. Es eficaz administrada 500 mg dos veces al día por vía oral.

#### 2.4.2. Indicaciones Terapéuticas <sup>(14)</sup>

Infecciones producidas por microorganismos sensibles a la ciprofloxacina: de las vías respiratorias causadas por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Branhamella*, *Legionella*, *Staphylococcus*.; del oído medio (otitis media) y de los senos paranasales (sinusitis), especialmente cuando son causadas por gérmenes gramnegativos incluidos *Pseudomonas* o por *Staphylococcus*; de las vías urinarias y de los órganos genitales, cuando hay gonorrea, anexitis, salpingitis y prostatitis; de la cavidad abdominal (por ejemplo, infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal, de las vías biliares, peritonitis).

Sin embargo, en neumonía neumocócica de tratamiento ambulatorio, la ciprofloxacina no es el preparado de primera elección.

## 2.5. Organización del Sistema Nervioso de los Vertebrados.<sup>(17)</sup>

El sistema nervioso de los vertebrados tiene subdivisiones que pueden ser distinguidas por criterios anatómicos, fisiológicos y funcionales. La principal es la subdivisión en sistema nervioso central el cerebro y la médula espinal y sistema nervioso periférico las vías sensoriales y motoras que llevan información hacia y desde el sistema nervioso central. Las vías motoras se dividen a su vez en el sistema nervioso somático, con control voluntario sobre el músculo esquelético y en el sistema nervioso autónomo, que controla en forma inconsciente al músculo liso, al cardíaco y a las glándulas. El sistema autónomo, a su vez, se subdivide en sistema simpático y sistema parasimpático. La unidad funcional del sistema nervioso es la neurona, que tiene un cuerpo celular, un axón y frecuentemente muchas dendritas.

Hay cuatro clases de neuronas: neuronas sensoriales; ínterneuronas; neuronas de proyección y neuronas motoras. Muchas están rodeadas y aisladas por células de la glia, llamadas neuroglia en el sistema nervioso central y células de Schwann en el sistema nervioso periférico.

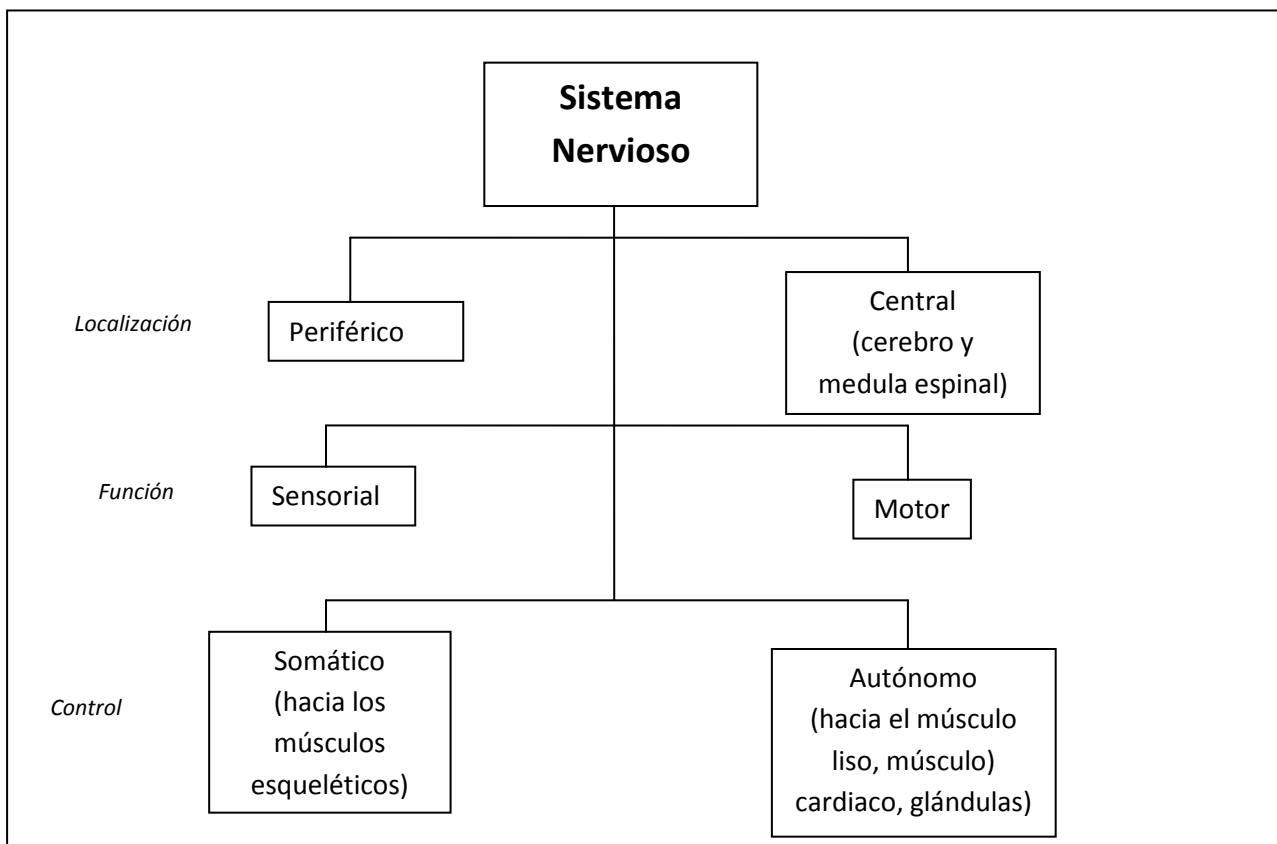


Figura 3. Organización del Sistema Nervioso de los vertebrados<sup>17</sup>

## **2.6. Sistema Nervioso Central (SNC)** <sup>(17)</sup>

El sistema nervioso de los vertebrados consiste en un sistema nervioso central el cerebro y la médula espinal y un sistema nervioso periférico, una vasta red de nervios que conectan el sistema nervioso central con todas las otras partes del cuerpo. Las neuronas sensoriales llevan información al sistema nervioso central y las neuronas motoras la llevan desde ese sistema. Las neuronas motoras están organizadas en los sistemas somático y autónomo, y el sistema autónomo contiene dos divisiones: la simpática y la parasimpática. Dentro del sistema nervioso central, la médula espinal constituye el enlace entre el cerebro y el resto del cuerpo.

### **2.6.1. Sistema Nervioso Autónomo (SNA)** <sup>(14,17)</sup>

Las divisiones del sistema nervioso autónomo -simpática y parasimpática- son anatómica, fisiológica y funcionalmente distintas. Funcionalmente, los sistemas simpático y parasimpático son generalmente antagónicos. La mayoría de los órganos internos están inervados por axones de ambos sistemas y la regulación homeostática del cuerpo depende de la cooperación de estas divisiones del sistema autónomo y de la actividad de las glándulas endocrinas. El sistema parasimpático está involucrado primariamente en las actividades restauradoras del cuerpo.

Se denomina también sistema visceral, autónomo o involuntario. En la periferia esta constituido por nervios, ganglios y plexos, que brindan innervación a corazón y a vasos sanguíneos, otros órganos viscerales y músculo liso y regula las funciones autonómicas que se producen sin control de la conciencia. Las fibras aferentes de los organismos viscerales son el primer enlace de los arcos reflejos del sistema autónomo. Los ganglios eferentes del sistema nervioso autónomo envían impulsos a todos lo tejidos inervados del cuerpo, salvo el músculo estriado, que se encuentra inervado por nervios somáticos.

Es probable que no existan centros de integración puramente autonómicos o somáticos, y que se produzca sobre posición extensa. Las reacciones somáticas conllevan siempre reacciones viscerales y viceversa. Los reflejos autonómicos se pueden desencadenar antes de la médula espinal, manifestando así sudación, cambios en la presión arterial, reacciones vasomotoras a los cambios de temperatura y vaciamiento reflejo de la vejiga urinaria, recto vesículas seminales. Existen también ramificaciones centrales extensas del sistema autónomo por arriba del nivel de la médula espinal y se sabe que el control de la respiración es en el bulbo raquídeo.

### **2.6.2. Divisiones del sistema autónomo periférico.<sup>(14,17)</sup>**

En el lado eferente, el sistema nervioso autónomo está constituido por dos grandes divisiones: 1) la *vía de salida simpática o toracolumbar*, y 2) la *vía de salida parasimpática o craneosacra* (figura 4). A continuación se ofrece una descripción de los aspectos anatómicos necesarios para comprender los efectos de los fármacos de acción autonómica. El neurotransmisor de todas las fibras autonómicas preganglionares, de todas las fibras parasimpáticas, posganglionares y de unas cuantas fibras simpáticas posganglionares es la *acetilcolina* (ACh); estas son llamadas fibras colinérgicas; en las fibras adrenérgicas, la mayor parte de las fibras son simpáticas posganglionares. En éstas, el transmisor es *noradrenalina* (*levarterenol*). Probablemente se trate de sustancia P y glutamato, puesto que ambos se encuentran en grandes concentraciones en las regiones dorsales de la médula espinal.<sup>(17)</sup>

Existen otros neurotransmisores que pueden manifestarse en menor medida durante la transmisión (tabla 1).



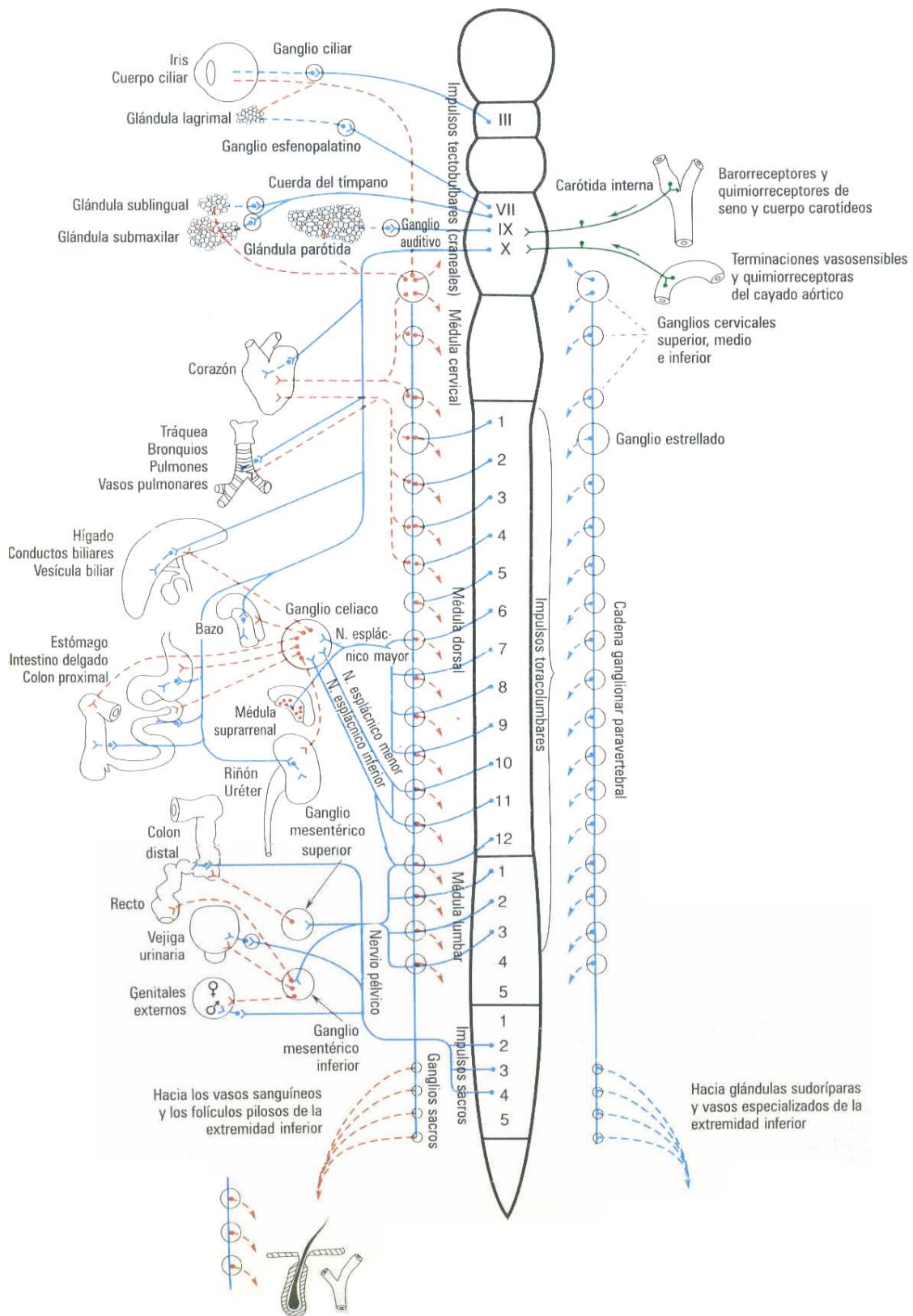


Figura 4 Sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático

### **2.6.2.1. Sistema nervioso simpático.** <sup>(14,17)</sup>

El sistema simpático, prepara el cuerpo para la acción. Los rasgos físicos del miedo, como el aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, entre otros, resultan de la descarga aumentada de neuronas del sistema simpático.

Las células que dan origen a las fibras preganglionares de esta división se encuentran, sobre todo, en las columnas intermedio-laterales de la médula espinal, y se extienden desde el primer segmento torácico hasta el segundo o el tercer segmento lumbar. Los axones provenientes de estas células corren por las raíces nerviosas anteriores, y hacen sinapsis con neuronas que se encuentran en los ganglios simpáticos fuera del eje cefalorraquídeo. Los ganglios simpáticos tienen tres localizaciones: paravertebral, prevertebral y terminal.

Los ganglios simpáticos paravertebrales consisten en 22 partes, cada uno colocado a cada lado de la columna vertebral para formar las cadenas laterales (figura 4). Los ganglios se conectan entre sí por troncos nerviosos y con los nervios raquídeos, por medio de ramos comunicantes. Los ramos blancos se restringen a los segmentos de la vía de salida toracolumbar; transportan a las fibras mielínicas preganglionares que salen de la médula espinal por las raíces raquídeas anteriores.

Los ramos grises se originan en los ganglios y llevan fibras posganglionares de vuelta hacia los nervios raquídeos para la distribución hacia las glándulas sudoríparas y los músculos pilomotores, y hacia los vasos sanguíneos del músculo estriado y la piel. Los ganglios prevertebrales se encuentran en abdomen y pelvis, cerca de la superficie ventral de la columna vertebral ósea, y consisten principalmente en ganglios celiacos (solares), mesentéricos superiores, aortorreñales y mesentéricos inferiores. Los ganglios terminales son de número escaso, se localizan cerca de los órganos que inervan e incluyen a los ganglios conectados con la vejiga urinaria y el recto y a los ganglios de la región cervical. Además, hay ganglios intermedios pequeños, sobre todo en la región toracolumbar, que se hallan fuera de la cadena vertebral ordinaria.

Su número y localización son variables, pero suelen encontrarse en proximidad estrecha con los ramos comunicantes y las raíces nerviosas raquídeas anteriores.

Las fibras posganglionares que se originan en los ganglios simpáticos inervan estructuras viscerales de tórax, abdomen, cabeza y cuello. Tronco y extremidades se encuentran inervados por fibras simpáticas que transcurren por los nervios raquídeos, como ya se describió. Los ganglios prevertebrales contienen cuerpos celulares, cuyos axones inervan a las glándulas y al músculo liso de las vísceras abdominales y pélvicas. Muchas de las fibras simpáticas torácicas superiores provenientes de los ganglios vertebrales forman plexos terminales, como los plexos cardiaco, esofágico y pulmonar.

La distribución simpática hacia la cabeza y cuello (vasomotora, pupilodilatadora, secretora y pilomotora) está por la cadena simpática cervical y sus tres ganglios. Todas las fibras posganglionares de dicha cadena se originan en los cuerpos celulares localizados en estos tres ganglios; todas las fibras preganglionares nacen de los segmentos torácicos superiores de la médula espinal, y no existen fibras simpáticas que dejen al SNC por arriba del primer nivel torácico.

#### **2.6.2.2. Sistema nervioso parasimpático.**

El sistema parasimpático está involucrado primariamente en las actividades restauradoras del cuerpo. La estimulación parasimpática hace más lenta la frecuencia cardiaca, incrementa los movimientos del músculo liso de la pared intestinal, y estimula la secreción de las glándulas salivales y de las glándulas digestivas del estómago.<sup>(17)</sup>

El sistema nervioso parasimpático está constituido por fibras preganglionares que se originan en tres áreas del SNC y sus conexiones posganglionares (figura 4). Las regiones de origen central son mesencéfalo, bulbo raquídeo y parte sacra de la médula espinal. Las fibras mesencefálicas, o tectales, son aquellas que surgen del núcleo de Edinger-Westphal del III par, y que pasan hacia el ganglio ciliar en la órbita. Las fibras bulbares están constituidas por componentes parasimpáticos de los

nervios craneales VII, IX y X. Las fibras del VII par, o facial, constituyen la cuerda del tímpano, que inerva a los ganglios que se encuentran sobre las glándulas submaxilares y sublinguales. Forman también el nervio petroso superficial mayor, que inerva al ganglio esfenopalatino. Los componentes autonómicos del IX par, o glosofaríngeo, inervan al ganglio auditivo. Las fibras parasimpáticas posganglionares provenientes de estos ganglios inervan esfínter del iris, músculo ciliar, glándulas salivales y lagrimales, y glándulas mucosas de nariz, boca y faringe. Estas fibras incluyen también nervios vasodilatadores para los órganos mencionados. El X par, o vago, se origina en el bulbo raquídeo y contiene fibras preganglionares, la mayor parte de las cuales no hacen sinapsis hasta que llegan a los muchos ganglios pequeños que se encuentran directamente sobre las vísceras de tórax y abdomen, o dentro de estas mismas. En la pared intestinal, las fibras vagales terminan alrededor de células ganglionares en los plexos de Auerbach y Meissner. Las fibras preganglionares son, por tanto, muy largas, en tanto que las posganglionares son muy cortas. El nervio vago contiene un número bastante mayor de fibras aferentes (pero al parecer sin fibras del dolor) provenientes de las vísceras y que transcurren hasta el bulbo raquídeo; los cuerpos celulares de estas fibras se encuentran principalmente en el ganglio nodoso.<sup>(14)</sup>

---



---

## Principales Neurotransmisores

---

	Acetilcolina
	Dopamina
<b>Aminas biógenas</b>	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
	Histamina
	Noradrenalina (norepinefrina)
	Adrenalina
<b>Aminoácidos</b>	GABA
	Glicina
	Glutamato
	Aspartato
<b>Neuropéptidos</b>	Sustancia P
	Neuropéptido Y
	Péptido vasoactivo intestinal (VIP)
	Arginina vasopresina (AVP)
	Galanina
	Péptidos opioides: (encefalinas y endorfinas)
<b>Gases</b>	Óxido nítrico (ON)
	Monóxido de carbono (CO)

---

Tabla 1. Principales neurotransmisores <sup>(17)</sup>

## 2.7. Lesión Traumática de Medula Espinal (LTME). <sup>(4,33,25)</sup>

La lesión medular es una alteración de la medula espinal que puede ser causada por diferentes enfermedades; pero la principal causa es por traumatismo, que modifica no solo la fuerza muscular y la sensibilidad, genera también un cambio en todos los sistemas del organismo.

Otros cambios que ocurren son: a nivel económico, social y psicológico, que dependiendo de la severidad de la lesión puede ser muy discapacitante. La mayoría de las lesiones de la médula espinal son consecuencia de accidentes de tránsito, que afectan con mayor frecuencia a varones jóvenes y en una elevada proporción de los casos quedan como secuela cuadriplejía o paraplejía

*Paraplejía.* Cuando una persona ha perdido la sensibilidad y no es capaz de mover la parte inferior de su cuerpo. La lesión se encuentra en la parte dorsal, lumbar o sacra.

*Tetraplejía.* Cuando ha perdido sensación y movimiento en la parte inferior y superior del cuerpo. La lesión se encuentra a nivel cervical.

Los mecanismos de lesión son diferentes según los niveles de la médula afectados: en la médula cervical el mecanismo más frecuente es la hiperextensión por traumatismo en la región anterior del cráneo o por el efecto del latigazo por un golpe en la parte posterior del vehículo; en la médula toracolumbar los mecanismos pueden ser de flexión – compresión, de compresión arterial o de rotación lateral.

La consecuencia más grave del traumatismo espinal es la sección transversal completa de la médula espinal que presenta pérdida de actividad funcional distalmente a la lesión con ausencia de la sensibilidad, y pérdida de actividad funcional, pérdida de la actividad motora, ausencia de reflejos, retención vesical y trastornos vegetativos.

La lesión incompleta más frecuente es el síndrome de Brown – Sequard o de hemisección medular en el cual se presenta parálisis flácida, arreflexia y signo de Babinski, en el lado de la hemisección, y en el lado opuesto pérdida de sensibilidad al dolor y a la temperatura por la lesión del haz espinotalámico lateral.

### 2.7.1. Etapas de la Lesión Medular.

Se puede dividir en dos, principalmente el choque medular o etapa aguda, caracterizado por presentar arreflexia, parálisis de la región afectada, esfínteres arreflexivos, y liberación medular o etapa crónica caracterizada por presentar hiperreflexia, espasticidad. Movimientos involuntarios etc.. La primera puede tener una duración de 4 a 8 semanas, la segunda hasta 6 meses periodo en el que se puede obtener la mayor recuperación neurológica<sup>(26)</sup>

El efecto sistemático de la lesión aguda de la espina dorsal o torácica incluye hipotensión y reduce el trabajo cardíaco. El efecto local incluye pérdida de autorregulación en el segmento lesionado de la espina dorsal y una reducción marcada de la microcirculación en ambas; materia gris y blanca, especialmente en regiones con hemorragia y zonas adyacentes. La pérdida microcirculatoria se extiende considerablemente a una distancia proximal y distal al sitio de la lesión. Muchos han demostrado la reducción del fluido sanguíneo de la espina dorsal por medio de una dependencia de la severidad de la lesión.

Muchos axones son dañados directamente por la deformación física del cordón espinal (lesión primaria) sin embargo, un gran número de axones son perdidos como resultado de una variante química, eventos celulares que son iniciadores del ataque mecánico original (lesión secundaria). La patología secundaria y los cambios celulares que ocurren en el tejido de cordón espinal con traumatismo incluye la hidrólisis de un lípido enzimático como resultado de la producción de peroxidación lipídica, pérdida calcio del espacio intracelular, acumulación de potasio en el espacio extracelular, un incremento total de sodio en el tejido y decreción de magnesio, decreción de sodio – potasio en la actividad ATPasa. También la peroxidación de los lípidos de la membrana es iniciada por radicales libres por la dislocación o descompartmentización de iones de hierro, hemoglobina ó ambos<sup>(10)</sup>

### **2.7.2. Alteraciones farmacocinéticas reportadas por lesión medular.**

Se han realizado diversos estudios clínicos los cuales han reportado alteraciones farmacocinéticas de varios fármacos; tal es el caso de amikacina que fue estudiada en una etapa crónica en humanos, mostrando que el Vd en estado estacionario, la vida media y el tiempo medio de residencia de la amikacina fueron incrementados con respecto a su valor control<sup>(28)</sup>. Otro fármaco reportado con alteraciones farmacocinéticas es la gentamicina administrada por vía intramuscular presentó una absorción retardada y una concentración máxima disminuida en suero de sujetos con una LTME causado por una disminución en el flujo sanguíneo muscular, dado que la disminución del flujo sanguíneo es característico de un músculo paralizado, lo cual da por resultado una eficacia baja del fármaco administrado por ésta vía<sup>(27)</sup>.

También se ha observado alteraciones ligeras en la biodisponibilidad de salicilato después de una administración oral de aspirina cuando hay una lesión inducida a un nivel T8 en modelo experimental. La velocidad, pero no la cantidad de absorción de la aspirina parece ser significativamente afectada después de una LTME<sup>(12)</sup>.

Otros estudios en modelos experimentales han demostrado que depende del nivel de la lesión es reflejada la alteración en el sistema, ya que si la lesión se presentaba a nivel T5-T10 la motilidad y el vaciamiento gástrico se veían alterados, por lo tanto los medicamentos administrados no alcanzaban la concentración máxima y el tiempo de vida media se prolongaba casi al doble de lo normal. Debido a estos estudios que reportan diversas alteraciones farmacocinéticas; se hace necesario el estudio farmacocinético empleando modelos experimentales en animales de laboratorio<sup>(15)</sup>.



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una lesión medular puede producirse por caídas, disparos de pistola, accidente automovilístico, accidente peatonal u otros eventos que fractura o disloca la columna vertebral, induciendo una presión mecánica o sección completa (en casos graves) al tejido medular. La lesión medular provocada inicialmente por el traumatismo, desencadena un segundo conjunto de procesos de autodestrucción (exitotoxicidad, inflamación, acumulación de radicales libres, apoptosis, isquemia) que aumenta el daño al tejido medular <sup>(10,26)</sup>

La lesión de la médula espinal (LME) produce alteraciones estructurales y funcionales que oscilan desde el bloqueo transitorio de la conducción, hasta la sección medular completa. El resultado del trauma a la médula espinal, es en primera instancia, físico, el cuál es seguido por una serie de daños que inician a los pocos minutos y continúan días o años después. Esta lesión secundaria provoca cambios fisiopatológicos en la médula espinal, que destruyen importantemente el tejido medular. Además de la parálisis y la pérdida de sensibilidad, la lesión traumática de la médula espinal, también causa severas alteraciones sistémicas y metabólicas que pueden poner en peligro la vida del paciente, retrasan su rehabilitación, debido a que se alteran funciones del sistema cardiovascular, gastrointestinal, renal, endocrino e inmune <sup>(15)</sup>, condiciones que pueden modificar la respuesta del organismo ante las terapias con medicamentos y exponen de manera importante la necesidad de definir, mediante estudios experimentales la influencia de la lesión medular sobre la farmacocinética de fármacos.

Diversos estudios acerca de la influencia de la lesión medular sobre la disposición de algunos fármacos se han publicado, donde reportan cambios en parámetros farmacocinéticos atribuibles a los cambios metabólicos y sistémicos presentes en la lesión medular tanto en la etapa crónica (estudios clínicos)<sup>(26)</sup> y aguda (estudios experimentales) de la misma <sup>(18)</sup>

Sin embargo en la etapa aguda de la lesión medular los estudios realizados en modelos experimentales (estudios realizados en ratas) sugieren un mayor cambio en la farmacocinética de algunos fármacos<sup>(12)</sup> debido a que la LME provocada inicialmente por el traumatismo, desencadena un segundo conjunto de procesos de autodestrucción como se mencionó anteriormente y que aumenta el daño al tejido medular<sup>(15)</sup> para pasar de una lesión medular incompleta a una lesión medular completa. Una lesión completa significa que no hay sensibilidad ni función motora por debajo del nivel de lesión y los cambios sistémicos y metabólicos son más severos que en una lesión incompleta. Con base a lo anterior en el presente proyecto se evaluará la influencia del tiempo de una lesión traumática de médula espinal en la etapa inicial de la lesión ( 24 horas, 15 días y 2 meses después de la lesión) sobre la farmacocinética de la ciprofloxacina un antibiótico usado comúnmente para anular infecciones en vías urinarias, padecimiento frecuente en pacientes con lesión medular, ante la dificultad ética de evidenciar estas observaciones en estudios clínicos sistematizados, en este proyecto se empleara un modelo de lesión medular por compresión propuesto e implementado en el centro de Investigación Camina, en mono Rhesus hembra a nivel de la vértebra torácica 9.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia del tiempo de una lesión en la médula espinal, en la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada de manera intravenosa en monos Rhesus hembra.

##### **4.1. Objetivos particulares**

- Reproducir con precisión y exactitud el método de cuantificación de la ciprofloxacina en plasma de mono por CLAR.
- Evaluar la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada de manera intravenosa en monos Rhesus hembra.
- Determinar la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada de manera intravenosa en monos Rhesus hembra, 24 horas después de una LTME.
- Determinar la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada de manera intravenosa en monos Rhesus hembra, 15 días después de una LTME.
- Determinar la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada de manera intravenosa en monos Rhesus hembra, 2 meses después de una LTME.
- Comparar la farmacocinética de la ciprofloxacina administrada de manera intravenosa antes y después de la LTME en sus diferentes estadios.

## 5. HIPÓTESIS

Cambios farmacocinéticos de la ciprofloxacina administrada por vía de infusión intravenosa a monos Rhesus hembra en presencia de una lesión traumática de médula espinal podrán evidenciarse en diferente magnitud a las 24 horas, 15 días y 2 meses posterior a la lesión medular debido a que inmediatamente posterior al traumatismo medular se desencadena un segundo conjunto de procesos de destrucción que aumenta el daño al tejido medular provocando diversas alteraciones sistémicas y metabólicas.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### ***Tipo de Estudio:***

Experimental, Prospectivo y Longitudinal, en una población de Monos Rhesus hembras con un peso entre 5 y 7 Kg, y edad de entre 5 a 10 años.

### ***Criterios de Inclusión:***

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

### ***Criterios de Exclusión:***

Que los primates presenten un cambio en su comportamiento antes del estudio, debido a que pueden ser indicios de alguna enfermedad.

### ***Criterios de Eliminación:***

Reacciones adversas al medicamento al momento de su administración. Que después de la lesión medular surjan complicaciones post-quirúrgicas.

### ***Variables:***

Tiempo después de la lesión medular: 24 horas, 15 días y 2 meses.

### 6.1. Materiales:

- Vasos de precipitado de distintas capacidades
- Pipetas volumétricas de 1.0 mL
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL
- Matraces volumétricos de 10, 50 y 1000 mL
- Probetas graduadas de 100, 500 y 1000 mL
- Pipetas semiautomáticas Eppendorf
- Tubos Eppendorf
- Papel glassin
- Espátula de acero inoxidable
- Frascos de plástico de 20 mL
- Jeringas de 10 mL
- Tubos de ensayo de 13 X 18 cm
- Gradilla

### 6.2. Reactivos:

- Acetonitrilo J.T. Baker grado HPLC
- Ciprofloxacina estándar secundario Lote 6700047004
- Enrofloxacin. estándar secundario, lote 04-02-6017
- Trietilamina. productos químicos Monterrey
- Ácido Perclórico. J.T Baker analizado
- Metanol J.T. Baker grado HPLC
- Ácido fosfórico 85% Grado HPLC.
- Heparina.
- Tiras indicadoras de pH, Merck
- Plasma de cuatro primates no humanos antes y después de una intervención quirúrgica determinada.

### 6.3. Equipo e Instrumentación

- Balanza analítica Ohaus
- Bomba para vacío
- Equipo de filtración Millipore
- Membranas de filtración Millipore con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$
- Parrilla de agitación (Vortex)
- Centrífuga Fischer Scientific Maratón 26 KM
- Equipo desionizador de agua System Milli-Q Water Millipore
- Cromatógrafo de Líquidos Waterscon Detector Waters 486
- Columna Zorbax SB-C18 4.6 x 75 mm 3.5  $\mu\text{m}$
- Silla de contención para los primates sometidos a estudio
- Equipo de Venoclisis
- Cronómetro.

### 6.4. Manejo de los primates sometidos a investigación.

#### 6.4.1. Antes del tratamiento quirúrgico.

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

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

c) Toma de muestra: Se tomaron muestras por duplicado de 1.0 a 1.5 mL de sangre, antes de la administración del fármaco y a los tiempos de 7.5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 480 y 600 minutos después de la administración de la ciprofloxacina. Las muestras fueron recibidas en tubos eppendorf con 100 µL de heparina previamente adicionada para separar el plasma por centrifugación; una vez obtenido, se mantuvo en congelamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

#### **6.4.2. Tratamiento quirúrgico.**

a) Anestesia : Se empleó una anestesia general inhalatoria utilizada para cirugías mayores y consistió en la utilización de tiletamina-zolacepam (ZoletilR ®) como inductor para intubación endotraqueal (3 mg/Kg) que se mantuvo con isofluorano al 2%.

Se monitorearon sus constantes fisiológicas (frecuencia cardiaca F.C., frecuencia respiratoria F.R., tensión arterial T.A., temperatura y saturación de oxígeno) a través de un monitor cardiaco.

b) Cirugía con lesión y cuidados: Bajo condiciones estériles se realizó una incisión longitudinal a nivel de la vértebra torácica T11, hasta exponer la médula a través de una laminectomía. Se insertó un catéter Fogarty calibre 6 FR, con una guía rígida y se dirigió hacia la vértebra torácica T9 a través del espacio epidural.

De esta manera el catéter quedó en el espacio epidural, en posición dorso-central respecto a la médula espinal y con el globo desinflado en la porción central de la vértebra torácica T9, mismo que se infló de manera súbita con el volumen de líquido determinado, de tal manera que su diámetro fuera igual a la distancia antero-posterior del canal raquídeo (medido en cada animal con tomografía) para producir el porcentaje de compresión medular establecido para cada primate. Se dejó inflado durante 5 minutos, posteriormente se desinfló, se retiró el catéter y se suturó la incisión por planos anatómicos. Cada primate fue colocado en jaulas individuales, la



vejiga y el intestino se vaciaron en forma manual. Se alimentaron con pellets, frutas y semillas dos veces al día, así como con agua ad libitum.

#### **6.4.3. Después del tratamiento quirúrgico.**

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

b) Administración del fármaco: La ciprofloxacina se administró por infusión intravenosa utilizando una dosis de 10 mg/Kg de peso, por 30 minutos, a través de un equipo de venoclisis y usando una bomba de infusión. La administración del fármaco se realizó 24 h, 15 días, y 60 días después del tratamiento quirúrgico.

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

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

El intervalo de concentraciones del estudio farmacocinético de ciprofloxacina para la curva de calibración constó de seis niveles de concentración: 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 1.2 y 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la concentración del estándar interno (enrofloxacina) fue de 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A seis tubos eppendorf se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de plasma de primate (Libre de fármaco), a cada tubo se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de solución *h* de estándar interno (Enrofloxacina); se identificaron marcandolos del 1 al 6. Posteriormente a los tubos del 1 al 4 se les adicionaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de las soluciones *b*, *c*, *d*, y *e* respectivamente de las diluciones de ciprofloxacina para obtener los cuatro puntos

de concentración más bajos de la curva; y para los dos niveles de concentración más altos, a los tubos 5 y 6 se adicionaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de las soluciones *f* y *g* de ciprofloxacina respectivamente. Finalmente, a cada tubo se adicionó 330  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico al 6.0 %, para obtener 500  $\mu\text{L}$  como volumen total.

Todos los tubos se agitaron en un vórtex durante tres minutos y se separaron las fases (Acuosa y Sedimento) por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos; se tomó de la fase líquida 60  $\mu\text{L}$  y se inyectaron directamente al cromatógrafo.

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

Solución de ciprofloxacina: Se pesó 0.1 g de ciprofloxacina estándar secundario y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió y aforó, para obtener una concentración de 10 mg/mL (solución madre).

Para obtener las concentraciones de 0.075, 0.15, 0.30 y 0.60  $\mu\text{g/mL}$ , de la solución madre se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al aforo (solución *a*); posteriormente con ayuda de micropipetas se tomaron alícuotas de 75, 150, 300 y 600  $\mu\text{L}$  los cuales fueron llevados a matraces volumétricos de 100 mL cada uno de ellos y fue aforado con agua grado HPLC (soluciones *b*, *c*, *d*, *e* respectivamente).

Para obtener las concentraciones de 1.2 y 2.5  $\mu\text{g/mL}$ , de la solución madre se tomó una alícuota de 120, y 250  $\mu\text{L}$  respectivamente, los cuales fueron llevados a matraces volumétricos de 100 mL, cada uno de ellos y fue aforado con agua grado HPLC (soluciones *f*, *g* respectivamente).

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

Se midieron 100  $\mu\text{L}$  de enrofloxacin (Enroxil ® solución inyectable al 5 %) y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con agua grado HPLC. Esta solución tiene una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  (solución *h*).

### **6.5.3. Preparación de la solución de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) al 6 %.**

Se midieron 4.3 mL de ácido perclórico (al 70 % de pureza) y se colocó en un matraz de 50 mL diluyendo hasta el aforo con agua filtrada y libre de impurezas, posteriormente se agitó.

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

### **6.6.1. Sistema Cromatográfico.**

- Columna: Zorbax SB-C18 7.6 X 75 mm, 3.5 µm.
- Precolumna Hardware Kit.
- Longitud de onda: 278 nm.
- Velocidad de flujo: 1.4 mL/min.
- Volumen de inyección: 60 µL. (Loop 20 µL)

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

Se preparó una solución de ácido fosfórico 0.025 M de la siguiente manera: Se midieron 1.7 mL de ácido fosfórico (al 85 % de pureza), se colocó en un matraz volumétrico de 1000 mL y se aforó con agua filtrada y libre de impurezas.

Posteriormente se preparó una solución de ácido fosfórico 0.025 M : Acetonitrilo en una proporción de 87:13 v/v misma que se ajustó posteriormente a un pH de 3 con aproximadamente 45 gotas trietanolamina.

## **6.7. Estudio farmacocinético.**

Los parámetros farmacocinéticos  $V_d$ ,  $Cl$ ,  $ABC_0-t$ , y  $t_{1/2}$  se calcularon a partir de los datos del perfil plasmático, se obtuvieron de forma directa con la ayuda del programa computacional WinNonlin versión 2.1 a través de un análisis no compartimental (infusión constante) y por medio de un modelo lineal. El análisis farmacocinético se realizó para cada primate en las distintas fases del estudio farmacocinético clínico.

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

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

A tubos eppendorf previamente etiquetados con los tiempos de muestreo (0-600 min), con nombre del primate y fase de la lesión, se adicionaron 100  $\mu$ L del plasma de primate tomado en cada tiempo, a cada tubo se le adicionaron 20  $\mu$ L de la solución estándar interno (enrofloxacin), adicionando por último el volumen necesario de ácido perclórico al 6.0 % para llegar a 500  $\mu$ L como volumen total.

Todos los tubos se agitaron en un vórtex durante tres minutos y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos para separar las fases (acuosa y sedimento), posteriormente se tomaron de la fase líquida 20  $\mu$ L y se inyectaron directamente al sistema cromatográfico.

## 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

### 7.1. Método Analítico.

Partiendo de que el método analítico empleado en este estudio experimental fue previamente desarrollado y validado <sup>(3)</sup>. Se procedió a demostrar la confiabilidad del método en términos de linealidad, precisión y exactitud.

### 7.2. Curva de calibración.

Para demostrar la linealidad del método se realizó por triplicado la determinación de ciprofloxacina en plasma; partiendo de una solución madre de ciprofloxacina a concentración de 10 mg/mL, de esta se realizaron diluciones para obtener seis niveles, (0.075 µg/mL, 0.15 µg/mL, 0.3 µg/mL, 0.6 µg/mL, 1.2 µg/mL y 2.5 µg/mL), utilizando como estándar interno enrofloxacino a una concentración de 2 µg/mL.

La relación de alturas de ciprofloxacina/enrofloxacino graficado contra nuestros seis puntos de concentración de ciprofloxacina son proporcionales y corresponden a la ecuación lineal del tipo  $y = mx + b$ ; la cual según nuestros datos obtenidos se escribe como:

$$y = 0.5733x - 0.0006$$

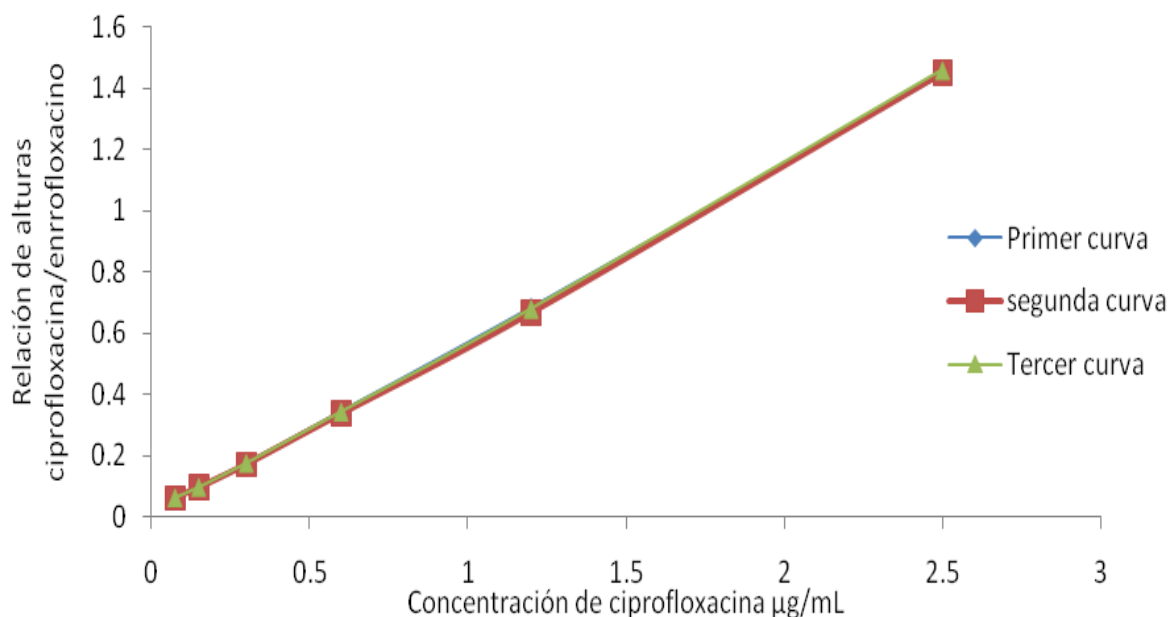


Figura 5. Curva de calibración de ciprofloxacina en plasma de rata.

Concentración µg/mL	Promedio de relación de alturas cipro/enrro	Desviación estándar	Coefficiente de variación experimental (%)	Coefficiente de variación (especificación) <sup>(22)</sup> (%)
0.075	0.0600	0.00359	5.983	20
0.15	0.0964	0.00047	0.494	15
0.3	0.1739	0.00226	1.302	15
0.6	0.3415	0.00383	1.121	15
1.2	0.6765	0.00904	1.336	15
2.5	1.4513	0.00773	0.532	15

Cuadro 1 Valores promedio de la curva de calibración de ciprofloxacina en plasma de rata

En el cuadro número uno se puede observar que en el punto de menor concentración es donde se obtuvo mayor variación, esto es normal ya que al tener mediciones menores crece la incertidumbre; sin embargo el coeficiente de variación en ninguno de los puntos excede especificaciones<sup>(22)</sup>.

Así también el coeficiente de determinación obtenido fue de 0.9994, superando satisfactoriamente la especificación que se requiere normativamente (0.98)<sup>(22)</sup> y confirma que nuestra curva de calibración corresponde a una ecuación lineal y por lo tanto proporcional.

### 7.3. Precisión y exactitud intradía

Se realizaron tres curvas de ciprofloxacina en seis niveles de concentración con enrofloxacino como estándar interno a una concentración de 2 µg/mL.

Se determinaron las respuestas de tres puntos intermedios dentro de la curva; punto alto, medio y bajo (1.8 µg/mL, 0.45 µg/mL, 0.11 µg/mL respectivamente).

Al evaluar estos puntos por quintuplicado en un mismo día se encontró:

Puntos control (µ/mL)	Concentración de Ciprofloxacina Obtenida (µ/mL)	Exactitud +/- Valor nominal obtenido (%)	Especificación del valor nominal (%)	Precisión C.V obtenido (%)	Precisión C.V especificación (%)
Bajo (0.11)	0.107	2.800	+/- 20	3.418	20
	0.101	7.840			
	0.110	-0.107			
	0.110	-0.363			
	0.106	3.432			
Medio (0.45)	0.443	1.532	+/- 15	1.176	15
	0.450	0.078			
	0.448	0.377			
	0.440	2.301			
	0.453	-0.608			
Alto (1.8)	1.774	1.452	+/- 15	1.528	15
	1.753	2.629			
	1.760	2.196			
	1.822	-1.234			
	1.772	1.577			

Cuadro 2. Puntos control de la curva de ciprofloxacina para determinar precisión y exactitud

Los resultados obtenidos para precisión intradía muestran un coeficiente de variación menor a 4% incluso en el punto de concentración menor en donde el valor puede ser de un máximo de 20 %. En cuanto a la exactitud fue calculada para cada punto como el porcentaje de recobro con respecto al valor nominal y los datos están conforme a especificaciones <sup>(22)</sup>

Cabe destacar que los puntos control son niveles de concentración no incluidos en las curvas de calibración para cada corrida.

Con base a los resultados anteriores se muestra que el método es preciso y exacto para la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate a las concentraciones teóricas en las que se cuantificó el fármaco.

Finalmente para demostrar que el método es selectivo y específico se realizó un blanco del plasma de primate previo a la lesión y a la administración de nuestro fármaco en estudio, el cual se muestra en la figura número 6.

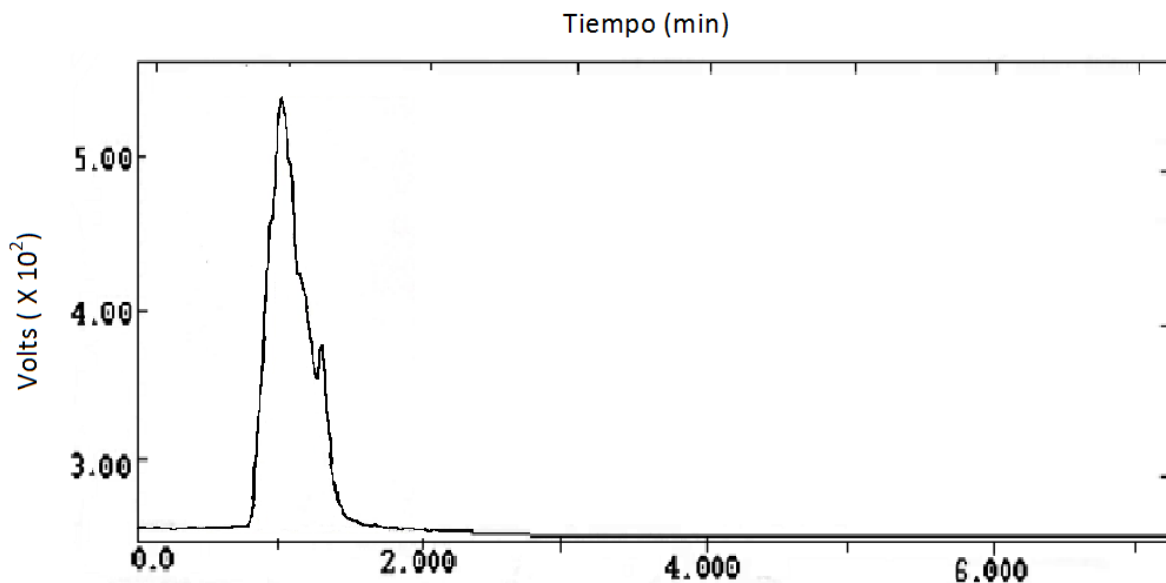


Figura 6. Cromatograma de plasma de primate previo a la administración de ciprofloxacina y la LTME (Blanco)



En este cromatograma se puede apreciar que no hay interferencia por algún componente del plasma ó de la fase móvil que interfiera en la respuesta de la ciprofloxacina y/o estándar interno, (compuestos de interés en la cuantificación) esto se puede observar en el cromatograma de la figura número 7.

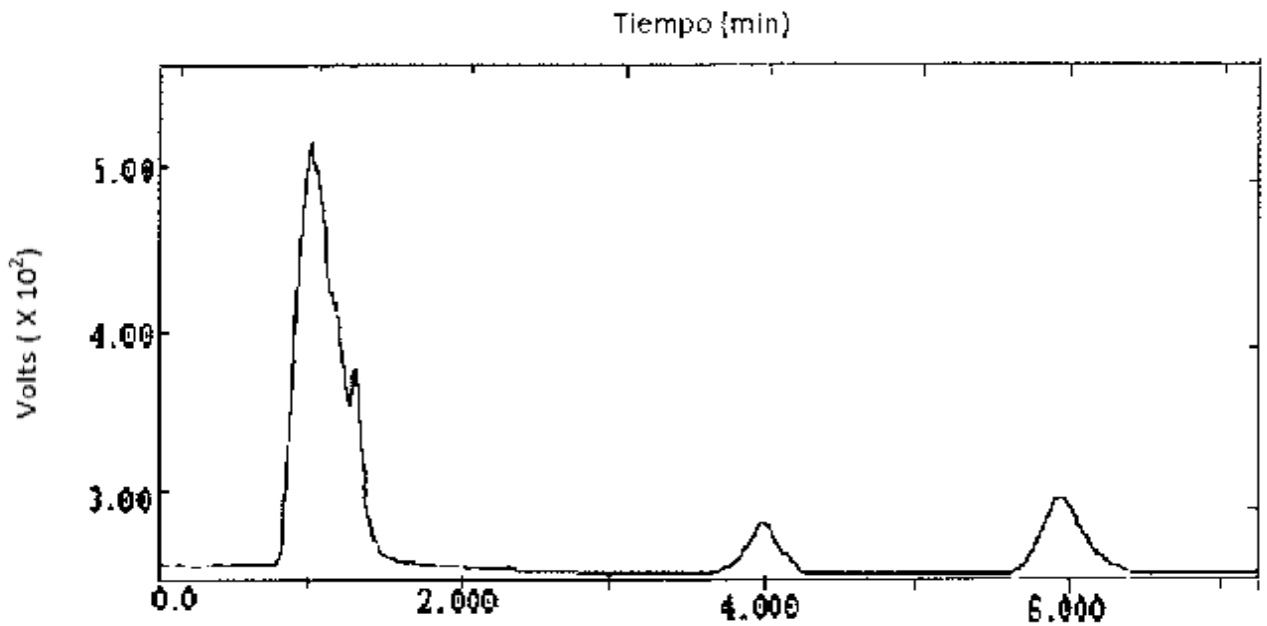


Figura número 7. Cromatograma de plasma de primate posterior a la administración de ciprofloxacina por infusión intravenosa. La ciprofloxacina mostró un tiempo de retención de 3.85 minutos; y el estándar interno (enrofloxacin) de 5.72 minutos.

Con base a los resultados anteriores se puede asegurar que el método es selectivo y específico para la cuantificación de ciprofloxacina en plasma de primate; además de que cumple con linealidad es preciso y exacto para cuantificar nuestro fármaco por lo que nuestro método es confiable para nuestro estudio farmacocinético.

#### **7.4. Estudio Farmacocinético.**

Todos los animales (monos Rhesus Hembra) elegidos para el estudio exhibieron una actividad motora normal antes de cualquier tratamiento quirúrgico; los animales mostraron una paraplejia completa posterior a la cirugía que provocó la lesión medular.

Para los estudios farmacocinéticos realizados antes (el grupo control) y después de la LTME (24 hrs, 15 días y 60 días), no fue necesario el uso de ningún tipo de anestesia.

#### **7.5. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra previo a la lesión medular (Sham)**

Para nuestro estudio comparativo fue necesario tener los datos que arrojaran un perfil plasmático de la ciprofloxacina en los primates sin lesión medular; por lo que a cada primate se le sometió a un estudio farmacocinético pre-lesión aplicando una dosis de 10 mg/kg de fármaco por infusión intravenosa durante 30 minutos.

Este estudio farmacocinético se llevó sin mayores complicaciones a lo largo de 10 horas que fue el tiempo de la toma de la última muestra.

Los resultados de los perfiles plasmáticos de ciprofloxacina contra el tiempo obtenido se muestran a continuación (figura 8).

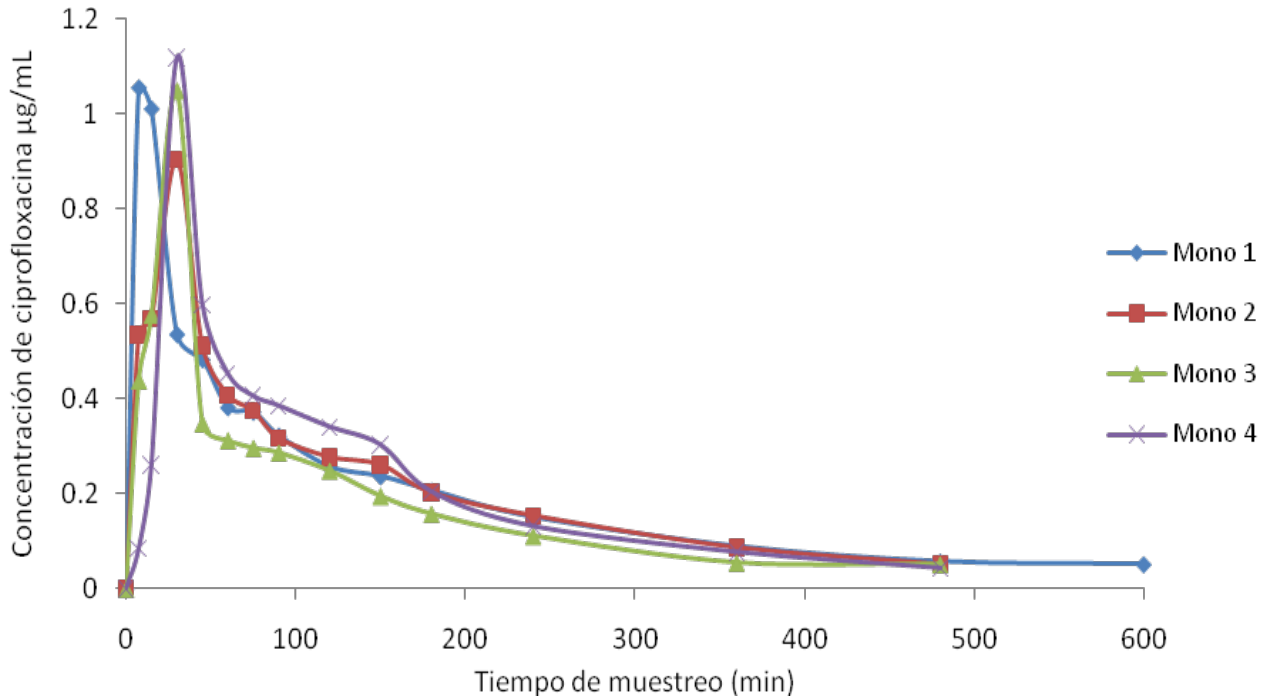


Figura 8 Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 4 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h antes de la cirugía.

El gráfico de los perfiles plasmáticos del fármaco administrado por una infusión a velocidad constante corresponde a una infusión llamada discontinua ó intermitente; la cual se administra en menos de una hora y por lo tanto no genera una descripción gráfica del estado estacionario presentado generalmente para una administración intravenosa por infusión. Se puede apreciar que el máximo de concentración plasmática del fármaco se detecta a los 30 minutos, tiempo que corresponde al termino de la administración del fármaco por infusión e inicio de la fase de eliminación del mismo, excepto el mono número uno; donde la concentración máxima se da antes que la de los otros tres primates; esto es debido a que en el momento de la infusión del medicamento no se pudo ajustar la velocidad de la bomba; lo que llevo a un termino de la infusión a los 7.5 minutos en lugar de a los 30 minutos como fue en las demás infusiones en el Sham (grupo control).

A continuación en la figura número nueve se muestra el comportamiento promedio del perfil plasmático del estudio farmacocinético de ciprofloxacina en nuestros primates de estudio antes de la lesión medular, en donde muestra un error estándar mucho mayor en los primeros treinta minutos que es el tiempo que duró la infusión (atribuido al mono número 1 que ya se explico) con respecto a los demás puntos del muestreo.

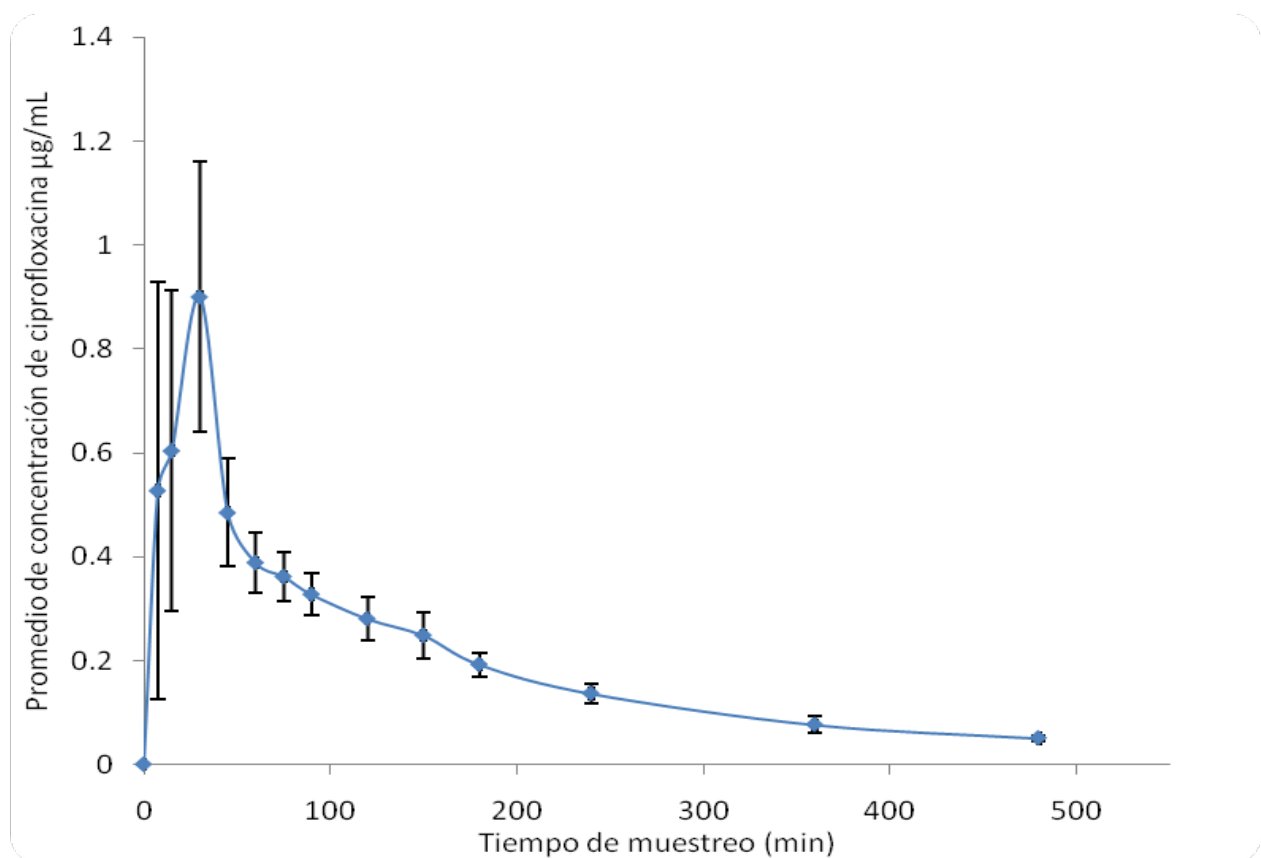


Figura 9. Promedio del Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 4 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h antes de la cirugía.

En base a este perfil promedio se realizó las comparaciones contra los perfiles plasmáticos promedio a las 24 horas, 15 días y 60 días para cada mono.

Los perfiles individuales (figura 8) se aprecian muy similares, condiciones que conllevan a que los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos no presenten una gran variación, como se observa para el volumen de distribución, área bajo la curva y concentración máxima encontrada; así como en el valor de la depuración en 3 de los cuatro monos son muy similares (cuadro 3).

Mono	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g*min/mL}$ )
1	1.054	18.608	148.607	0.087	96.087
2	0.904	18.695	146.542	0.088	94.802
3	1.048	18.385	112.219	0.114	70.036
4	1.118	14.950	112.123	0.092	95.776

Cuadro 3. Parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina por infusión intravenosa administrada a 4 monos Rhesus hembras antes de la LTME.

El promedio de estos parámetros farmacocinéticos sin LTME y su variación encontrada se muestran en el cuadro número cuatro, los cuales no difieren de lo que se ha reportado en humanos o en otras especies animales <sup>(2,19 y 34)</sup>.

Promedio	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g*min/mL}$ )
Sham	1.031+/- 0.092	17.659+/- 1.811	129.873+/-20.45	0.095+/-0.012	89.176+/-12.77

Cuadro 4 Promedio de los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina y su error estándar, administrada por infusión intravenosa a 4 monos Rhesus hembras antes de la LTME.

Cabe mencionar que se observa una diferencia entre el máximo observado en el perfil plasmático de la figura número 7 y el máximo que refleja el cuadro 3, esta diferencia se debe a que en el perfil plasmático se tomo una media y las concentraciones máximas se ven reflejados a los 30 min, pero como ya se explico anteriormente en el dato del mono 1 la concentración máxima se da en un tiempo menor; por lo que en el cuadro número 3 se tomaron las concentraciones máximas sin depender del tiempo.

## 7.6. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra a las 24 h posteriores a la cirugía.

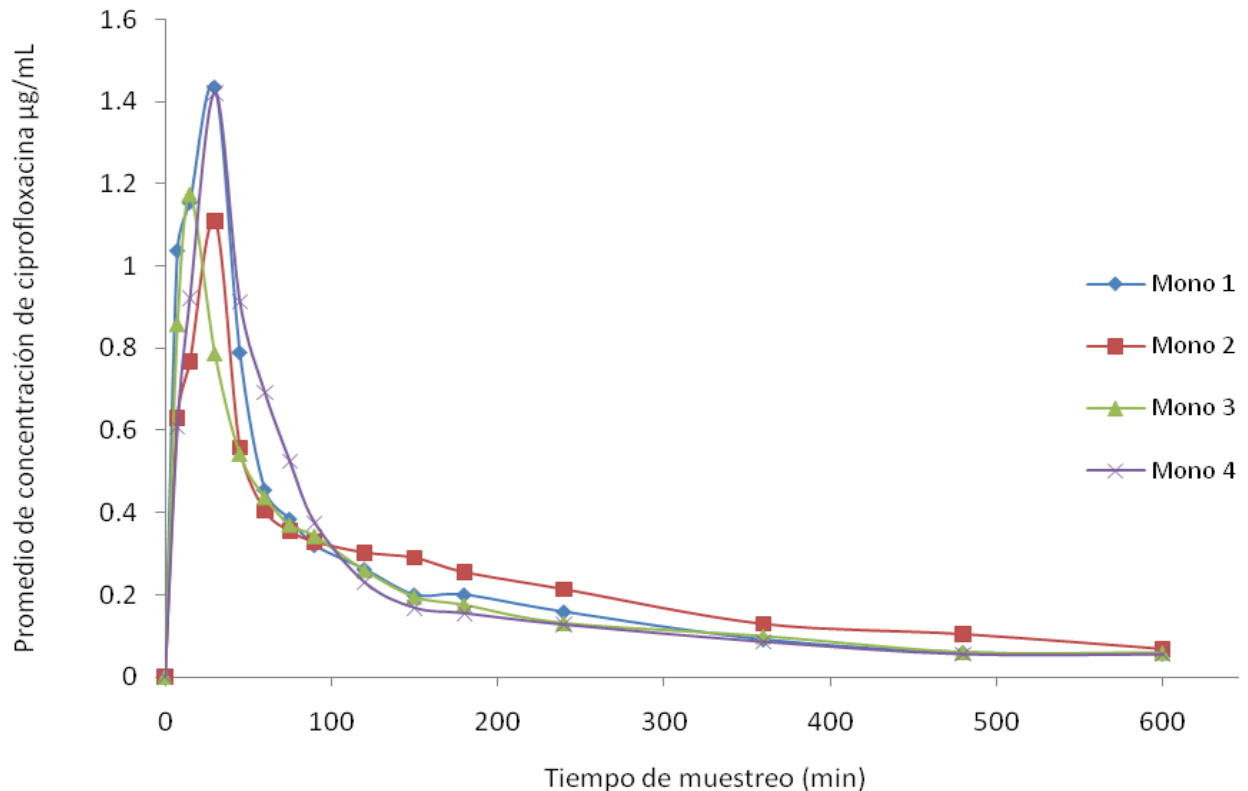


Figura 10. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 4 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h 24h posteriores a la LTME.

En la figura número 10 se muestra el perfil plasmático de ciprofloxacina en monos 24 horas posteriores a la LTME, se puede observar que los perfiles plasmáticos siguen comportándose como una infusión intermitente, alcanzando un máximo alrededor de los 30 minutos para la mayoría de los monos; y una posterior caída aparentemente biexponencial, que concuerda con lo que se describe en la literatura para ciprofloxacina; es cuya primera parte se visualiza más rápida que la segunda parte; sin embargo en el perfil del mono número tres, la infusión terminó a los 15 minutos y no a los 30 minutos como en los otros casos; debido a esta razón la curva presenta su máximo en menor tiempo que en el resto de los otros monos.

La figura 11 y el cuadro 5 resumen los resultados de los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos 24 horas después de la lesión medular.

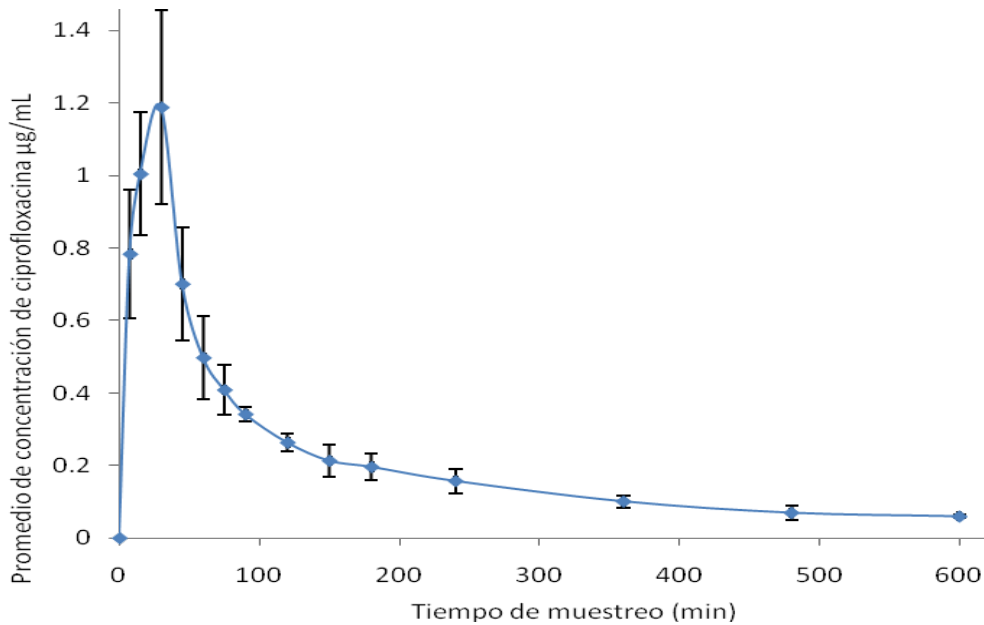


Figura 11 Promedio del Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 4 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h 24h posteriores a la LTME

Promedio	$[ ]_{\max}$ (µg/mL)	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ (µg*min/mL)
24 hrs	1.285+/-0.168	20.557+/-3.193	200.474+/-29.145	0.071+/-0.0062	113.648+/-11.85

Cuadro 5. Promedio de los parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina por infusión intravenosa administrada a 4 monos *Rhesus* hembras 24 hrs posteriores a la LTME.

En la figura número 12 se muestra el comparativo del perfil promedio sin lesión medular y el perfil promedio 24 horas después de LTME.



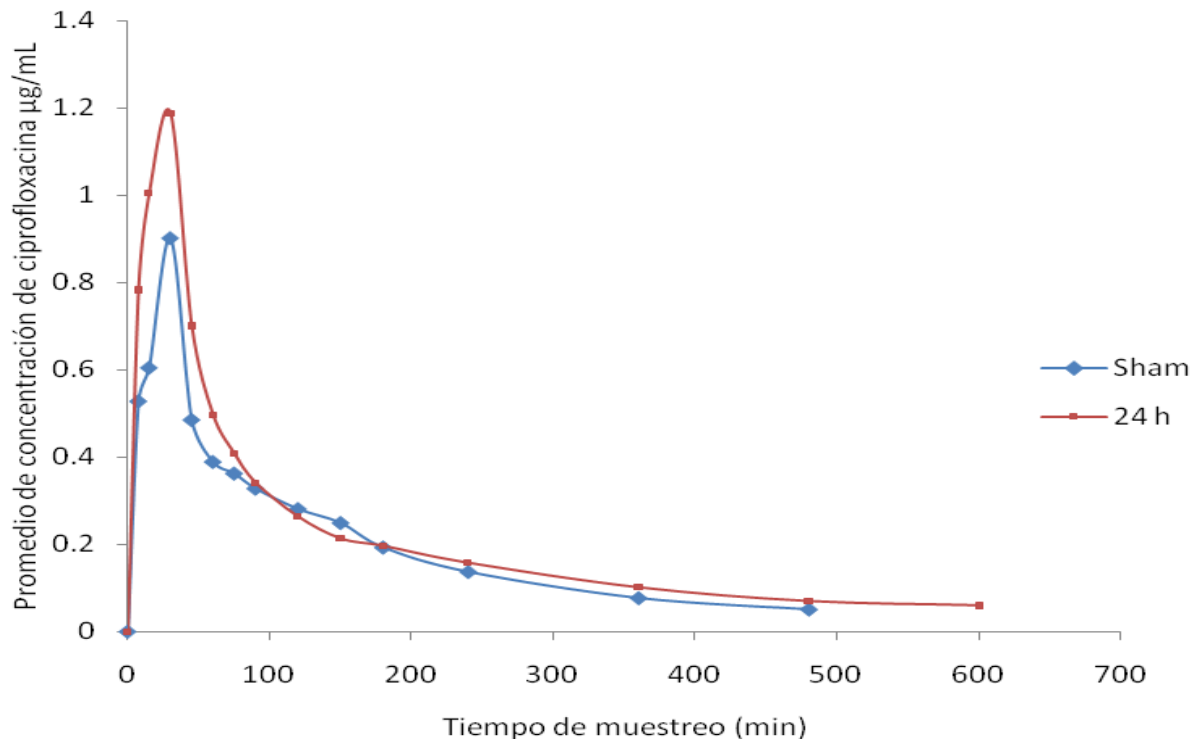


Figura 12 Promedios del Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 4 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h; Pre-lesión y a 24h posteriores a la LTME

A las 24 hrs posterior a la lesión, se presenta la llamada etapa de choque medular y es donde ocurren cambios sistémicos significativos a todos los niveles del organismo<sup>(4,5,10,15,24 y 26)</sup>

En la etapa aguda de la lesión conocida como choque medular (alcanzada inmediatamente posterior a la lesión), trae una serie de trastornos progresivos en algunos órganos donde el daño vascular y la isquemia se presentan como algunas de sus principales consecuencias<sup>(5)</sup>. También se producen diversos factores tróficos y comienza el desarrollo de complejos eventos neuroquímicos autodestructivos como: pérdida de la regulación iónica, que lleva a la suspensión del impulso nervioso y a la formación de edemas; se incrementa el calcio libre intracelular, se liberan grandes cantidades de glutamato, aspartato y el estrés oxidante en donde se pierde el balance entre la generación de radicales libres y la capacidad de las defensas antioxidantes<sup>(10)</sup>.

Ligado a la isquemia se provocan alteraciones cardiovasculares, bajando el volúmen circulatorio y disminuye en la distribución del flujo sanguíneo a diversos órganos entre ellos el hígado, riñon y aparato gastrointestinal<sup>(33)</sup>

Lo anterior puede ser la explicación a lo observado en la figura 12, en la cual se aprecia que 24 h después de una LTME, ésta provoca que haya una mayor cantidad de fármaco en el organismo del grupo lesionado, que en el grupo control (sham); también puede observarse que el fármaco fué cuantificable en mayor tiempo de muestreo (600 min) en el grupo lesionado que el grupo control.

Condiciones que pueden explicar el incremento en la biodisponibilidad (ABC), tiempo de vida media y volumen de distribución del fármaco en los monos 24 h después de la LTME con respecto a lo observado en el grupo control (Sham), y la disminución en la depuración del fármaco y un incremento en el tiempo de vida media como se observa en el cuadro número 6.

Promedio	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	ABC <sub>0-t</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ )
Sham	1.031 $\pm$ 0.092	17.659 $\pm$ 1.811	129.873 $\pm$ 20.45	0.095 $\pm$ 0.012	89.176 $\pm$ 12.77
24 h	1.285 $\pm$ 0.168	20.557 $\pm$ 3.193	200.474 $\pm$ 29.145	0.071 $\pm$ 0.0062	113.648 $\pm$ 11.85

Cuadro 6. Promedio de los parámetros farmacocinéticos y su error estándar de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa a 4 monos Rhesus hembras; pre-lesión y a 24 horas posteriores a la LTME.

Estos resultados no difieren de lo reportado con otros antibióticos como amikacina y gentamicina (fármacos que al igual que la ciprofloxacina, su eliminación es principalmente por vía renal) en donde indican que estas alteraciones en su farmacocinética después de una lesión médula se deben a los cambios del tono venomotor alterado y una erosión de la masa muscular que contribuye al incremento del fluido extracelular provocado por la lesión. <sup>(27,28 y 30)</sup>

Además se ha documentado que la proporción entre el transporte y la distribución de los fármacos en el organismo son directamente proporcionales al gasto cardíaco que como ya se ha explicado éste es una de las muchas alteraciones que presenta un paciente con LTME, y que como hay cambios en el flujo sanguíneo tanto en hígado como en riñón; esto puede impactar en la depuración y el metabolismo del fármaco <sup>(16)</sup>

### 7.7. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra a los 15 días posteriores a la cirugía.

A los 15 días posteriores a la lesión medular los monos Rhesus hembra mostraron distintas conductas (condición fisiopatológica grave y depresión) que llevaron al deceso de dos de los cuatro monos en el estudio. Razón por la que, para 15 y 60 días posteriores a la lesión solo se presentan los resultados y análisis para dos monos Rhesus hembra.

Los perfiles plasmáticos individuales de ciprofloxacina en monos Rhesus 15 días después de la LTME se muestran en la figura número 13, no obstante que en apariencia presentan gran similitud, en los parámetros farmacocinéticos se evidencia una variabilidad alta entre los dos monos estudiados en esta fase (cuadro 7).

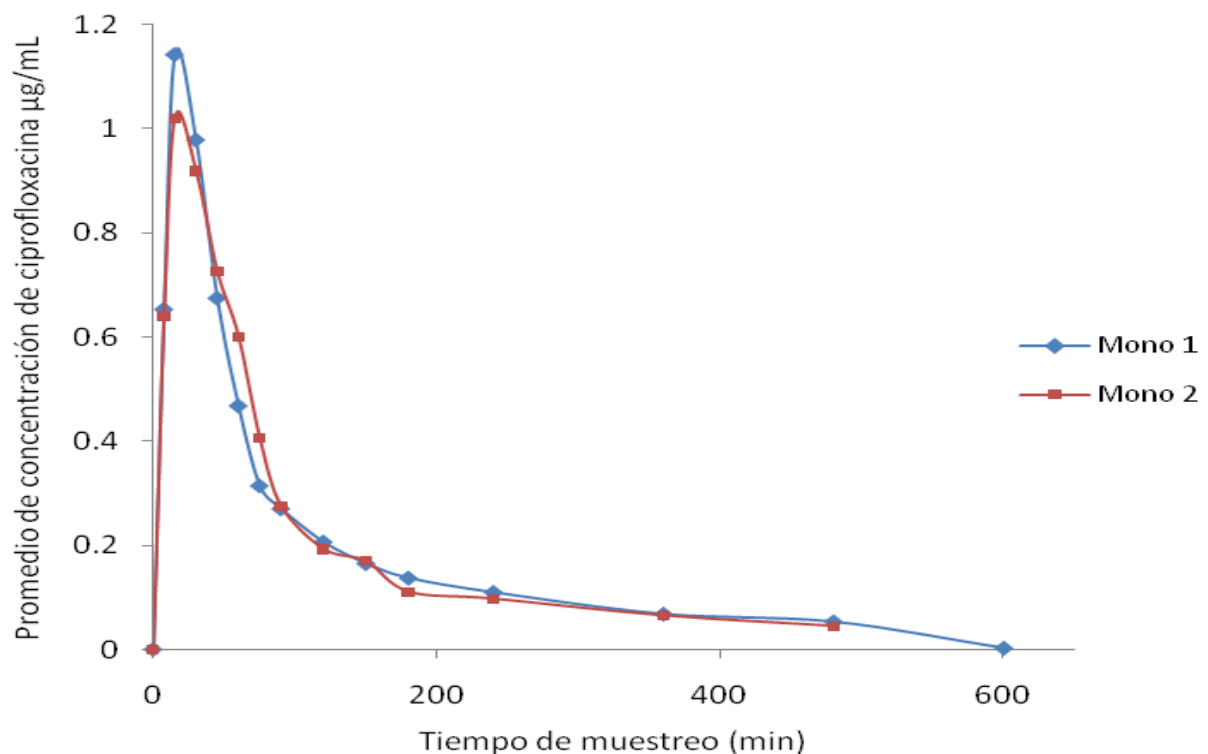


Figura 13. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 2 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h 15 días posteriores a la LTME.

Mono	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g}^*\text{min/mL}$ )
1	1.142	21.310	155.745	0.095	80.879
2	1.020	9.855	60.986	0.112	80.975

Cuadro 7. Parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina por infusión intravenosa administrada a 2 monos Rhesus hembras 15 días posteriores a la LTME.

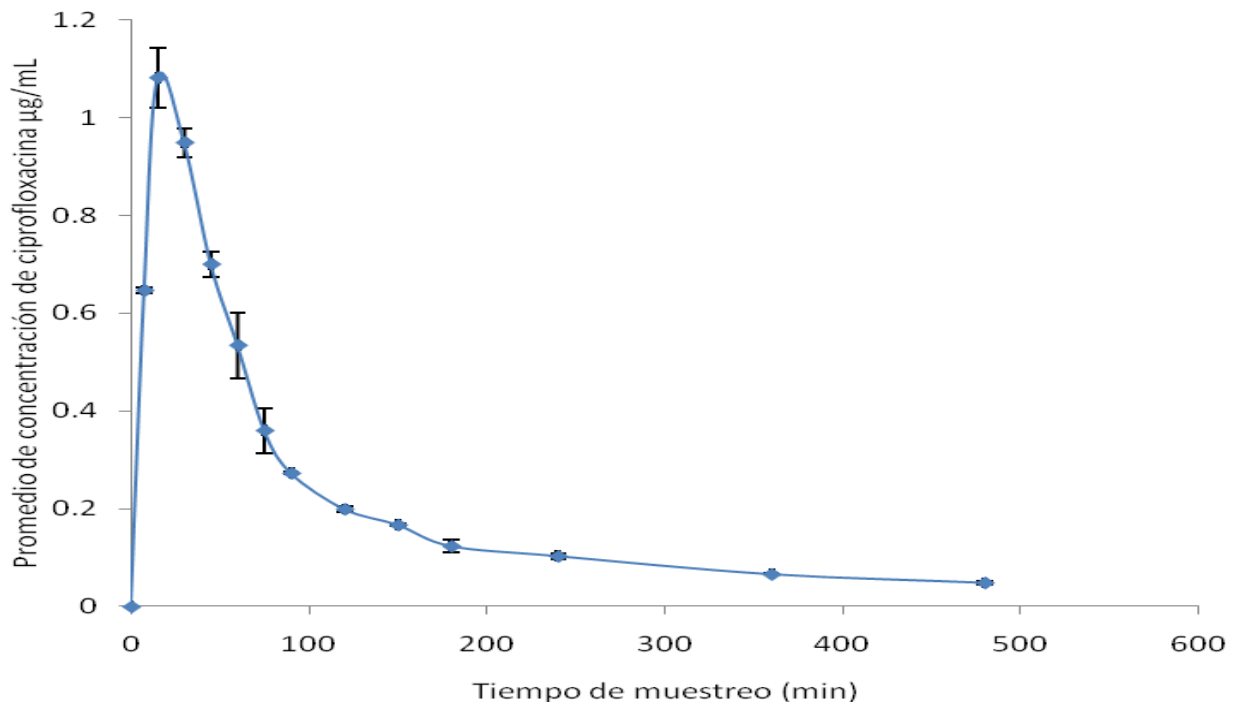


Figura 14. Promedio del perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 2 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h 15 días posteriores a la LTME

No obstante lo anterior, al comparar los perfiles plasmáticos promedio obtenidos en condiciones control (sham) y 24 hrs posteriores a la lesión; quince días después de la cirugía parecería que los parámetros farmacocinéticos regresarán a un estadio original, al no evidenciarse claramente el aumento del volumen de distribución,

prolongamiento del  $t_{1/2}$  y/o disminución de la depuración del fármaco como lo obtenido a las 24 hrs (cuadro 8, figura número 14).

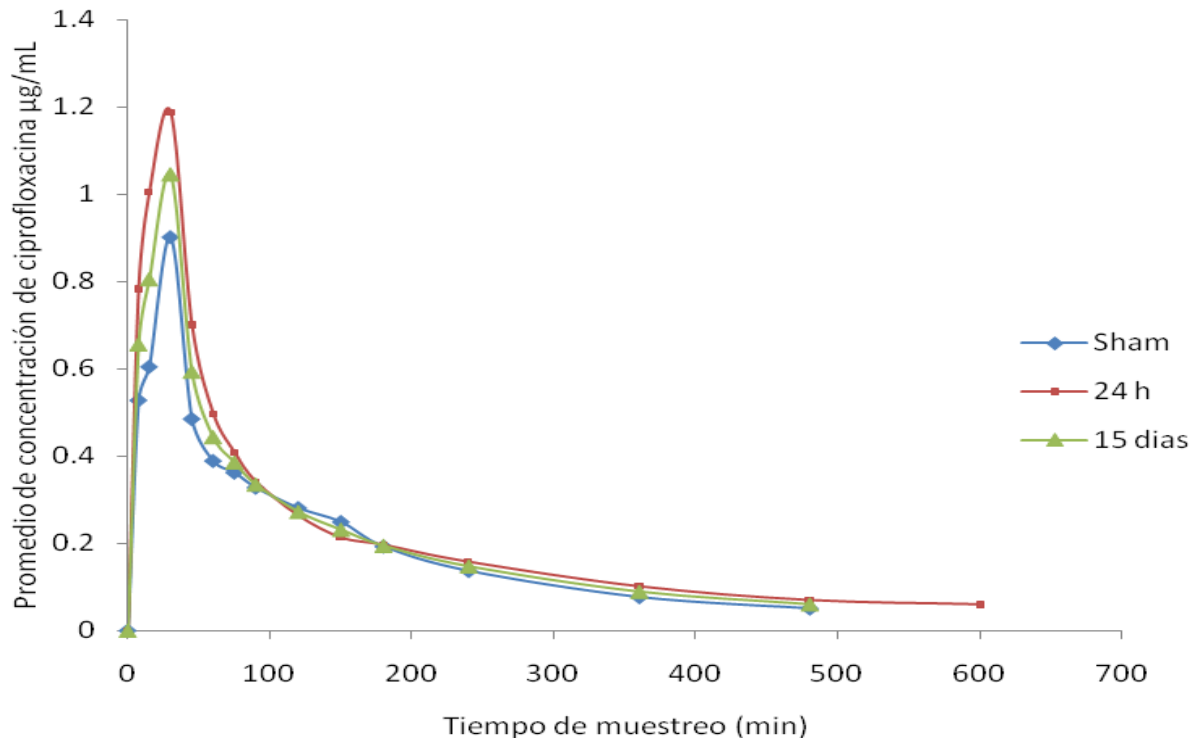


Figura 15. Promedios del Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h; Pre-lesión, 24h y 15 días posteriores a la LTME

Promedios	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ )
Sham	1.031+/- 0.092	17.659+/- 1.811	129.873+/-20.45	0.095+/-0.012	89.176+/-12.77
24 h	1.285+/-0.168	20.557+/-3.193	200.474+/-29.145	0.071+/-0.0062	113.648+/-11.85
15 días	1.081+/-0.086	15.583+/-8.09	108.365+/-67.01	0.103+/- 0.012	80.927+/- .067

Cuadro 8. Promedio de los parámetros farmacocinéticos y su error estándar de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa a monos *Rhesus* hembras; pre-lesión, 24 horas y 15 días posteriores a la LTME.

### 7.8. Análisis farmacocinético de ciprofloxacina en plasma de mono Rhesus hembra a los 60 días posteriores a la cirugía.

Condiciones farmacocinéticas similares a los 15 días fueron encontradas a los 60 días después de la lesión, es decir, perfiles plasmáticos muy similares (figura número 16) y variabilidad alta como en el caso de la  $t_{1/2}$  en donde el mono uno muestra un valor casi 4 veces mayor al del mono 2, así mismo casi triplica su valor de Vd (Cuadro 9); sin embargo la diferencia entre los datos de la depuración no es tan marcada y se esperaría que esta fuera mayor de acuerdo a la diferencia de los parámetros farmacocinéticos ya mencionados y a lo obtenido en el resto del estudio.

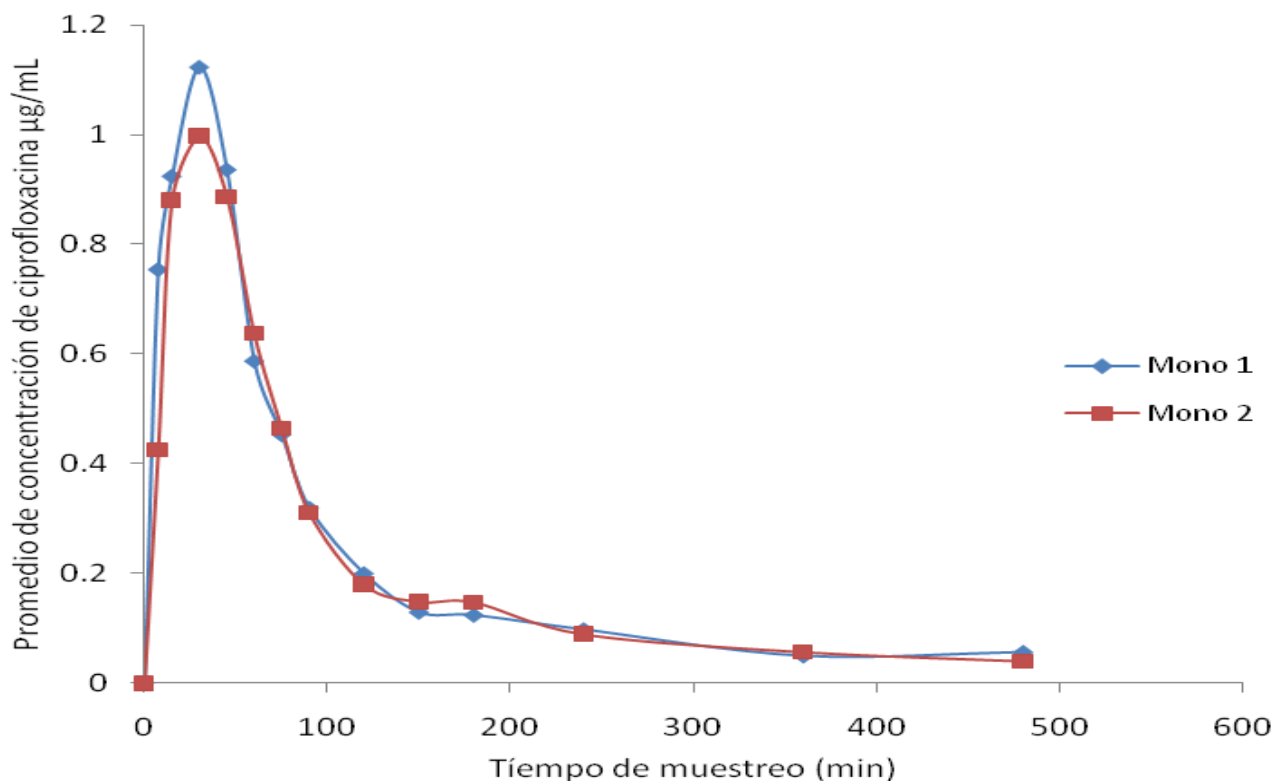


Figura 16. Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a 2 monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h 60 días posteriores a la LTME

Mono	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g}^*\text{min/mL}$ )
1	1.123	26.162	215.826	0.084	88.304
2	0.998	9.077	57.581	0.109	84.087

Cuadro 9. Parámetros farmacocinéticos de ciprofloxacina por infusión intravenosa administrada a 2 monos Rhesus hembras 60 días posteriores a la LTME.

Con fines comparativos entre los diferentes tiempos de estudio (Sham, 24 h, 15 días y 2 meses), en la figura número 17 se muestra un promedio del perfil plasmático 2 meses después de la cirugía, donde sus parámetros farmacocinéticos están expuestos en el cuadro número 10.

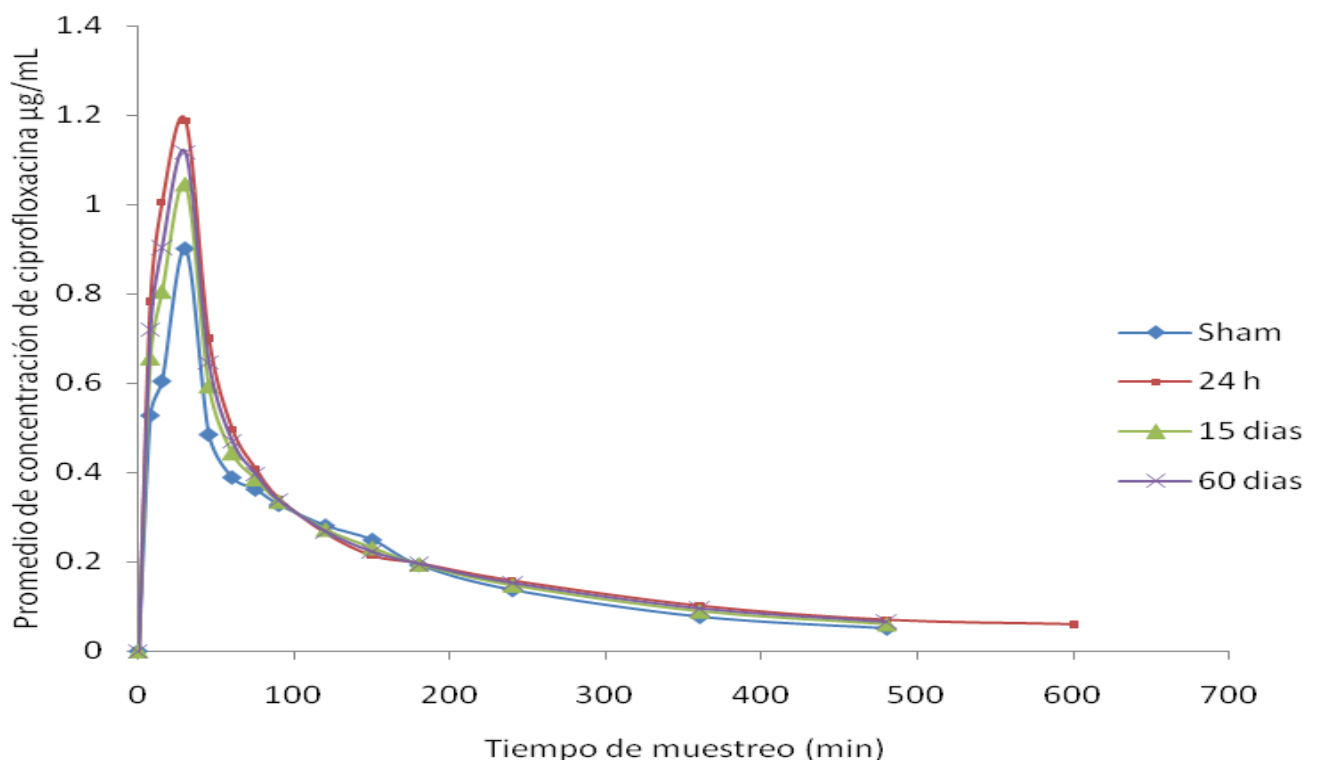


Figura 17. Promedios del Perfil plasmático de ciprofloxacina administrado por infusión intravenosa a monos *Rhesus* hembras utilizando una dosis de 10 mg/Kg a una velocidad de 20 mL/h; Pre-lesión, 24h ,15 días y 2 meses posteriores a la LTME.



Promedio	$[ ]_{\max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vd (L/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (L/kg*min)	$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g}^*\text{min/mL}$ )	Ke ( $\text{min}^{-1}$ )
Sham	1.031+/- 0.092	17.659+/- 1.811	129.873+/-20.45	0.095+/-0.012	89.176+/-12.77	0.0054+/- 0.0009
24 h	1.285+/-0.168	20.557+/- 3.193	200.474+/-29.145	0.071+/-0.0062	113.64+/-11.85	0.0035+/- 0.0006
15 días	1.081+/-0.086	15.583+/- 8.09	108.365+/-67.01	0.103+/- 0.012	80.927+/- .067	0.0079+/- 0.0048
60 días	1.061+/- 0.088	17.619+/- 12.08	136.703+/- 111.89	0.097+/- 0.017	86.195+/- 2.98	0.0076+/- 0.0062

Cuadro 10. Promedio de los parámetros farmacocinéticos y su error estándar de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa a monos Rhesus hembras; pre-lesión, 24 horas, 15 días y 2 meses posteriores a la LTME.

Las siguientes figuras muestran como después de 15 y 60 días posteriores a una lesión medular, los parámetros farmacocinéticos como Vd,  $t_{1/2}$  Cl y ABC para la ciprofloxacina administrada por una infusión intravenosa, parecen acercarse a las condiciones normales (antes de la lesión, sham) en los animales en estudio; en tanto a las 24 hrs los cambios parecen ser más evidentes (figuras 17, 18, 19 y 20).

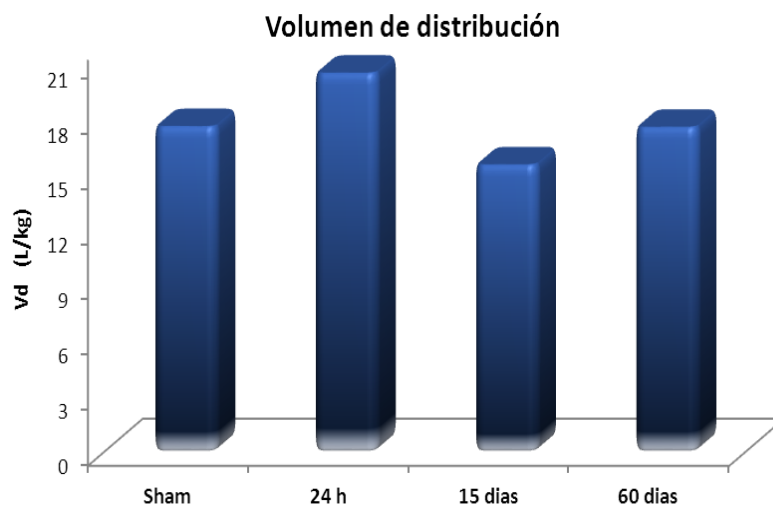


Figura 18. Volumen de distribución promedio de ciprofloxacina en monos Rhesus sin lesión, 24 horas, 15 días y 60 días después de la LTME.

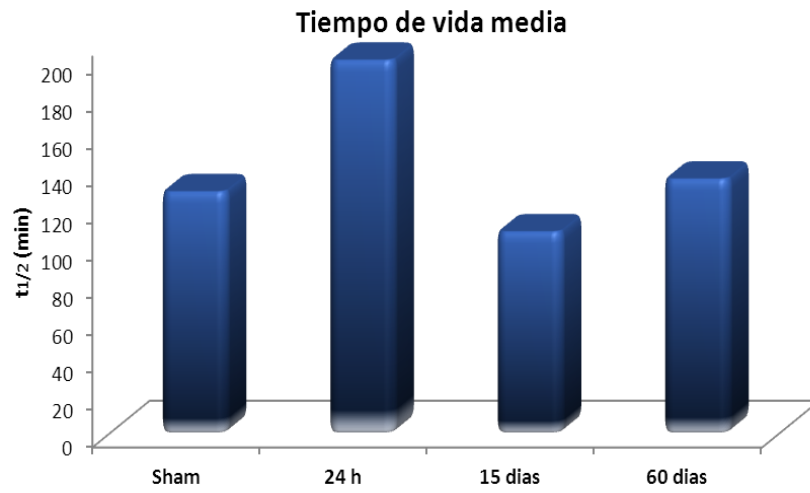


Figura 19 Tiempo de vida media promedio de ciprofloxacina en monos Rhesus sin lesión, 24 horas, 15 días y 60 días después de la LTME.

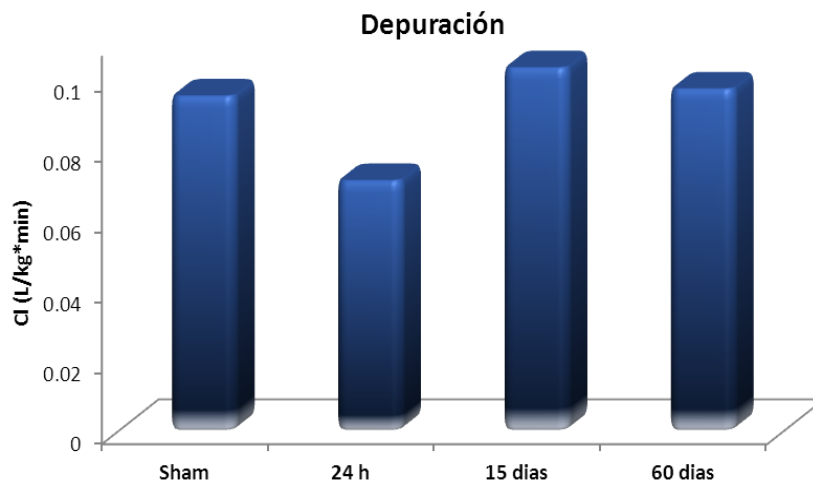


Figura 20. Depuración promedio de ciprofloxacina en monos Rhesus sin lesión, 24 horas, 15 días y 60 días después de la LTME.

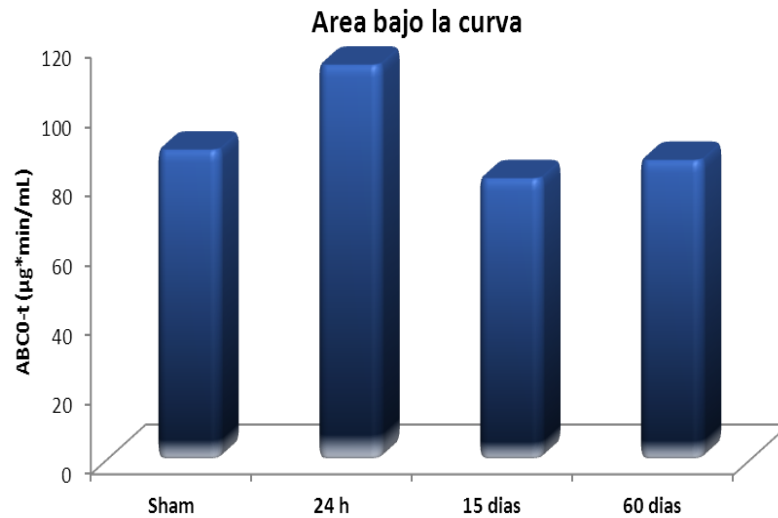


Figura 21. Área bajo la curva promedio de ciprofloxacina en monos Rhesus sin lesión, 24 horas, 15 días y 60 días después de la LTME.

Lo observado a los 15 y 60 días posterior a la LTME puede ser explicado por el hecho de que muy probablemente se esté regulando nuevamente el flujo sanguíneo sumamente alterado al inicio de la lesión y que aunado a la disminución del edema que surge posterior a la LTME <sup>(16)</sup> pudieran explicar en parte la tendencia al restablecimiento de los parámetros farmacocinéticos encontrados.

Los resultados obtenidos a 60 días (considerada como etapa crónica en nuestro estudio) difieren de lo reportado en algunos estudios en humanos, <sup>(25,26)</sup> en donde en la etapa crónica si hay alteraciones farmacocinéticas con respecto al grupo control (sham).

Si consideramos que a los 60 días después de la lesión medular se observó una disminución en la masa muscular de manera significativa en los monos de estudio, donde en uno de ellos hubo una pérdida del 9.3% de su peso con respecto al inicio del estudio y para el otro una pérdida más significativa (33.1%) y dado que la ciprofloxacina se une en un 30 % a proteínas plasmáticas; lo que significa que la mayor parte del fármaco se encuentra en estado libre y por tanto difunde a través de las paredes capilares, incrementado su concentración en el líquido extra vascular<sup>(6)</sup>. Era de esperarse un cambio significativo en el volumen de distribución y que estaría induciendo cambios en la depuración y vida media del fármaco, hecho que no

ocurrió o que no se evidencio en esta parte del estudio por el número bajo de animales estudiados y la alta variabilidad presentada. No obstante lo anterior; este estudio evidencia al igual que otros estudios en modelo experimental menos complejo (rata); que la lesión medular en diferentes estadios de tiempo, impacta en la farmacocinética de fármacos con metabolismo ó depuración dependiente del flujo sanguíneo de forma mas evidente en la etapa aguda de la lesión.

## 8. CONCLUSIONES

- Los parámetros farmacocinéticos (ABC,  $t_{1/2}$ , Cl y Vd) de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa a monos Rhesus hembra 24 horas después de la LTME se ven afectados de manera significativa con respecto a nuestro grupo control, lo que comprueba nuestra hipótesis que posterior al traumatismo medular se desencadena un segundo conjunto de procesos de destrucción que aumenta el daño al tejido medular provocando diversas alteraciones sistémicas y metabólicas.
- La alteración en los parámetros farmacocinéticos solo se observa de manera significativa a las 24 horas después del daño medular; 15 días y 60 días posteriores a la lesión parecería que tales parámetros farmacocinéticos regresan o se ven compensados a valores muy semejantes a los del grupo control.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aiche J M, Guyot A M. Biofarmacia. 1983. Editorial el manual moderno. México D.F. pp: 36-39.
2. Albarellos G. A., Kreil V. E. and Landoni M. F. 2004. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats.
3. Alonso M M. Farmacocinética de ciprofloxacina administrada por infusión intravenosa en primate no humano con lesión traumática de medula espinal. Tesis experimental; UNAM FES Zaragoza Campus II; 2006; 45-52.
4. Anderson DK. Chemical and cellular mediators in spinal cord Injury. Journal of Neurotrauma, 1992 8(2): 143-146
5. Atkinson P P, Atkinson J L, Spinal shock. 1996. Mayo Clin Proc. 71: 384-387.
6. Bravo G., Rojas R., Larios F. , Hong E., Castañeda G., Rojas G., Guizar G. Mechanismsinvolved in the cardiovascular alterations immediately after spinal cordinjury. Life Sciences, 2001: 68: pp 1527-1534.
7. Cid Cárcamo Edison. Introducción a la farmacocinética. 1982. Facultad de ciencias básicas y farmacéuticas. Santiago Chile. pp: 1-44.
8. Clark B y Smith D. 1989. Introducción a la farmacocinética. Editorial Acribia, España.p.p. 32-38.
9. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. Métodos analíticos. Guía de validación. Edición 2002.
10. Diaz R A, Guzar S G, Rios C C Estrategias neuroprotectoras después de una lesión traumática de medula espinal. Revista medica IMSS 40 (5); 437-455.

11. Figueroa J.L. 1999. Glosario farmacológico. Ed Limusa, 2a Ed. México. pp: 40-49.
12. Fuentes L. Griselda, Guízar S. Gabriel, García L. Rebeca. Effect of experimental spinal cord injury on salicylate bioavailability after oral aspirin administration. J Pharmacol Toxicol. 1999. (42):93-97.
13. Gilbaldi M. Farmacocinética, Editorial Reverte: España, 1982. pp: 6-17.
14. Goodman G. 1996. Las bases farmacocinéticas de la terapéutica. Ed Mc Graw Hill. 9a Ed. pp 115-134.
15. Guízar-Sahagún G et al. Pathophysiological mechanisms Involved in systemic and metabolic alterations secondary to spinal cord injury. pharmacol. Soc. 1998. (41): 237-240
16. Guízar-Sahagún G, Velasco H L Systemic microcirculation after complete high and low thoracic spinal cord section in rats. J. Neurotrauma 21, 1614-1623.
17. Helena Curtis, N Sue Barnes (2003) Biología, Editorial medica panamericana sexta edición Cap 47 1243 – 1255.
18. Ibarra A, Et al. Alteration of cyclosporin-A pharmacokinetics after experimental spinal cord injury. Journal of Neurotrauma. 1996. 13(5):267-272.
19. Imre S., Dogaru M. T., Vari C.E., Muntean T. and Kelemen L. 2003. Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma.
20. Katzung, B. Farmacología básica y clínica, Novena edición, Editorial el manual moderno México 2005 pp. 10,37, 771,773, 774,781.
21. Munson P. Principles of pharmacology Basic. Concepts and clinical applications; 2ª Ed. New York; Chapman & Hall, 1998. 49-53.g

22. NOM-177-SSA1-1998. que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
23. Rowland Malcolm and Tozer N. Thomas.(1995). Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications 3rd Edition. Williams & Wilkins.U.S.A. pp: 18-33, 137-183, 248-266, 313-339.
24. Sahrgel L, Drug distribution and protein binding in applied biopharmaceutical and pharmacokinetics. 1995. Appleton & Lange. USA, 79-81.
25. Salamanca, F. Biología molecular en medicina; nuevos tratamientos en las lesiones de la medula espinal. centro médico nacional siglo XXI IMSS. Gaceta Medica de México 2002; vol. 138 (4):379-380.
26. Segal J L, Brunnemann SR. Clinical Pharmacokinetics in patients with spinal cord injuries. Clinical pharmacokinetics and disease processes. 1989; 17(2): 109-129.
27. Segal L Jack. Et al. Gentamicin disposition kinetics in humans with spinal cord injury. Paraplejia. 1985. (23):47-55.
28. Segal L. Jack. Et al. Amikacin pharmacokinetics in patients with spinal cord injury. Pharmacotherapy. 1988. 8(2): 79-81.
29. Segal L. Jack. Et al. Impaired absorption of intramuscularly administered gentamicin in spinal cord injury. Current therapeutic research. 1986. 39(6):961-969.
30. Segal L. Jack., Et al. Gentamicin Bioavailability and single-dose Pharmacokinetics in spinal cord injury. Drug intelligence and clinical pharmacy. 1988. (22):461-465.



31. Shah, P.V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Shelly, J.P., Yacobi, A., Laylof, T., Viswahathan, C.T., Cook, E., McDowall, R.D., Pittman, K.A., y Spector S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of pharmaceutical sciences*: 81 (3): 309 – 312
  
32. Shargel L, Andrew B.C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 1993. 3rd Edition. Appleton and lange. U.S.A. pp: 33-47, 169193.
  
33. Tator, C.H. Fehlings. M.G. Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. 1991. *J Neurosurg* 75: 15-26.
  
34. Vybiralová Z., Nobilis M., Zoulova J., Kvetina J. and Petr P. Highperformance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005(37): 851-858.