



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO PBPK
DE COCAÍNA EN RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGA**

PRESENTA

LAURA NAYELI CAMACHO GARCÍA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ARACELI SALAZAR PEREYRA

VOCAL: ALEJANDRA QUIJANO MATEOS

SECRETARIO: PAULINA DEL VALLE PEREZ

1er. SUPLENTE: ANTONIO ELIAS KURI PINEDA

2° SUPLENTE: JUAN LUIS GUTIERREZ VELAZQUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA FORENSE. CIENCIA FORENSE, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

LABORATORIO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES, TRIBUNAL SUPERIOR DE JUSTICIA DE LA CIUDAD DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Mtra. ALEJANDRA QUIJANO MATEOS

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. MARIA ELENA BRAVO GOMEZ

SUSTENTANTE:

CAMACHO GARCIA LAURA NAYELI

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Proyecto TA200316 y a CONACyT, Convocatoria 2014 de Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, Solicitud 247925, por el apoyo económico para llevar a cabo este proyecto.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

UNODC: (acrónimo en inglés) Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito

PBPK: (acrónimo en inglés) Modelo farmacocinético basado en la fisiología

PK: (acrónimo en inglés) Farmacocinética (o)

IVIVE: Extrapolación in vitro-in vivo

IV: intravenosa

SNC: Sistema Nervioso Central

COC: Cocaína

BE: Benzoilecgonina

EME: Éster de metilecgonina

EDO: Ecuación diferencial ordinaria

EFS: Extracción en fase sólida

CG: Cromatografía de gases

BSTFA: N, O - Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida

TMCS: Trimetilclorosilano

SSI: Solución Salina Isotónica

Parámetros fisiológicos

Q_c: Gasto cardíaco total

Q_T: Flujo sanguíneo en el tejido

V_T: Volumen del tejido

P_T: Coeficiente de partición tejido:sangre

Subíndices de los parámetros empleados en el modelo

cer: Cerebro	b: Bazo	hu: Hueso
r: Riñones	int: Intestino	p: Piel
h: Hígado (Total)	cor: Corazón	fa: Adiposo
ha: Arteria hepática	pul: Pulmón	a: Sangre arterial
hv: Vena hepática	m: Músculo	v: Sangre venosa

Parámetros farmacocinéticos

Vd: volumen de distribución	CL _h : aclaramiento hepático
CL: aclaramiento total	MRT: tiempo medio de retención
CL _r : aclaramiento renal	t _{1/2} : tiempo de vida media

Símbolos

Unidad SI	Término
cm	Centímetros
kg	Kilogramos
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
L	Litros
mL	Mililitros
°C	Grados centígrados
h	horas
min	minutos
S	segundos

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Conexión de las sustancias abuso con el crimen: un reto para el toxicólogo forense.....	6
1.2. Los modelos Farmacocinéticos basados en la fisiología (PBPK): una herramienta de interpretación forense	7
2. OBJETIVOS	8
Objetivo general:	8
Objetivos particulares:	8
3. HIPÓTESIS	8
4. ANTECEDENTES	9
4.1. MODELOS FARMACOCINÉTICOS	9
4.1.1. Modelos farmacocinéticos tradicionales y sus limitaciones.....	9
4.2. MODELOS FARMACOCINÉTICOS BASADOS EN CONSTANTES FISIOLÓGICAS (PBPK)	14
4.2.1. ¿Qué son los modelos PBPK?	14
4.2.2. ¿Para qué se usan los modelos PBPK?.....	20
4.3. SUSTANCIA DE ESTUDIO: COCAÍNA.....	22
4.3.1. Propiedades generales y uso.....	22
4.3.2. Estructura y Actividad: Efectos y toxicidad	23
4.3.3. Farmacocinética	24
4.3.4. Farmacodinamia.....	29
4.3.5. Modelos farmacocinéticos existentes para la cocaína	32

5. PROCEDIMIENTO.....	35
5.1. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO PBPK Y SU SIMULACIÓN IN SILICO.....	35
5.1.1. Representación del modelo.....	35
5.1.2. Parametrización del modelo.....	36
5.1.3. Simulación del modelo.....	39
5.2. COMPARACIÓN DEL MODELO PBPK CON DATOS EXPERIMENTALES.....	39
6. RESULTADOS.....	40
7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES.....	53
9. PERSPECTIVAS.....	53
10. REFERENCIAS.....	55
11. ANEXO-A: Estudio preliminar de administraciones controladas en animales de laboratorio.....	61
11.1. Experimentación en animales.....	61
11.1.1. <i>Administración de la cocaína.</i>	62
11.1.2. <i>Recolección de muestras.</i>	63
11.2. Determinaciones analíticas.....	65
11.2.1. <i>Preparación de disoluciones</i>	66
11.2.2. <i>Preparación de las muestras biológicas para el análisis por CG</i>	68
11.2.3. <i>Análisis cromatográfico</i>	70
11.2.4. <i>Cuantificación de las muestras</i>	71
11.3. Resultados Experimentales.....	72
12. ANEXO-B: Ejemplos de los cromatogramas obtenidos en las determinaciones analíticas.....	73
13. ANEXO-C: Dictamen de aprobación CICUAL.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Disminución de la concentración plasmática de un fármaco en función del tiempo en un modelo de un solo compartimento.	10
Figura 2. Modelos compartimentales.....	11
Figura 3. Curvas de Log concentración plasmática vs tiempo para un modelo de un compartimento (A) y para un modelo de dos compartimentos (B).	12
Figura 4, Modelo farmacocinético basado en la fisiología de todo el cuerpo.....	15
Figura 5. Pasos para desarrollar un modelo PBPK.....	16
Figura 6. Demostración esquemática de las diferencias entre el modelo farmacocinético clásico (PK tradicional) y el modelo farmacocinético basado en la fisiología (PBPK).	20
Figura 7. Estructura de la cocaína.	23
Figura 8, Rutas principales del metabolismo de la cocaína en humanos por las isoenzimas involucradas.	26
Figura 9, Rutas metabólicas de la cocaína en humanos.	27
Figura 10, Efecto de la cocaína en el sistema de motivación-recompensa.	29
Figura 11. Modelo bicompartimental de cocaína..	34
Figura 12. Diagramas de modelo de un compartimento limitado por el flujo sanguíneo, para los órganos que no eliminan (a) y para los órganos que eliminan al analito (b).....	35
Figura 13. Modelo multicompartimental propuesto para el flujo fisiológico de la cocaína en rata y en humano.....	40
Figura 14. Concentraciones predichas de cocaína (mg/L) en sangre venosa (a), sangre arterial (b), pulmón (c), Cerebro (d), hígado (e), riñón (f), corazón (g), músculo (h) y tejido adiposo (i), después de una administración de 5mg/kg de cocaína en rata.....	44
Figura 15. Se exponen fotos de los órganos que fueron extraídos de las ratas. ...	64
Figura 16. Curso temporal de la cocaína en músculo y cerebro (a); y en sangre venosa (b).	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1, Parámetros fisiológicos típicos para los modelos PBPK en diferentes especies	19
Tabla 2, Propiedades fisicoquímicas generales de la cocaína en sus dos formas químicas: sal (clorhidrato) y base.....	22
Tabla 3, Inicio, Pico y duración de los efectos eufóricos producidos por la cocaína de acuerdo a la vía de administración.....	24
Tabla 4. Modelos matemáticos propuestos para describir la farmacocinética de la cocaína, por distintos autores.....	33
Tabla 5. Parámetros de composición de los tejidos, necesarios para el cálculo de K_{up} en rata, para la cocaína, de acuerdo a la Ecuación 3 propuesta por Rodgers y colaboradores.....	38
Tabla 6. Datos fisiológicos sobre las células sanguíneas, para el cálculo de K_{ABC} de la Ecuación 4, planteada por Rodgers y colaboradores.....	38
Tabla 7. Parámetros fisiológicos específicos de especie (para rata de 250g y Gasto cardíaco total, Q_c de 0.055L/min) y coeficientes de partición específicos de tejido y de sustancia (cocaína) calculados con el modelo de Rodgers y colaboradores.	43
Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos y de eliminación específicos de la cocaína, para el modelo PBPK en rata.....	43
Tabla 9. Parámetros calculados en el presente estudio, con ayuda del modelo PBPK.	45
Tabla 10. Concentraciones de cocaína reportadas por diferentes autores en varios órganos de rata	45
Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos recopilados de diferentes autores para distintas dosis de administración de cocaína en rata	46
Tabla 12. Muestras requeridas para cada tiempo de muestreo en la experimentación con animales	64
Tabla 13. Concentraciones encontradas en el presente estudio para músculo, cerebro, y sangre venosa.....	72

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Conexión de las sustancias abuso con el crimen: un reto para el toxicólogo forense*

Las drogas son sustancias psicoactivas con un potencial adictivo, su consumo implica numerosos riesgos para la salud, que puede terminar en muerte. Además, la Encuesta Nacional de Adicciones 2011 sobre Drogas Ilícitas reporta que de los consumidores de drogas, el 24.3% cometió un delito bajo la influencia de alguna sustancia¹. El problema de las drogas se convierte entonces en un problema de seguridad también, y surge la necesidad de conocer si el acto delictivo se atribuye al uso de alguna sustancia de abuso, una atribución que es complicada, ya que existe una gran variabilidad inter-individual (diferencias genéticas, psicológicas, patofisiológicas o ambientales) tanto en la respuesta de la droga y su toxicidad, como en las concentraciones después de la administración de la misma dosis². Este tipo de conexión droga-crimen se explica con un modelo psicofarmacológico, introducido por el criminólogo Paul Goldstein en 1985, quien menciona que los efectos de la o las drogas pueden conducir al individuo a un comportamiento criminal^{3,4}.

Para el toxicólogo forense, el diseño del examen se basa, en gran medida, en la interpretación farmacodinámica a partir de la información farmacocinética; por ello, se necesita entender cómo se biotransforma y elimina la sustancia del organismo. Además puede emplear cocientes de concentración de analito y/o sus metabolitos para tratar de diferenciar entre una exposición reciente de una exposición más prolongada⁵.

Para perfilar el patrón de eliminación de una droga y de sus metabolitos se puede emplear alguno de estos métodos, que pueden proporcionar datos importantes, pero que también presentan varias limitantes⁵:

- 1) La administración controlada de dosis pequeñas de la droga, para posteriormente, monitorear durante cierto tiempo la concentración de la droga y/o sus metabolitos en diversas matrices biológicas, como sangre u orina. El problema es conseguir a los voluntarios, por las consideraciones legales y éticas, que impiden usar dosis altas, o que no se pueda realizar el estudio para todo tipo de drogas.

- 2) El monitoreo durante el periodo de abstinencia, para conocer el tiempo de detección en esta etapa, en distintas matrices biológicas. Su limitación es la de no poder hacer una diferencia entre un uso ocasional de un uso crónico de la sustancia de abuso, y se complica la adecuada interpretación de los datos por el escaso control de las variables.

Por lo anterior, se requieren herramientas, como modelos matemáticos que representen mejor los distintos procesos de transporte, metabolismo y eliminación de las sustancias de abuso con el fin de ayudar en la comprensión y la predicción de los niveles de una sustancia en la sangre y otros tejidos⁶.

1.2. Los modelos Farmacocinéticos basados en la fisiología (PBPK): una herramienta de interpretación forense

Los modelos farmacocinéticos basados en la fisiología (PBPK, por sus siglas en inglés) ayudan a integrar diversos datos sobre el mecanismo de dosis-respuesta de alguna sustancia, y tienen ventajas sobre los modelos farmacocinéticos tradicionales, como es el poder efectuar extrapolaciones *in vitro-in vivo* (IVIVE). Además, la mayoría de las validaciones se realiza en animales, principalmente en ratas, y después se hace la predicción de la farmacocinética (PK) cuantitativamente en humanos⁷, es decir, que también se pueden realizar extrapolaciones entre especies, requiriendo sólo los datos de la sustancia química y sus metabolitos para ambas especies⁸.

El problema es que el modelado PBPK requiere datos completos sobre los procesos fisiológicos, bioquímicos y fisicoquímicos que se producen en los sistemas biológicos⁹, y son datos que no están disponibles en una sola fuente, haciendo que su recopilación resulte confusa al quizá no contar con una fuente fiable de información precisa y coherente. Por lo tanto, es importante indicar que la calidad del modelado PBPK depende de sus datos incorporados, así como de su propósito, y de ahí su importancia de respaldar las simulaciones con datos experimentales.

Por último, se debe estar consciente de que aunque el modelado PBPK posee diversos beneficios e implementaciones, no proporciona la solución definitiva y que sigue habiendo escasez prospectiva, y para poder minimizar e identificar las fallas se requiere de la evaluación extensa y continua del modelo¹⁰.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Construir un modelo matemático a partir de parámetros fisiológicos y bioquímicos para predecir la concentración de cocaína en diferentes tejidos de rata.

Objetivos particulares:

- Hacer una base de datos fisiológicos para rata.
- Elaborar una base de datos fisicoquímicos y bioquímicos para cocaína.
- Calcular los coeficientes de partición tejido: sangre de cada órgano a considerar en el modelo PBPK.
- Esquematizar el modelo estructural a considerar en el modelo PBPK.
- Representar el modelo PBPK mediante ecuaciones diferenciales ordinarias.
- Comparar el modelo PBPK obtenido con datos experimentales.

3. HIPÓTESIS

Si el modelo PBPK, que involucra diversos parámetros fisiológicos, fisicoquímicos y bioquímicos ampliamente específicos, se construye con ecuaciones diferenciales que sigan la distribución sistemática, entonces, podrá describir el transcurso de la cocaína en distintos tejidos de forma coherente con las cinéticas reportadas en la literatura.

4. ANTECEDENTES

4.1. MODELOS FARMACOCINÉTICOS

La Farmacocinética es la rama de la farmacología que se dedica al estudio de la absorción, distribución, y eliminación de un fármaco de manera cuantitativa, por lo que se pueden comprender, interpretar y predecir perfiles de concentración-tiempo en sangre, y otros fluidos o tejidos fisiológicos⁹. Para poder comprender la disposición de los fármacos en el cuerpo humano, es indispensable conocer los mecanismos por medio de los cuales los fármacos atraviesan las membranas celulares, así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y las membranas que modifican esta transferencia. La farmacocinética ayuda a conocer qué concentración del fármaco alcanzará su sitio de acción y cuándo ocurrirá dicha acción, mediante la construcción de modelos farmacocinéticos¹¹ que a continuación se explican.

4.1.1. Modelos farmacocinéticos tradicionales y sus limitaciones

Para poder simplificar y entender los procesos de absorción, distribución, y eliminación de un fármaco se aplican principios matemáticos para crear modelos farmacocinéticos compartimentales, los cuáles ayudan a predecir los cambios en la concentración de los fármacos u otras sustancias químicas en el organismo¹². En el organismo humano se suelen considerar tres compartimentos de acuerdo a la velocidad con que el fármaco o sustancia química los ocupa y los abandona¹³:

- a) Compartimento central: que considera el agua plasmática, intersticial e intracelular fácilmente accesible, por lo que involucra a los tejidos altamente irrigados, como el corazón, pulmones, hígado, riñón, glándulas endocrinas y el SNC en algunos casos.
- b) Compartimento periférico superficial: que incluye el agua intracelular poco accesible, es decir, a los tejidos pobremente irrigados, tales como la grasa, los músculos, la piel, la médula ósea y depósitos celulares (proteínas y lípidos) a los que la sustancia química se une laxamente.
- c) Compartimento periférico profundo: formado por los depósitos tisulares donde la sustancia química o fármaco permanece durante más tiempo debido a su fuerte unión.

Para simular la cinética de distribución y de eliminación de un fármaco se pueden construir tres tipos de modelo:

1. El monocompartimental, que considera que el cuerpo y todos sus tejidos y líquidos son parte de un solo compartimento, asumiendo que el fármaco se distribuye rápida y uniformemente por todo el organismo¹³, es decir, que la absorción, el metabolismo y la excreción son directamente proporcionales a la concentración del fármaco en el compartimento desde el que se produce la transferencia. Por ello, este modelo es muy deficiente, pues no considera que la irrigación sanguínea, el coeficiente de reparto de la sustancia química y la permeabilidad de los capilares a la misma sustancia sean muy distintos en cada órgano, tales como el cerebro, la grasa corporal y los músculos¹⁴. Este tipo de modelos suelen emplearse principalmente para explicar la forma de la curva concentración plasmática de un fármaco contra el tiempo (Figura 1), los tipos de cinética que rigen la evolución de la concentración plasmática y los parámetros farmacocinéticos fundamentales¹².

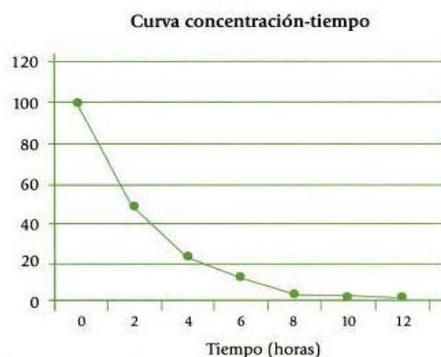


Figura 1. Disminución de la concentración plasmática de un fármaco en función del tiempo en un modelo de un solo compartimento. Recuperado de Mendoza N. (2008) Farmacología Médica. México: Editorial Medica Panamericana.

2. El modelo bicompartimental, donde la distribución del fármaco o sustancia química administrado por vía IV en el compartimento central es rápida, y en el compartimento periférico es lenta¹³. En la Figura 2 se observa que en el esquema de este modelo, el fármaco sólo puede entrar y salir del compartimento periférico a través del compartimento central, que suele representar el plasma¹⁴. La mayoría de los fármacos se pueden adaptar a estos modelos, pero existen casos en los que la distribución a los tejidos es muy pequeña, apreciándose sólo en caso de administración por vía IV y no por vía oral, y por tanto se suelen tratar cinéticamente como si fuera un modelo monocompartimental¹³.

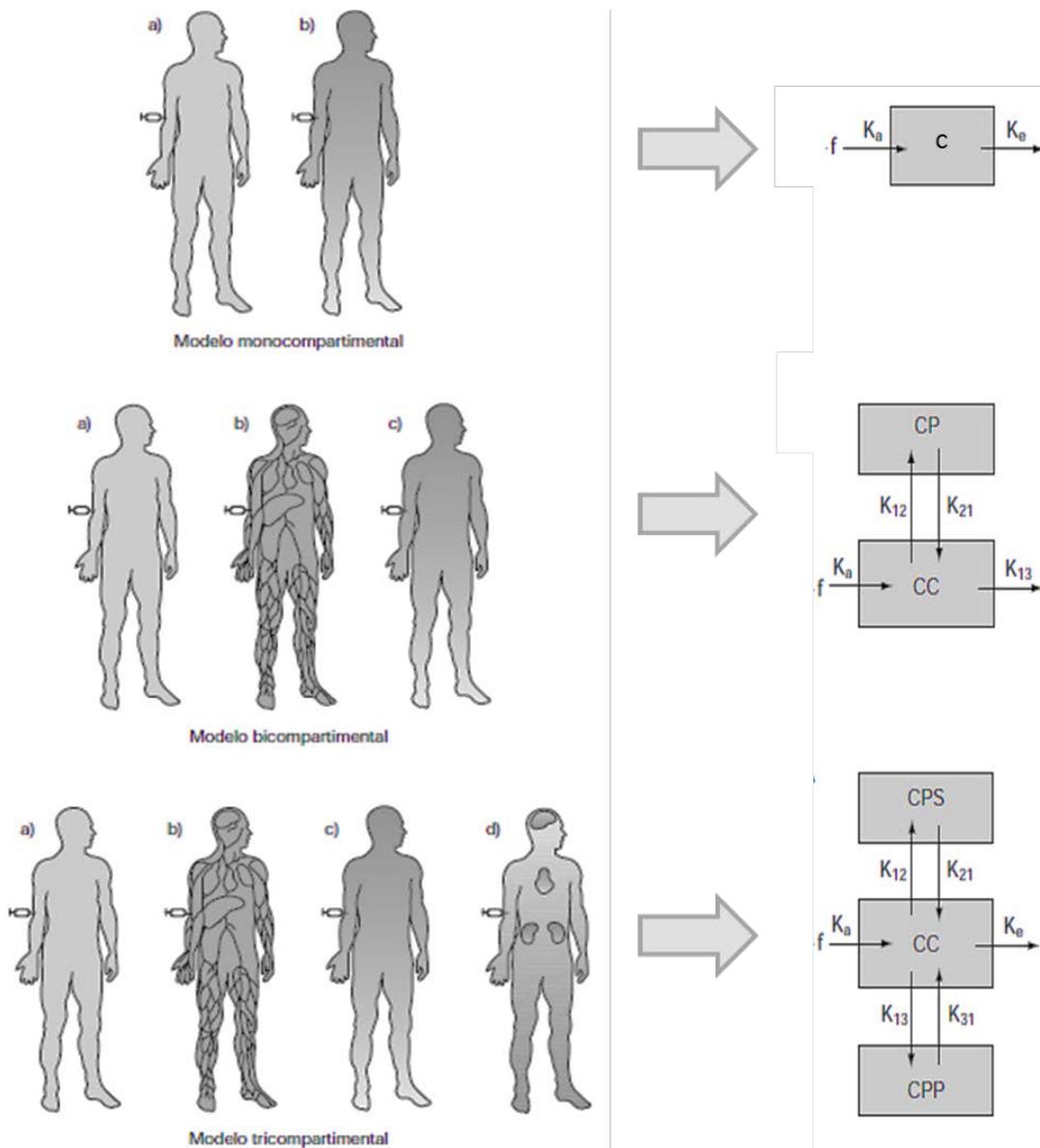


Figura 2. Modelos compartimentales. A la izquierda se representa la manera en que se distribuye el fármaco o sustancia química en el organismo, y a la derecha se esquematizan los compartimentos con cuadros y flechas que indican el sentido y la velocidad de transferencia de la sustancia, y se muestran las constantes farmacocinéticas que intervienen. **Modelo monocompartimental:** a) antes de la administración y b) después de la administración, donde la distribución es rápida y uniforme. El esquema de un solo compartimento indica la dosis del fármaco, f , la concentración del fármaco en el compartimento, C , y las constantes de proporcionalidad de la absorción y eliminación del fármaco, K_a y K_e . **Modelo bicompartimental:** a) antes de la administración; b) inmediatamente después, el fármaco difunde a los órganos altamente irrigados, y c) se llega a un equilibrio en el resto del organismo. El esquema del modelo incluye la concentración del fármaco en el compartimento central (CC) y en el compartimento periférico (CP), y las constantes de proporcionalidad de transferencia del fármaco entre los dos compartimentos, K_{12} y K_{21} . **Modelo tricompartmental:** adicionalmente de lo del modelo bicompartimental, éste incluye d) la acumulación en los órganos a los que el fármaco se une fuertemente. En el esquema del modelo se adiciona otro cuadro para distinguir la concentración en el compartimento periférico superficial (CPS) y la del periférico profundo (CPP), así como las constantes de transferencia del fármaco entre este último compartimento y el central, K_{13} y K_{31} . Recuperado de Flórez J. (1989). Farmacología Humana. 3ª Edición. España: Masson SAS.

3. El modelo tricompartmental ayuda a describir la fuerte unión de los fármacos a determinados tejidos en los que se acumulan y que se liberan con lentitud¹³. El principio del diseño de un modelo tricompartmental es análogo al del modelo bicompartimental, con la diferencia en que se asume la existencia de dos compartimentos periféricos, superficial y profundo (Figura 2) existiendo diferencias en la velocidad de distribución del fármaco.

La manera típica de representar el curso temporal de las sustancias activas es graficando el logaritmo de la concentración plasmática contra el tiempo en que se mide. En la Figura 3 se pueden observar estas curvas, donde la administración IV no presenta una fase de absorción, resultando así un comportamiento lineal. En cambio, en la administración oral hay un proceso de absorción en el tracto gastrointestinal antes de llegar a la sangre, observándose un pico en la curva¹⁵.

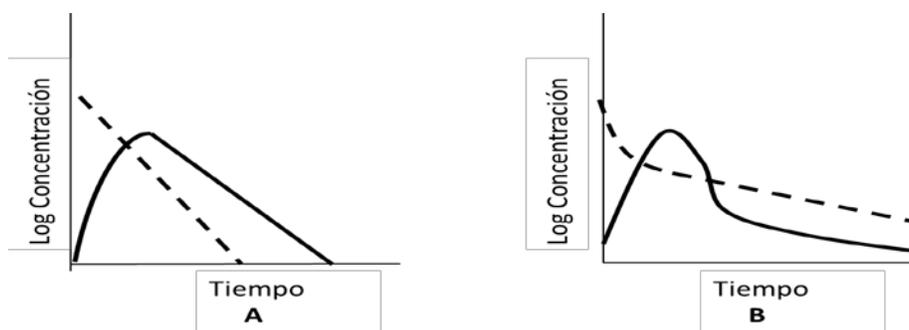


Figura 3. Curvas de Log concentración plasmática vs tiempo para un modelo de un compartimento (A) y para un modelo de dos compartimentos (B). En ambos casos se representa la curva después de administración intravenosa (---) y oral (—). Adaptado de Karch, S. (2007). *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. California: CRC Press.

De acuerdo a los esquemas de la Figura 2 y las curvas de la Figura 3 se puede entender que los cuatro parámetros principales que rigen la disposición de los fármacos y otras sustancias químicas son: la **biodisponibilidad**, que es la fracción del fármaco que se absorbe en la circulación general; el **volumen de distribución**, una medida del espacio disponible en el organismo para contener al fármaco de acuerdo a la dosis administra y la que se encuentra en la circulación general; **eliminación o aclaramiento**, una medida de la eficacia del organismo para eliminar el fármaco de la circulación general; y la **vida media de eliminación**, que es una

medida de la velocidad con la que el fármaco sale de dicha circulación¹¹. A continuación, se presentan las ecuaciones matemáticas de estos parámetros:

$$\text{Biodisponibilidad} = \frac{(ABC)_{oral}}{(ABC)_{IV}}$$

$$\text{Aclaramiento plasmático} \rightarrow \text{CL} = K_{el} * Vd$$

$$\text{Volumen de distribución} \rightarrow Vd = \frac{\text{Dosis}}{C_0}$$

$$\text{Vida media} \rightarrow t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}}$$

Dónde ABC es el área bajo la curva después de la administración del fármaco, IV es por la vía intravenosa; CL es el aclaramiento plasmático; K_{el} es la constante de eliminación; Vd es el volumen de distribución; C_0 es la concentración sanguínea del fármaco al equilibrio; y $t_{1/2}$ es el tiempo de vida media del fármaco.

Es así como los modelos farmacocinéticos permiten ajustar mediciones de los fármacos y sus metabolitos^{13,14}:

- a) Estimar la concentración plasmática que se alcanza en un determinado tiempo.
- b) Estimar el tiempo en que se alcanza determinada concentración plasmática.
- c) Calcular la concentración máxima que se alcanza tras una dosis inicial.
- d) Calcular la dosis con la que se alcanza un nivel estable de la concentración del fármaco en el organismo.
- e) Cuando se administran dosis múltiples permite estimar la fluctuación de la concentración plasmática del fármaco que se observa con un determinado intervalo de administración.
- f) Determinar el intervalo de administración que se debe de utilizar para no ocasionar una fluctuación excesiva.

Estos modelos farmacocinéticos tradicionales comúnmente se derivan sólo de datos esencialmente descriptivos, es decir, que no dicen nada sobre las reglas que rigen el comportamiento farmacocinético de los fármacos en sangre y tejidos. Los datos experimentales se utilizan para ajustar los parámetros de un modelo de dos o tres compartimientos fuertemente simplificado. El objetivo de este ajuste es

una buena descripción de las curvas experimentales, pero el conocimiento generado es muy limitado, porque la relación de los parámetros de ajuste a las propiedades de la sustancia o parámetros fisiológicos del organismo es desconocida¹⁶. En otras palabras, limitan el desarrollo y regulación de las sustancias de estudio al no considerar (a) la diversidad de estructuras químicas y la de las especies de los mamíferos y (b) la variabilidad de la farmacocinética entre las personas asociada a la edad, las terapias concurrentes y otras influencias⁷.

4.2. MODELOS FARMACOCINÉTICOS BASADOS EN CONSTANTES FISIOLÓGICAS (PBPK)

4.2.1. ¿Qué son los modelos PBPK?

El transporte de fármacos y otras sustancias en el organismo es muy complejo, ya que depende de mecanismos tales como el transporte convectivo en el sistema circulatorio, transporte difusivo a través de membranas celulares de tejidos, la eliminación de los fármacos por distintas vías como la orina y la excreción biliar, y las transformaciones bioquímicas por reacciones enzimáticas. La interacción de todos estos mecanismos complica los perfiles de concentración-tiempo en la mayoría de los tejidos del cuerpo, por lo que se requiere de modelos matemáticos que representen mejor los distintos procesos de transporte, con el fin de ayudar en la comprensión y la predicción de los niveles de la sustancia en la sangre y otros tejidos apropiados⁶, y se recurre a utilizar modelos farmacocinéticos basados en la fisiología (PBPK, por sus siglas en inglés).

Un modelo PBPK es un modelo compartimental pero que a diferencia de los modelos farmacocinéticos tradicionales, los compartimentos representan los espacios reales de los tejidos y órganos, y los volúmenes usados son los volúmenes físicos de los órganos y tejidos⁹ (Figura 4). El objetivo del modelado PBPK es describir los procesos físicos y fisiológicos que intervienen en la absorción, distribución y eliminación de un compuesto en un organismo con gran detalle¹⁶. Este enfoque que tienen se llama “*bottom-up*”, y se refiere a que las interacciones de un fármaco o sustancia activa con todos los componentes del cuerpo están integradas, tomando en cuenta también las

características del fármaco y la vía de administración. Esto lleva a un modelo muy complejo, por lo que se busca obtener modelos reducidos pero que conserven las características globales del cuerpo, tales como el gasto cardiaco y el peso corporal⁷.

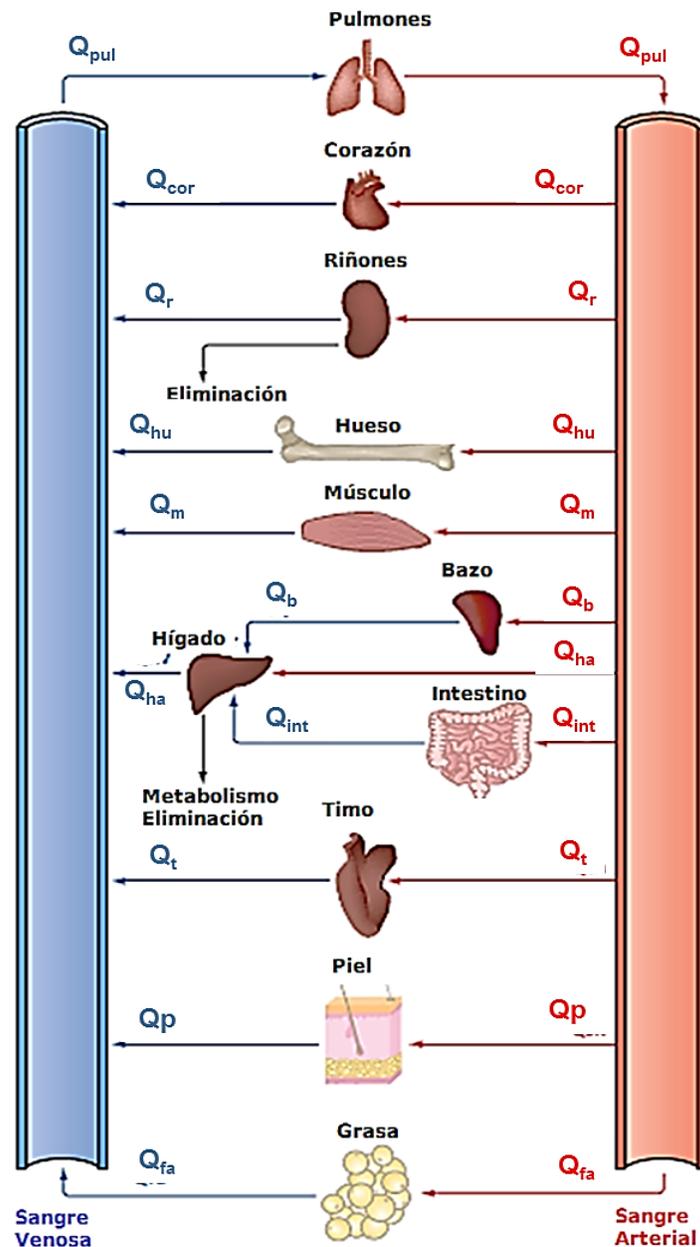


Figura 4, Modelo farmacocinético basado en la fisiología de todo el cuerpo. Q se refiere al flujo de sangre: para los pulmones (Q_{pul}), el corazón (Q_{cor}), los riñones (Q_r), los huesos (Q_{hu}), los músculos (Q_m), el bazo (Q_b), el hígado (Q_{ha}), la vena hepática (Q_{hv}), el intestino (Q_{int}), el timo (Q_t), la piel (Q_p), y la grasa (Q_{fa}). La entrada puede ser desde cualquier sitio del cuerpo. La eliminación se representa como que ocurre solamente de hígado y los riñones, mientras que se puede producir también en otros sitios para algunos medicamentos. Algunos medicamentos pueden sufrir recirculación enterohepática. El modelo se puede ampliar para incluir un modelo similar para metabolitos formados. Traducción de Rowland M, Peck C, Tucker G. (2011). Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science.

Para poder considerar todos los componentes involucrados, es necesario plantear una serie de expresiones matemáticas (ecuaciones diferenciales) para representar a los tejidos y los procesos fisiológicos del organismo que simulen la absorción, distribución, metabolismo y excreción de productos químicos que entran en él¹⁷. El conjunto completo de las ecuaciones diferenciales acopladas se puede resolver numéricamente (utilizando herramientas de software⁷) para obtener curvas de concentración-tiempo de sangre y de todos los órganos que se incluyen en el modelo; de esta manera es posible realizar la predicción del comportamiento farmacocinético del compuesto basándose en los parámetros anatómicos y fisiológicos de la especie que se modela, y de las propiedades fisicoquímicas relacionadas a la sustancia¹⁶. En la Figura 5 se ilustran estos pasos que se siguen para el desarrollo de los modelos PBPK.

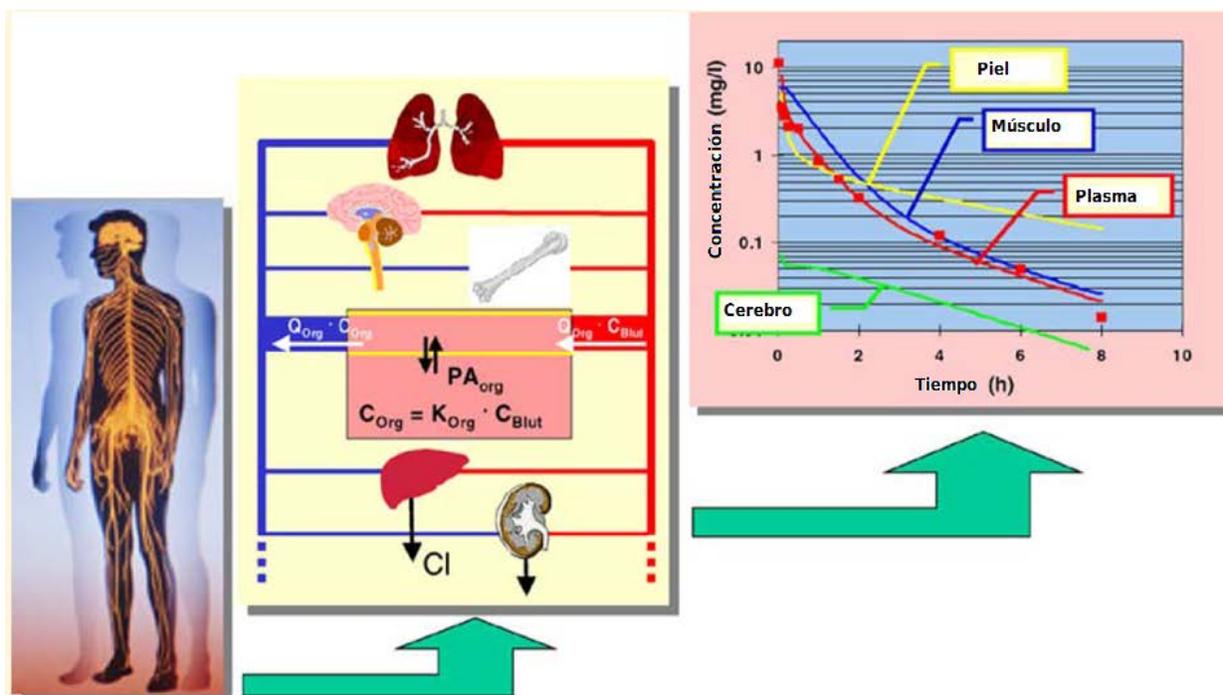


Figura 5. Pasos para desarrollar un modelo PBPK. La fisiología del organismo que se va a modelar se tiene que dividir en compartimentos (cada uno representa usualmente un órgano individual). Las ecuaciones de balance de materia se desarrollan y se resuelven numéricamente para obtener las curvas de concentración respecto al tiempo en varios compartimentos. Esquema traducido de Schmitt W, Willmann S. (2004). Physiology-based pharmacokinetic modeling: Ready to be used.

El desarrollo de un modelo PBPK (representación del modelo) es un paso crítico, pues no existe una regla general para determinar la estructura y el nivel de complejidad necesarios para la aplicación de un modelado particular. Por lo tanto, se tiene que decidir qué elementos se deben incluir en la estructura del modelo para una sustancia química y además tener en claro la aplicación específica que se busca. En este contexto, se suele aplicar un concepto conocido como parsimonia, que se refiere a que el modelo sea lo más simple como sea posible, es decir, minimizando el número de parámetros, utilizando únicamente los que sean necesarios, pues entre más complejo se vuelva el modelo, más difícil se hace su validación¹⁸ (donde los resultados previstos se comparan con datos experimentales, incluyendo un análisis de sensibilidad de parámetros y un análisis de incertidumbre^{16,19}). Para seleccionar la estructura del modelo se debe tomar en cuenta el nivel de detalle en el transporte del fármaco y las descripciones del metabolismo, la inclusión de rutas de exposición química y el agrupamiento de los órganos y tejidos. Entonces, para la representación del modelo se consideran tres componentes principales, que son^{7,19}:

- a) Las propiedades específicas del sistema, que incluyen la masa o el volumen de órganos (V_T), el flujo de sangre (Q_T), y la composición del tejido.
- b) Las propiedades del fármaco o sustancia química, que incluyen la afinidad del tejido con la sustancia, la afinidad de unión a proteína de plasma, coeficiente de partición de tejido-plasma (P_T), permeabilidad de la membrana, la actividad enzimática (V_m / K_m), y las actividades del transportador.
- c) El modelo estructural, que comprende la disposición anatómica de los tejidos y órganos del cuerpo, unidos por perfusión de sangre (Figura 4). Es importante mencionar que el modelo estructural PBPK es independiente de la sustancia química, y es el mismo para todas las especies de mamíferos, aunque el grado de complejidad varía de acuerdo a la aplicación.

Para la simplificación del modelo se hace necesaria la agrupación de los órganos, que se puede llevar a cabo por dos caminos: "lumping" o "splitting". El primero se basa en que "los tejidos farmacocinética y toxicológicamente indistinguibles pueden agruparse", y los grupos más comunes de encontrar son los órganos altamente perfundidos, y los órganos pobremente perfundidos. Por el otro lado, el "splitting" se

basa en que "los tejidos que son farmacocinética o toxicológicamente distintos deben ser separados", por lo que se reduce la inversión de la recopilación de datos y suele ser más eficiente al comenzar con menos compartimentos²⁰.

Otro punto importante es acerca de las condiciones iniciales del modelo PBPK que tienen que ver con la vía de administración, al tipo de forma farmacéutica y a la frecuencia de las administraciones. Para ello, hay que especificar cuál de los siguientes casos aplica²¹:

- a. Administración intravenosa única. Las masas y concentraciones iniciales de fármacos en los compartimentos son todas iguales a cero, con la excepción de la concentración inicial en el compartimiento de plasma que puede considerarse igual a la relación de la dosis administrada al volumen del compartimento de plasma.
- b. Administración oral única, de una forma farmacéutica de liberación inmediata. Las masas y concentraciones iniciales del fármaco en los compartimentos son todas iguales a cero, excepto la masa inicial en la luz gástrica, que puede considerarse igual a la dosis.
- c. Administración oral única, de una forma farmacéutica de liberación retardada. Las masas y concentraciones iniciales de fármaco en los compartimentos son todas iguales a cero.
- d. Varias Administraciones Intravenosas u Orales. En los compartimentos, las masas de fármaco y las concentraciones en el momento de la administración enésima son las obtenidas por efecto de la administración anterior.

En la parametrización del modelo PBPK se debe especificar la especie de estudio, y es importante determinar la fuente de cada valor de parámetro utilizado en el modelo, incluyendo si se obtuvo de la literatura (de experimentos previos *in vitro* o *in vivo*), si se determinó directamente por experimento separado, o si se estimó ajustando el modelo a datos experimentales⁸. En la Tabla 1 se muestran los parámetros fisiológicos típicos para los modelos PBPK.

Tabla 1, Parámetros fisiológicos típicos para los modelos PBPK en diferentes especies

	Ratón	Rata	Humano
Ventilación			
Alveolar (L/h ⁻¹ kg) ^a	29 ^b	15 ^b	15 ^b
Flujos sanguíneos			
Total (L/h ⁻¹ kg) ^a	16.5 ^c	15 ^c	15 ^c
Músculo (fracción)	0.18	0.18	0.18
Piel (fracción)	0.07	0.08	0.06
Grasa (fracción)	0.03	0.06	0.05
Hígado (arterial) (fracción)	0.035	0.03	0.07
Intestino (portal) (fracción)	0.165	0.18	0.19
Otros órganos (fracción)	0.52	0.47	0.45
Volúmenes de tejidos			
Peso corporal (kg)	0.02	0.3	80
Agua corporal (fracción)	0.65	0.65	0.65
Plasma (fracción)	0.04	0.04	0.04
Músculo (fracción)	0.34	0.36	0.33
Piel (fracción)	0.17	0.195	0.11
Grasa (fracción)	0.10 ^d	0.01 ^d	0.21
Hígado (fracción)	0.046	0.037	0.023
Intestino (fracción)	0.031	0.033	0.045
Otros órganos (fracción)	0.049	0.031	0.039
Lumen intestinal (fracción)	0.054	0.058	0.053

^a escalado alométricamente: $QC=QCC \cdot BW.75$

^b Varía significativamente con el nivel de actividad (rango: 15-40)

^c Varía con el nivel de actividad (rango 15-25)

^d Varía substancialmente (más bajo en animales más jóvenes, más alto en animales más viejos)

Nota Fuente: Clewell RA, Clewell HJ. (2007). Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol.

Queda claro entonces, que el modelado PBPK, contrario al modelado "convencional" de PK, comienza por la simulación *in silico* y después se obtienen los datos experimentales, y en la Figura 6 se esquematizan estas diferencias. Además se observa que sólo con los modelos PBPK se puede tener una certeza de lo que ocurre realmente en la farmacocinética del fármaco de acuerdo a sus propiedades y las del organismo¹⁶, por lo que el papel del metabolismo es un factor significativo en el desarrollo de los modelos PBPK. Los modelos PBPK proporcionan un excelente medio para dar cuenta de múltiples interacciones de proceso y no linealidades, y para proporcionar una idea de si el producto químico original o el metabolito es la forma principal (o fracción tóxica) que conduce a efectos adversos. Por ello, los modelos PBPK son la herramienta más potente para investigar la sensibilidad de la farmacocinética¹⁷.

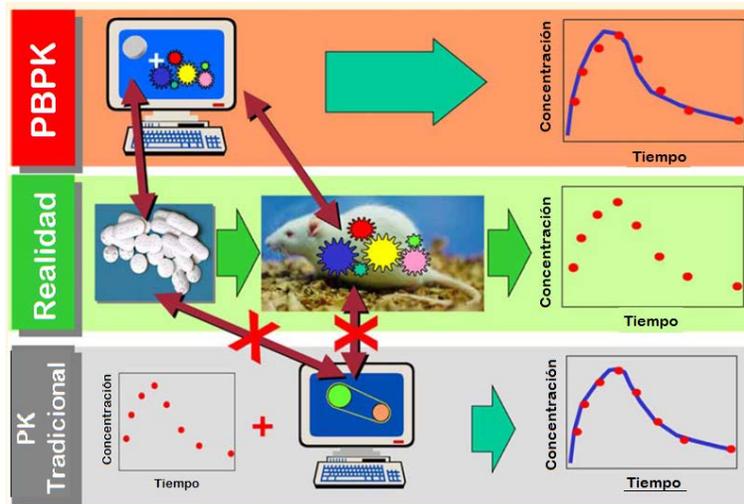


Figura 6. Demostración esquemática de las diferencias entre el modelo farmacocinético clásico (PK tradicional) y el modelo farmacocinético basado en la fisiología (PBPK). Las flechas indican la conexión que sólo se da en el enfoque basado en la fisiología, donde se mantiene una correlación entre el modelo y las propiedades de la sustancia y el organismo. Esquema traducido de Schmitt W, Willmann S. (2004). Physiology-based pharmacokinetic modeling: Ready to be used.

4.2.2. ¿Para qué se usan los modelos PBPK?

A continuación se exponen brevemente los usos que se le pueden dar a los modelos PBPK, teniendo en cuenta que estos modelos suelen tener una mayor aplicación en el desarrollo de fármacos, particularmente en las etapas finales^{7,17}.

Predicción del aclaramiento del fármaco. La aplicación del método IVIVE para predecir el aclaramiento del fármaco ha sido exitosa, en particular para las moléculas de fármacos convencionales (moléculas liposolubles con un PM inferior a 300-500 g mol⁻¹). Esta parte se asocia con el metabolismo del fármaco, y para obtener resultados precisos es esencial: la calidad de los datos *in vitro* (y los datos *in vivo*, que pueden ser muy variables y limitados), el uso de los factores de escala apropiados, la corrección de la unión inespecífica en las preparaciones *in vitro* y, en casos específicos, la tolerancia a la absorción activa.

Predicción de la distribución del fármaco. Se mide la afinidad tisular con base en el volumen de distribución en estado estacionario, que se estima a partir de datos plasmáticos obtenidos tras la administración intravenosa de fármacos.

Predicción de concentración plasmática del fármaco: Perfil de tiempo. Ya se ha descrito que los modelos de PBPK se usan para combinar las predicciones de absorción, distribución y eliminación, como ninguna otra metodología, y esto es lo que se pueda evaluar de manera realista el tiempo completo de la exposición sistémica de los fármacos y metabolitos, esto bajo todas las condiciones y situaciones que puedan encontrarse durante el desarrollo clínico del fármaco.

Predicción de interacciones de fármaco-fármaco. Ésta se relaciona con el metabolismo mediado por CYP, y considera las citoquinas liberadas por proteínas terapéuticas, además de la interacción con enzimas en el hígado y el intestino.

Predicción de los efectos por la edad. Los modelos IVIVE y PBPK tienen el potencial de anticipar las diferencias farmacocinéticas en pacientes pediátricos en relación con pacientes adultos, y de esta manera ayudar en la selección y diseño óptimo de las investigaciones *in vivo*.

Predicción de los efectos por la genética. Los polimorfismos genéticos en las enzimas que metabolizan los fármacos y sus frecuencias en diversos grupos étnicos están documentados, y esta es la información que se utiliza para evaluar su impacto en la exposición a fármacos. En estas predicciones se utilizan simuladores que permiten el modelado estocástico de poblaciones virtuales.

Predicción de los efectos por enfermedad. Se puede predecir la farmacocinética en estados patológicos específicos definidos por etiología y gravedad, al incorporar rasgos patológicos en los modelos PBPK.

El modelo PBPK también se puede ejecutar con diferentes valores de parámetros para simular las diferencias interindividuales, tales como el peso o el nivel de esfuerzo o estado metabólico, y se puede estimar la gama de riesgos individuales correspondientes a un determinado riesgo poblacional. Una de las características del modelado PBPK es que identifica áreas importantes de incertidumbre que merecen determinación experimental. Para poder realizar cualquier predicción se debe considerar la capacidad del modelo para proporcionar una predicción precisa del comportamiento general de los datos en las aplicaciones previstas²⁰.

4.3. SUSTANCIA DE ESTUDIO: COCAÍNA

4.3.1. Propiedades generales y uso

La cocaína es un alcaloide que se obtiene a partir de hojas de la planta de coca (*Erythroxylum coca* o *Erythroxylum novogranatense*), que es originaria del sur de América, y se encuentra en dos formas químicas principales: el clorhidrato de cocaína soluble, que se puede inyectar o inhalar, pero no se puede fumar debido que se descompone cuando se quema; y la cocaína base insoluble en agua, que frecuentemente se fuma²². En la Tabla 2 se muestran algunas características físicas y químicas. La cantidad de cocaína presente en las hojas cosechadas (aproximadamente 1% por peso) disminuye con el tiempo, por lo que las hojas se procesan típicamente en pasta de cocaína y/o en polvo, tan pronto como sea posible²³. Su producción ilícita se puede llevar a cabo de diferentes formas, y la adulteración de la cocaína es relativamente rara, en el caso del tráfico internacional, su pureza llega a ser a menudo del 80% al 90% (como clorhidrato de cocaína), y la mayoría de las veces se presenta como un polvo cristalino blanco o blanco apagado, frecuentemente fino y raramente húmedo²². Sin embargo, se ha visto que en el narcomenudeo es común su adulteración, de hecho, según los datos del último informe del Servicio de Análisis de Sustancias 2015 de Energy Control, la cocaína es la sustancia que presenta más a menudo adulterantes, encontrándolos en el 78% de los casos y sólo el 14,5% de las muestras analizadas contenía cocaína como única sustancia activa²⁴.

Tabla 2, Propiedades fisicoquímicas generales de la cocaína en sus dos formas químicas: sal (clorhidrato) y base

Propiedad	Clorhidrato	Base
Fórmula Empírica	$C_{17}H_{21}NO_4$	
Peso molecular (g/mol)	339,8	303,4
Punto de fusión (°C)	195	98
Solubilidad (g/mL)		
Agua	Soluble (1 en 0,4)	Ligeramente soluble (1 en 600)
Etanol	Soluble (1 en 3,2)	Soluble (1 en 6,5)
Éter etílico	Prácticamente insoluble	Soluble (1 en 3,5)
Cloroformo	Soluble (1 en 12,5)	Soluble (1 en 0,7)
Datos de GC-MS (porcentaje abundancia)	303 (M ⁺ ,17), 182 (71), 105 (29), 96 (24), 94 (36), 82 (100), 77 (35) m/z	

Nota Fuente: Adaptado de UNODC. *Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. Manual para uso de los laboratorios nacionales de análisis de estupefacientes.*

4.3.2. Estructura y Actividad: Efectos y toxicidad

La cocaína es un éster de ácido benzoico de la metilecgonina. La ecgonina es la base alcohólica amínica que se relaciona estrechamente con la tropina. El núcleo de la cocaína es de ecgonina, que corresponde al grupo hidrófilo, y éste está enlazado a un ácido benzoico, que correspondería al dominio hidrófobo por el anillo aromático^{25,23}. Tiene el mismo núcleo base que los anestésicos locales sintéticos (Figura 7), y es la parte hidrófoba la que incrementa tanto la potencia como la duración de la acción anestésica, pero también es la parte que incrementa la toxicidad de la sustancia¹¹.

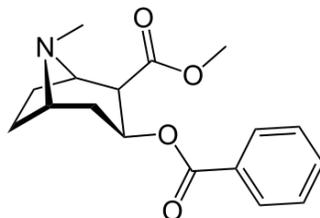


Figura 7. Estructura de la cocaína.

El principal mecanismo de acción de la cocaína es la inhibición de la recaptura de catecolaminas (dopamina y norepinefrina) y serotonina, siendo la dopamina, la que se relaciona con la adicción. El incremento de la actividad de la dopamina se relaciona con la mayoría de los síntomas sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), provocando tanto los efectos deseados como los tóxicos²⁶. La alteración que provoca la cocaína sobre la comunicación normal del cerebro, trae como consecuencia ciertos efectos a corto plazo, que incluyen: felicidad y energía extrema, agilidad mental, hipersensibilidad a la vista, el oído y el tacto, irritabilidad y paranoia (desconfianza extrema e irracional de los demás). Estos efectos se presentan casi inmediatamente y desaparecen en unos pocos minutos a una hora, lo cual depende de la vía de administración. Cuando se inyecta o se fuma, se producen efectos más rápidos y más intensos, pero de menor duración que cuando se inhala. Los efectos de la cocaína cuando es inhalada pueden durar de 15 a 30 minutos, mientras que al fumarla pueden durar de 5 a 10 minutos²⁷. El uso regular de cocaína se asocia con una variedad de efectos adversos que potencialmente aumentan la mortalidad. Estos incluyen el riesgo de desarrollar dependencia, complicaciones cardiovasculares

(infartos agudos de miocardio y arritmias significativas), episodios psicóticos y ataques de pánico, así como la adquisición de infecciones virales transmitidas por la sangre, sobre todo entre los usuarios que se inyectan la droga²⁸. Más adelante se explicarán más detalles de la farmacodinamia.

4.3.3. Farmacocinética

La farmacocinética de la cocaína depende de diversos factores tanto de la forma fisicoquímica, la vía de administración, la genética, y en algunos casos el frecuente consumo conjunto con alcohol. Las vías de administración más comunes son por inhalación, inyección intravenosa (IV), por vía oral, o por aplicación en las mucosas. La vida media de la cocaína es aproximadamente de 0.7-1.5 horas y la mayor parte de la dosis administrada se elimina después de algunas horas. La cocaína y su mayor metabolito, benzoilecgonina (BE), se pueden detectar en orina, sangre y saliva principalmente. La BE se puede detectar en orina hasta 3 días después del consumo, por una técnica de inmunoensayo o por cromatografía de gases, y hasta 7 días después por radioinmunoensayo²³.

Absorción

La cocaína generalmente se absorbe de manera rápida por cualquiera de las rutas de administración, exceptuando la oral y la tópica²⁹. La biodisponibilidad de la cocaína cuando es administrada por vía IV o cuando es fumada es más del 90%, mientras que cuando es inhalada es aproximadamente de 80%. En cambio, por la vía oral, su biodisponibilidad es del 30%. Los tiempos de inicio, pico y duración de acción (efectos eufóricos) también varían por las diferentes vías de administración, y en la Tabla 3, se muestran algunos casos²³.

Tabla 3, Inicio, Pico y duración de los efectos eufóricos producidos por la cocaína de acuerdo a la vía de administración

Ruta	Inicio	Pico	Duración
Tópica*	Alrededor de 5 minutos	-	-
Intranasal*	Alrededor de 5 minutos	15-20 minutos	60-90 minutos
Intravenosa	10-60 segundos	3-5 minutos	20-60 minutos
Inhalada	3-5 segundos	1-3 minutos	5-15 minutos

*Estos valores representan uso terapéutico.

Nota Fuente: Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity-A Review. Disease-a-Month. 2009; 55(1):6-38.

Anteriormente se ha descrito que las sales de cocaína son hidrosolubles y termolábiles, esto hace que se facilite su absorción por las mucosas nasales (“sniffin”) y por vía parenteral. La cocaína es una base débil con un pKa de 8.6, y su forma básica, cuando se administra por inyección o es fumada, atraviesa las membranas celulares de manera rápida y eficiente³⁰.

Distribución

La unión a proteínas de la cocaína es aproximadamente 90%, por lo que su distribución es inmediatamente después de la absorción. El volumen de distribución es de 1.96-2.7 L/kg²³. Después de una administración de 20mg de cocaína, el tiempo de detección en sangre es de 4 a 6 horas después, mientras que después de una dosis de 100mg, el tiempo de detección es de 12 horas³¹.

Metabolismo

La cocaína se biotransforma por múltiples enzimas. Tres de las vías principales son: (1) la hidrólisis por carboxilesterasas en el hígado, que se da en aproximadamente un 90% de la dosis absorbida³². Los metabolitos que se generan por esta vía son la benzoilecgonina (BE) y el éster de metilecgonina (EME). (2) Metabolismo oxidativo hepático de la cocaína, con lo que se forma norcocaína, que no es más del 5% de la droga absorbida. Este metabolito puede cruzar la barrera hematoencefálica. (3) La reacción de la cocaína con la butirilcolinesterasa que forma EME, y aproximadamente esto le ocurre a una tercera parte de la cocaína^{23,32}. A continuación, se describen más detalles de estas rutas metabólicas.

En la ruta de hidrólisis de la cocaína, el mayor metabolito que se obtiene es la BE (en cualquier vía de administración), y así como se señala en la Figura 8, la enzima responsable de esta hidrólisis es la carboxilesterasa-1 humana (hCE-1)^{31,32}. Se estima que la BE aparece en plasma entre 15 a 30 minutos después de la administración intravenosa o fumada y el tiempo del pico de concentración dura de 0.39 a 0.85h, en cambio, por vía intranasal la BE se encuentra hasta los 30 minutos, y el rango de la duración del pico es de 2.94 a 3.82h³³. La BE después puede biotransformarse por hidroxilación aromática en las posiciones meta, para u orto, obteniendo el correspondiente isómero de hidroxibenzoilecgonina. Esto se esquematiza en la Figura 9, pero desafortunadamente las isoenzimas involucradas

aún no se han identificado. Las otras enzimas presentes en la ruta de hidrólisis son la pseudocolinesterasa y la carboxilesterasa-2 humana (hCE-2), que intervienen en la formación de EME³¹. Las vidas medias reportadas de BE y de EME son de aproximadamente 5 y 8 horas respectivamente, y generalmente se pueden encontrar después de 24 a 48 horas del uso de cocaína por inmunoensayo, sin embargo, estos periodos de tiempo dependen de la dosis administrada y de las diferencias interindividuales³⁴.

En la Figura 8 también se muestra que en presencia de alcohol se inhibe la hidrólisis de la cocaína, pero la hCE-1 cataliza la transesterificación para formar cocaetileno. También se ha demostrado que la formación de este metabolito, que se produce solamente en hígado, puede ocurrir por acción de la acilgrasa etilestersintasa³⁵. Más adelante se explica que el cocaetileno tiene un mayor porcentaje de unión a las proteínas del cerebro, por lo que su daño sobre el sistema nervioso central es mayor. El cocaetileno aún se puede biotransformar más, ya sea formando el norcocaetileno o la ecgonina etil éster por la acción enzimática de la hCE-2.

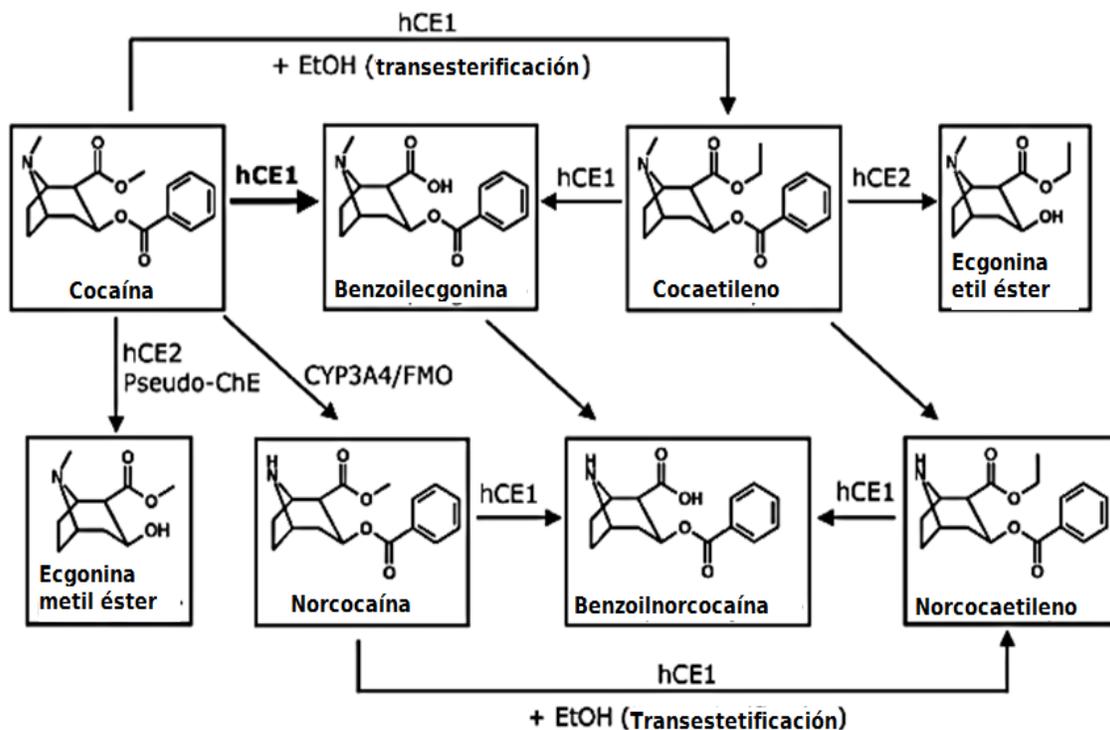


Figura 8, Rutas principales del metabolismo de la cocaína en humanos por las isoenzimas involucradas. Traducción de Maurer HH, Sauer C, Theobald DS, 2006.

Por otro lado, también se puede encontrar al anhidro ecgonina metiléster, que es producto de la descomposición térmica de cuando se fuma la cocaína (Figura 9), el cual se puede biotransformar a ecgonidina. La ecgonidina (anhidroecgonina), ecgonidina de etilo (éster etílico anhidro-ecgonina) y nor-ecgonidina (nor-anhidroecgonina) son otros tres metabolitos que se han llegado a identificar, pero no se ha logrado identificar a las isoenzimas que intervienen en esta parte del metabolismo.

Finalmente, en la última ruta metabólica interviene la enzima plasmática butirilcolinesterasa, que biotransforma la cocaína para generar compuestos hidrosolubles y farmacológicamente inactivos, por lo que podría ser una enzima que se utilice como terapia en la intoxicación con cocaína. Los compuestos originados son el ácido benzoico y el EME. Por la presencia de esta enzima, es que no se puede determinar completamente el mecanismo completo de hepatotoxicidad producida por la cocaína³².

Eliminación

Una parte de la cocaína inalterada se elimina por la orina (aproximadamente del 1-9%, dependiendo del pH de la orina), y se puede detectar después de 24 a 36 horas. Los metabolitos principales, BE y EME también se eliminan por esta vía, siendo que de la dosis administrada, del 35 al 55% se elimina en orina en forma de BE, y del 26 al 60% es en forma de EME³⁶. La excreción fecal representa la ruta de eliminación menos importante de la cocaína y sus metabolitos. La eliminación de la cocaína inalterada por el fluido oral se ha detectado cuando se administra por vía intravenosa, intranasal y fumada, esto después de 4.7, 6.3 y 4.1 horas respectivamente. La BE se encuentra en el fluido oral después de 6.7h de la administración de cocaína por la vía intravenosa, 8.7h por la vía intranasal, y 5.0 h cuando se fuma²³. Otras vías por la que se elimina son en pelo y en uñas.

4.3.4. Farmacodinamia

Las personas que consumen cocaína la utilizan por sus efectos estimulantes y para obtener una sensación de autoconfianza, pues los mecanismos neurobiológicos de su consumo incluyen el aumento de la biodisponibilidad de dopamina en el sistema de la motivación-recompensa³⁷ (Figura 10). Además, debido a su comportamiento como amina simpaticomimética de acción directa, la cocaína también interfiere con el transportador de serotonina y noradrenalina. El aumento en la concentración de noradrenalina, es lo que provoca efectos como el aumento de la presión arterial, la dilatación pupilar, sudoración o aumento de la temperatura corporal y temblor²⁹. Estos efectos son muy frecuentes cuando la dosis es intravenosa o fumada, presentándose casi de inmediato, y el retorno a los valores basales tarda de 30 a 45 minutos³³.

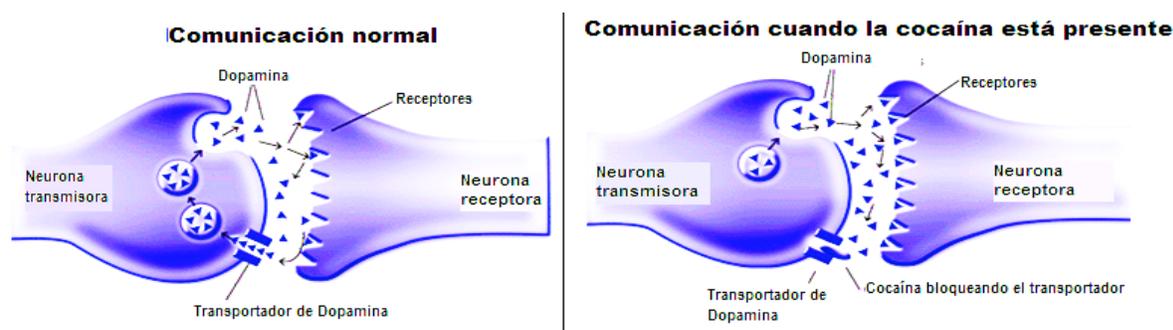


Figura 10, Efecto de la cocaína en el sistema de motivación-recompensa. Durante la comunicación normal entre las células nerviosas (izquierda), la neurona transmisora libera neurotransmisores, en este caso la Dopamina, que estimulan a la neurona receptora al unirse a los receptores en su superficie. Después de que se produce dicha comunicación, las moléculas transportadoras recapturan la dopamina para su posterior liberación. Cuando la cocaína está presente (derecha), ésta bloquea el transportador evitando la recaptura de la dopamina, y provoca su acumulación en la sinapsis, magnificando los efectos placenteros de la dopamina. Modificado de Stocker, 1999. *NIDA Notes*.

Los efectos causados por la cocaína se pueden dividir en efectos agudos (a corto plazo) y en efectos crónicos (a largo plazo). Dentro de los agudos están los mencionados anteriormente, así como taquicardia, sensación de menos cansancio y un estado de mayor alerta mental, que son derivados de la euforia provocada durante los primeros 30 minutos después del consumo³⁷. Además, cuando es usada la cocaína a dosis altas se suele presentar ansiedad extrema, psicosis, delirios, alucinaciones, paranoia e incluso la muerte súbita por sobredosis³⁸. La dosis tóxica varía ampliamente y depende de la tolerancia de cada individuo, la vía de administración y la presencia de otras drogas, entre otros factores³⁹. Pero con la

administración inhalatoria y parenteral es cuando se desencadenan rápidamente efectos notables en el organismo, los cuales (hablando de toxicidad aguda) se presentan en tres fases²⁹:

- Fase I. Estimulación inicial: efectos anestésicos locales, estimulación del sistema nervioso central e inhibición de la recaptura de catecolaminas, lo que lleva a la euforia y alteración de la función dopaminérgica cerebral. En absorción nasal, esta fase se inicia después de 1 a 3 minutos y cuando los niveles sanguíneos son superiores a 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ se presentan los síntomas de taquicardia, hipertensión, cefalea, inestabilidad emocional, midriasis y movimientos involuntarios en los músculos de la cara (“tics”).
- Fase II. Estimulación avanzada: se presenta después de 30-60 minutos del consumo, la taquicardia y la hipertensión aumentan, y se presenta también dificultad para respirar. Se llegan a presentar convulsiones cortas debido a hiperquinesia en el SNC. Para observar dichos efectos, los niveles sanguíneos deben ser entre 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{dL}$.
- Fase III. Depresión: es la fase más severa y se puede presentar después de 1 a 2 horas, dependiendo de la dosis ingerida. Los efectos que caracterizan a esta fase son la falla respiratoria, pulso filiforme o no palpable, parálisis muscular, disminución de los reflejos y funciones vitales, inconciencia y muerte. Los niveles en sangre alcanzan a ser de 3mg/dL de sangre.

Por otro lado, existen los efectos a mediano y largo plazo (crónicos), entre los cuales se presentan: arritmias, infarto miocárdico, dolor torácico, insuficiencia respiratoria, afecciones vasculares cerebrales, convulsiones, cefalea, náusea, dolor abdominal, anorexia, insomnio y desnutrición³⁷. También se puede provocar deterioro en la memoria y en la concentración, impotencia en hombres e infertilidad en mujeres³⁸. Además, cuando el consumo es en su forma de base libre, se causa dolor crónico o quemaduras de labios, lengua y garganta, se suelen ocasionar infecciones en las vías respiratorias e incluso puede llegar a provocar un edema pulmonar. Cuando se inhala de manera constante, la cocaína llega a provocar la degeneración del tejido local dañando la membrana mucosa, e incluso la de perforación del tabique nasal, también se llegan a presentar casos de epistaxis (hemorragia nasal), anosmia (pérdida del

sentido del olfato) y disfonía (trastorno de la voz). En el caso de la dosificación inyectada se pueden provocar infecciones cutáneas, alergias, VIH y hepatitis³⁹. El VIH y la Hepatitis C son enfermedades de las que se corre riesgo de contraer debido a que se tienen relaciones sexuales por falta de juicio o incluso por negociaciones. En el caso de las infecciones de VIH, se ha demostrado que el uso de la cocaína promueve la replicación del virus y potencia los efectos dañinos en los diferentes tipos de células del cerebro y la médula espinal. En las infecciones de Hepatitis C se incrementan las complicaciones en el hígado, y se incrementa la posibilidad de desarrollar cáncer³⁹.

Otra condición importante es el embarazo, ya que los cambios fisiológicos causan cambios en la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación de la cocaína, incrementándose los efectos nocivos tanto en la madre como en el feto (las propiedades lipofílicas le permiten a la cocaína atravesar la barrera placentaria). Las mujeres embarazadas presentan menor actividad de la colinesterasa plasmática que transforma la cocaína en ecgonina y benzoilecgonina, por lo que la biotransforman a norcocaína, un metabolito potencialmente activo. Los neonatos pueden presentar síndrome de abstinencia, además de verse afectado su desarrollo neurológico, lo que conlleva a alteraciones en el aprendizaje, atención y lenguaje^{37,39}.

Un problema más es el consumo simultáneo de cocaína y alcohol, ya que como se describió antes, se genera como producto metabólico el cocaetileno que se encuentra rápida y principalmente en hígado, pulmón y riñón. Unos minutos más tarde se detecta en bazo, corazón y cerebro⁴⁰. Entre las consecuencias de la combinación de cocaína con alcohol son el incremento del riesgo de daño cardiaco asociado al consumo de cocaína, y paralelamente aumenta la hepatotoxicidad e inmunotoxicidad³⁵. Se ha visto que también se incrementan las convulsiones, el deterioro mental, déficits cognitivos en memoria, atención, orientación y asimetría sensorial, así como la letalidad ⁴⁰.

4.3.5. Modelos farmacocinéticos existentes para la cocaína

La farmacocinética de la cocaína ha sido estudiada por varios años y por diferentes autores, siendo uno de los principales objetivos el relacionar las concentraciones plasmáticas de cocaína y los efectos farmacológicos, una tarea que no ha resultado fácil, ya que no se tiene establecido ningún modelo que describa perfectamente el curso temporal en plasma de esta sustancia.

Los modelos que se han propuesto son mayoritariamente en humanos, hay compartimentales o no compartimentales, y las ecuaciones que describen la farmacocinética son de acuerdo a la vía de administración, siendo que por vía intranasal se debe tomar en cuenta el proceso de absorción. Javaid y colaboradores⁴¹ reportan que después de una administración intravenosa la cinética se ajusta a un modelo monocompartimental y con una eliminación de primer orden. De manera similar, después de la administración intranasal la cinética se representa en un modelo abierto monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden. Además, en esta última vía, se observó que la biodisponibilidad depende de la dosis, pues es mayor a medida que se aumenta la dosis administrada. Por otro lado, en 1995, Cone³³ propuso un modelo de dos compartimentos para la vía IV y en caso de fumarla, con una eliminación de primer orden, y para la vía intranasal la cinética también se ajusta a un modelo bicompartimental, con absorción y eliminación de primer orden. Además, este autor incluye la cinética de un metabolito, la BE, diciendo que se ajusta a un modelo monocompartimental, con una constante de formación de primer orden (K_f) y una eliminación también de primer orden (K_e). Las ecuaciones matemáticas principales de esto autores se muestran en la Tabla 4, con el fin de compararlas de acuerdo con el tipo de modelo.

Tabla 4. Modelos matemáticos propuestos para describir la farmacocinética de la cocaína, por distintos autores

Autor	Javaid y colaboradores ⁴¹		Cone ³³	
Tipo de modelo	Monocompartimental		Bicompartimental	
Vía de administración	IV	Intranasal	IV y fumada	Intranasal
Cambio en la concentración plasmática respecto al tiempo	$C = C_0 e^{-K_e t}$	$C = \frac{K_a F D}{V(K_a - K_e)} (e^{-K_e t} - e^{-K_a t})$	$C = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$	$C = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} + C e_0^{-K t}$
Volumen de distribución	$V = \frac{D}{C_0}$	$V = \frac{F D}{K_e \int_0^{\infty} C dt}$	$V_1 = \frac{D}{A+B}$	$V_1 = \frac{K_{0,1} F D}{A(K_{0,1} - \alpha) + B(K_{0,1} - \beta)}$

Nota: K_a = constante de absorción; α = constante de distribución; K_e , β y $K_{0,1}$ = constantes de eliminación; V (1) = volumen de distribución aparente; F = fracción de la dosis absorbida en la circulación sistémica; D = Dosis administrada del fármaco; C = concentración del fármaco en el compartimento central; C_0 , A y B = concentración del fármaco en el tiempo cero; t = tiempo.

Es importante recordar que los modelos matemáticos se construyen de acuerdo a lo que se requiera estudiar, en los casos anteriores se pretendía conocer la concentración plasmática a determinados tiempos y relacionarlos con los efectos que tuviera la persona en determinado momento. En el caso del trabajo de Zheng y Zhan⁴², en 2012, se buscaba entender más sobre las enzimas metabolizadoras de la cocaína en sangre y cerebro, por lo que construyó un modelo bicompartimental *in vivo* con eliminación Michaelis-Menten en plasma, basándose en las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dx_1(t)}{dt} = - \left[\frac{V_{max}}{K_M + X_1(t)} + K_{pb} \right] X_1(t) + K_{bp} X_2(t)$$

$$\frac{dx_2(t)}{dt} = \frac{V_p}{V_b} [K_{pb} X_1(t) + K_{bp} X_2(t)]$$

Dónde $X_1(t)$ y $X_2(t)$ representan las concentraciones de cocaína en el plasma (compartimento 1) y en el cerebro (compartimento 2), respectivamente. K_M es la constante de Michaelis-Menten de la enzima para degradar la cocaína. V_{max} es la velocidad máxima de la reacción enzimática cuando la enzima es saturada por el sustrato (cocaína): $V_{max} \equiv k_{cat} * [E]$; dónde k_{cat} = constante de velocidad catalítica, y

[E]= concentración de la enzima en el plasma. K_{pb} es la constante para la difusión de cocaína desde el compartimiento 1 al compartimiento 2, y K_{bp} es la constante para la difusión de cocaína desde el compartimiento 2 al compartimiento 1. V_p y V_b se refieren a los volúmenes efectivos de los compartimientos 1 y 2, respectivamente.

De manera esquemática el modelo de Zheng y Zhan⁴² se presenta en la Figura 11.

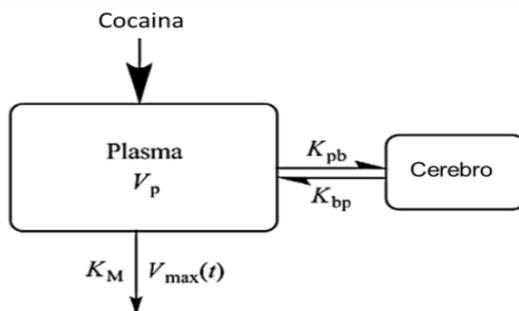


Figura 11. Modelo bicompartimental de cocaína. El modelo tiene un compartimento central representado por el plasma (volumen V_p), en donde entra la cocaína y se elimina por una cinética enzimática de Michaelis-Menten, con una constante K_M , y una velocidad máxima de conversión a sus metabolitos V_{max} . También se esquematiza el intercambio con el compartimento del cerebro con dos constantes de difusión K_{pb} y K_{bp} . Traducción de Zheng F, Zhan C-G. (2012). Modeling of Pharmacokinetics of Cocaine in Human Reveals the Feasibility for Development of Enzyme Therapies for Drugs of Abuse.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO PBPK Y SU SIMULACIÓN IN SILICO

5.1.1. Representación del modelo

Esta parte consistió en la descripción matemática de los compartimentos relevantes (órganos y tejidos) que consideran la distribución sistemática en los órganos a través de los flujos sanguíneos venosos y arteriales, y las vías de eliminación de la sustancia de abuso.

Para describir la distribución de la cocaína en la rata, se decidió plantear un modelo de tanque bien agitado (WST, por sus siglas en inglés), en el que no se detallan las barreras biofísicas entre los compartimentos (órganos) y la distribución se limita por el flujo sanguíneo. El modelo se muestra más adelante en la Figura 13, donde se consideraron trece compartimentos. Es importante remarcar que este modelo se hizo siguiendo las direcciones y conexiones de la circulación sanguínea real en el organismo, tal como se observó anteriormente en la Figura 4, donde se representan los órganos más importantes y sus conexiones.

En seguida, se plantearon las ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) de balance de masa respecto al cambio de concentración de cocaína a través del tiempo en cada órgano, y para entender el planteamiento de la ecuación se considera a cada tejido como un compartimento aislado (Figura 12).

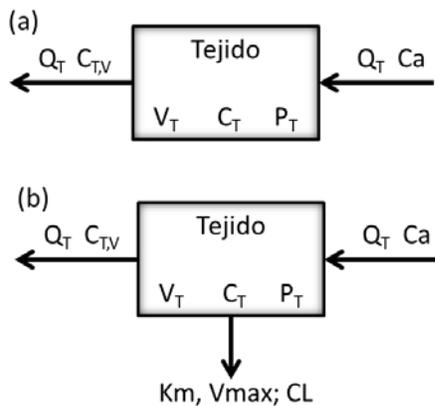


Figura 12. Diagramas de modelo de un compartimento limitado por el flujo sanguíneo, para los órganos que no eliminan (a) y para los órganos que eliminan al analito (b). Q = flujo sanguíneo; C = concentración; V =volumen; P =coeficiente de partición tejido: sangre; subíndice T indica el tejido; subíndice v se refiere a la sangre venosa y el subíndice a es de la sangre arterial; K_m y V_{max} son parámetros de una cinética enzimática de Michaelis-Menten; y CL =aclaramiento.

De este modo, las ecuaciones plateadas consideran una concentración de entrada y otra de salida, y en el caso de los órganos de eliminación se agregó un término negativo para indicar la pérdida del analito, como se muestra en la Ecuación 1.

$$V_T \frac{dC_T(t)}{dt} = Q_T \times \left(C_{in}(t) - \frac{C_T(t)}{P_T} \right) - CL_T \times C_T(t) \quad (1)$$

Dónde, el subíndice T hace referencia al tejido; C_T es la concentración total de cocaína en el tejido; C_{in} es la concentración que entra al tejido; Q_T es el flujo sanguíneo que hay en el tejido; V_T es el volumen del tejido; P_T es el coeficiente de partición tejido-sangre que se describe más adelante; el término C_T/P_T representa la concentración venosa que sale del tejido; y $CL_T \times C_T(t)$ hace referencia al aclaramiento de la sustancia, ya sea renal o hepática.

Obsérvese que sólo las concentraciones (C_T y C_{in}) son dependientes del tiempo (t), mientras que V , Q y P son constantes fisiológicas específicas para cada órgano, y sus valores se presentan en la Tabla 7.

5.1.2. Parametrización del modelo

El siguiente paso para el desarrollo del modelo PBPK consistió en incluir diversos parámetros fisiológicos específicos de especie (para una rata de 0.25kg y con un gasto cardíaco de 0.055 L/min), parámetros fisicoquímicos y bioquímicos específicos para la sustancia. Estos parámetros fueron recopilados y/o calculados.

Los parámetros fisicoquímicos, específicos de la sustancia de estudio, fueron necesarios para calcular los coeficientes de partición tejido: sangre (P_t) de cada órgano (Anotados en la Tabla 7). El coeficiente de partición se utiliza para cuantificar la distribución de fármacos entre tejidos y sangre en condiciones de equilibrio⁴³, y se determinó a partir del coeficiente de partición tejido: plasma no unido (K_{up}) con la siguiente relación:

$$P_T = \frac{f_u^p}{B:P} * K_{up_t} \quad (2)$$

Dónde f_u^p es la fracción de analito no unida en plasma; y B: P es la relación sangre-plasma. Kup_t se predijo de acuerdo al modelo propuesto por Rodgers y colaboradores⁴⁴ con un alto porcentaje de confianza (84-89%)⁴⁵.

$$Kup = f_{EW} + \left(\frac{1+10^{pKa-pH_{IW}}}{1+10^{pKa-pH_p}} * f_{IW} \right) + \left(\frac{Ka*[AP^-]_T * 10^{pKa-pH_{IW}}}{1+10^{pKa-pH_p}} \right) + \left(\frac{P*f_{NL} + ((0.3P+0.7)*f_{NP})}{1+10^{pKa-pH_p}} \right) \quad (3)$$

Dónde: f_{EW} , f_{IW} , f_{NL} y f_{NP} son las fracciones de agua extracelular, de agua intracelular, de lípidos neutros y fosfolípidos neutros en el tejido, respectivamente; $[AP^-]_T$ son los fosfolípidos ácidos del tejido; pKa es el logaritmo negativo de la constante de asociación de la base (cocaína en este caso); P es el coeficiente de partición octanol: agua de la molécula no ionizada a pH 7.4; Ka es la constante de afinidad de la sustancia por los fosfolípidos en el tejido; pH_{IW} , pH_p , se refieren al pH del agua intracelular del tejido y del plasma, respectivamente.

Para estimar el valor de Ka se hizo un re-arreglo de la Ecuación 3, aplicándolo a las células sanguíneas (subíndice BC; Ecuación 4).

$$Ka_{BC} = \left(Kpu_{BC} - \left(\frac{1+10^{pKa-pH_{BC}}}{1+10^{pKa-pH_p}} * f_{IW,BC} \right) - \left(\frac{P*f_{NL,BC} + (0.3P+0.7)*f_{NP,BC}}{1+10^{pKa-pH_p}} \right) \right) * \left(\frac{1+10^{pKa-pH_p}}{[AP^-]_{BC} * 10^{pKa-pH_{BC}}} \right) \quad (4)$$

Dónde $Kpu_{BC} = \frac{B:P}{Ht*f_u^p} - \frac{1-Ht}{Ht*f_u^p}$, que es la proporción de la concentración de agua célula sanguínea-plasma; y Ht es el hematocrito.

Los parámetros de composición de los tejidos para rata se muestran en la Tabla 5, y los datos de las células sanguíneas para el cálculo de Ka_{BC} en la Tabla 6.

Tabla 5. Parámetros de composición de los tejidos, necesarios para el cálculo de K_{up} en rata, para la cocaína, de acuerdo a la Ecuación 3 propuesta por Rodgers y colaboradores.

Tejido	Fracción de peso del tejido húmedo				Concentración tisular de fosfolípidos ácidos (mg/g)
	Lípidos neutros (f _{NL})	Fosfolípidos neutros (f _{NP})	Agua extracelular (f _{EW})	Agua Intracelular (f _{IW})	
Células sanguíneas	0.0017	0.0029	NA	0.603	0.5
Adiposo	0.853	0.0016	0.135	0.017	0.4
Hueso	0.017	0.0017	0.1	0.346	0.67
Cerebro	0.039	0.0015	0.162	0.62	0.4
Intestino	0.038	0.0125	0.282	0.475	2.41
Corazón	0.014	0.0111	0.32	0.456	2.25
Riñón	0.012	0.0242	0.273	0.483	5.03
Hígado	0.014	0.024	0.161	0.573	4.56
Pulmón	0.022	0.0128	0.336	0.446	3.91
Músculo	0.01	0.0072	0.118	0.63	1.53
Piel	0.06	0.0044	0.382	0.291	1.32
Bazo	0.0077	0.0113	0.207	0.579	3.18

Nota Fuente: Rodgers T, y colaboradores. (2005). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling 1 : Predicting the Tissue Distribution of Moderate-to-Strong Bases⁴⁴.

Tabla 6. Datos fisiológicos sobre las células sanguíneas, para el cálculo de K_{BC} de la Ecuación 4, planteada por Rodgers y colaboradores.

Parámetro	Valor	Referencia
pH del plasma (pH _p)	7.4	Waddell WJ, Bates RG. 1969 ⁴⁶ .
pH del agua intracelular del tejido (pH _{IW})	7	Tehrani AY, y colaboradores.1982 ⁴⁷ .
pH de las células sanguíneas (pH _{BC})	7.22	Kummerow D, y colaboradores. 2000 ⁴⁸ .
Hematocrito rata macho (Ht)	51.3	Arcila, y colaboradores. 2010 ⁴⁹ .

5.1.3. Simulación del modelo

Se utilizó el programa Maple™ 18. Ink ©Maplesoft 2014, para la resolución numérica del modelo PBPK utilizando las herramientas de ecuaciones diferenciales *with(DEtools)*. Para graficar se consideró que las concentraciones iniciales, al tiempo cero, en cualquier órgano fuera de cero, y para la concentración venosa se dividió la cantidad administrada entre el volumen sanguíneo venoso.

Es importante mencionar que para la resolución de las EDO se aplica el método numérico de Euler⁵⁰, que se basa en la pendiente estimada de la función para extrapolar desde un valor anterior a un valor nuevo:

$$y_{i+1} = y_i + \phi h$$

Que quiere decir:

Nuevo valor = valor anterior + pendiente × tamaño de paso

Donde: La pendiente es la EDO; $\phi = \frac{dy}{dx} = f(x,y)$

Y el tamaño de paso se refiere a que la formula se aplica paso a paso para encontrar el siguiente valor consecutivo y así trazar la trayectoria de la solución.

En este modelo se usó un tamaño de paso de 0.01 (*stepsize=0.01*), lo que especifica que se tome un punto en la variable independiente a una distancia de 0.01 unidades uno del otro.

5.2. COMPARACIÓN DEL MODELO PBPK CON DATOS EXPERIMENTALES

Para saber si lo obtenido en el modelo es pertinente, se recopilaron resultados obtenidos en otros estudios por diferentes autores sobre la distribución de la cocaína en rata (Tabla 10). Los resultados a una misma dosis de 5mg/kg se juntaron para mostrarlos como un solo estudio, y así completar tiempos de muestreo, y se separó otro más que empleó una dosis de 8mg/kg. Así también se recopilaron parámetros farmacocinéticos de la cocaína de diferentes estudios (Tabla 11).

Además, se decidió comenzar con estudios de administraciones controladas en animales de laboratorio que servirán como base, para que más adelante se pueda realizar un estudio farmacocinético completo que ayude a validar el modelo PBPK. Estos resultados se muestran en el anexo-A.

6. RESULTADOS

Representación del Modelo PBPK

Para representar el modelo PBPK se incluyeron trece compartimentos (Figura 13): la sangre venosa y la sangre arterial, por ser los sitios de administración y muestreo; el cerebro, al ser el órgano donde se presenta la mayor actividad farmacodinámica; el riñón y el hígado, al ser órganos de eliminación, y de metabolismo; el tejido adiposo y el músculo por ser sitios posibles de almacenamiento; los pulmones, porque conectan a la sangre venosa y arterial; y los demás órganos para completar el balance de masa (corazón, bazo, intestino, piel y hueso).

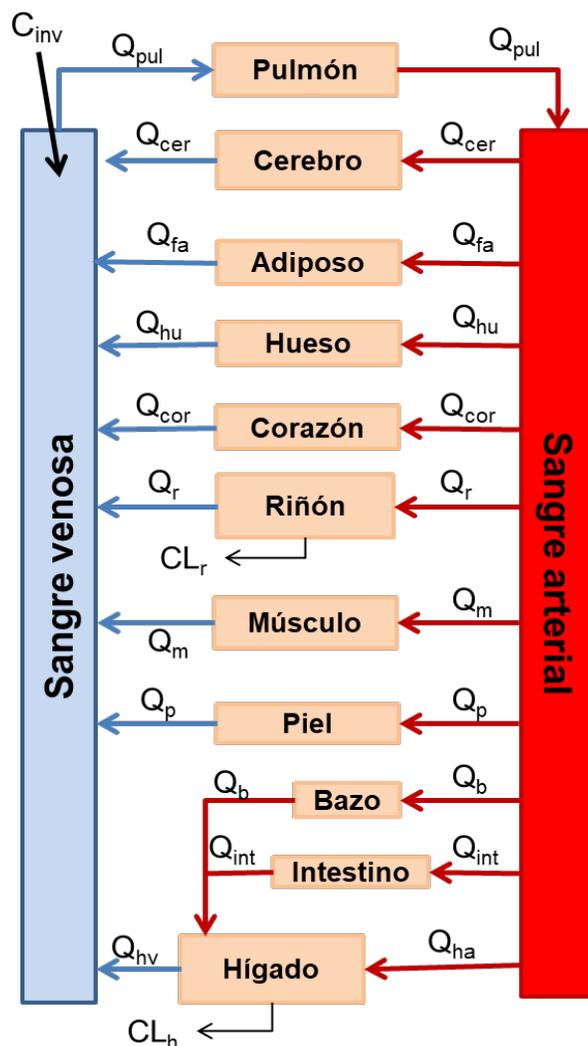


Figura 13. Modelo multicompartimental propuesto para el flujo fisiológico de la cocaína en rata y en humano. Q se refiere al flujo de sangre; para los pulmones (pul), el cerebro (cer), el tejido adiposo (fa), el hueso (hu), el corazón (cor), los riñones (r), el músculo (m), la piel (p), el bazo (b), el intestino (int), de la arteria hepática (ha), y la vena hepática (hv). Para la administración de la cocaína se eligió la vía intravenosa (C_{inv}), y la eliminación se representa como que ocurre solamente en hígado (aclaramiento hepático, CL_h) y en los riñones (aclaramiento renal, CL_r).

Para los tejidos que no eliminan o metabolizan al sustrato la EDO se representa, de manera general, como a continuación se muestra:

$$V_T \frac{dC_T(t)}{dt} = Q_T \times \left(C_a(t) - \frac{C_T(t)}{P_T} \right) \quad (5)$$

Dónde, C_a es la concentración arterial que entra al tejido, que es un término dependiente del tiempo (t).

La EDO del riñón (subíndice r) incluye el aclaramiento renal (CL_r):

$$V_r \frac{dC_r(t)}{dt} = Q_r \times \left(C_a(t) - \frac{C_r(t)}{P_r} \right) - CL_r C_r(t) \quad (6)$$

Y en el caso del hígado (subíndice h) se eligió incorporar el aclaramiento hepático (CL_h), considerando que fuese el 90% del aclaramiento total:

$$V_h \frac{dC_h(t)}{dt} = Q_h \times \left(C_{in} - \frac{C_h(t)}{P_h} \right) - CL_h C_h(t) \quad (7)$$

Dónde C_{in} es la concentración de cocaína que entra al hígado, la cual proviene de la sangre arterial, del bazo y del intestino como se observa en la Figura 13, y se traduce de la siguiente manera:

$$C_{in} = \frac{1}{Q_h} \times \left(Q_{ha} C_a(t) + Q_b \frac{C_b(t)}{P_b} + Q_{int} \frac{C_{int}(t)}{P_{int}} \right) \quad (8)$$

Por lo que al incorporar la Ecuación 8 en la 7, la EDO para el hígado quedó como:

$$V_h \frac{dC_h(t)}{dt} = \left(Q_{ha} C_a(t) + Q_b \frac{C_b(t)}{P_b} + Q_{int} \frac{C_{int}(t)}{P_{int}} - Q_h \frac{C_h(t)}{P_h} \right) - CL_h C_h(t) \quad (9)$$

Para el compartimento de la sangre arterial (a) se observa en la Figura 13 que la concentración de entrada proviene del pulmón (pu), y éste a su vez recibe lo de la sangre venosa (v), por lo que la EDO de la sangre arterial queda como se muestra en la Ecuación 10, y la del pulmón como la Ecuación 11:

$$V_a \frac{dC_a(t)}{dt} = Q_c \times \left(\frac{C_{pul}(t)}{P_{pul}} - C_a(t) \right) \quad (10)$$

$$V_{pul} \frac{dC_{pul}(t)}{dt} = Q_{pul} \times \left(C_v(t) - \frac{C_{pul}(t)}{P_{pul}} \right) \quad (11)$$

Dónde Q_c se refiere al gasto cardiaco, y tiene el mismo valor que Q_{pul} .

Finalmente, para el compartimento de la sangre venosa (v) la concentración que entra es la suma de las concentraciones que salen de todos los tejidos (excepto bazo e intestino), y la EDO es la siguiente:

$$V_v \frac{dC_v(t)}{dt} = \left[Q_{cer} \frac{C_{cer}(t)}{P_{cer}} + Q_{fa} \frac{C_{fa}(t)}{P_{fa}} + Q_{hu} \frac{C_{hu}(t)}{P_{hu}} + Q_{cor} \frac{C_{cor}(t)}{P_{cor}} + Q_r \frac{C_r(t)}{P_r} + \right. \\ \left. Q_m \frac{C_m(t)}{P_m} + Q_p \frac{C_p(t)}{P_p} + Q_h \frac{C_h(t)}{P_h} \right] - [Q_c * C_v(t)] \quad (12)$$

Parametrización del modelo

En cuanto a la parametrización, en la Tabla 7 se muestran los parámetros fisiológicos específicos para rata que se recopilaron de diferentes fuentes. Así también, se presentan los coeficientes de partición tejido: sangre que fueron calculados con las ecuaciones 2, 3 y 4 y usando los datos de las Tablas 5,6 y 8

En la Tabla 8 se muestran los parámetros fisicoquímicos y bioquímicos específicos para la cocaína, que fueron recopilados o calculados. Excepto por los datos de aclaramiento, los demás valores fueron utilizados para realizar los cálculos de los coeficientes de partición tejido: sangre.

Tabla 7. Parámetros fisiológicos específicos de especie (para rata de 250g y Gasto cardiaco total, Qc de 0.055L/min) y coeficientes de partición específicos de tejido y de sustancia (cocaína) calculados con el modelo de Rodgers y colaboradores.

Parámetro →	Flujo sanguíneo (Qc=0.055 L/min) ^d		Volumen del tejido (BW= 0.25kg)			Coeficiente de partición tejido-sangre P _t
	%Gasto Cardiaco	Q _t (L/min)	%BW	Densidad (kg/L) ^b	Volumen (L) V _t	
Cerebro (cer)	2.82 ^a	0.0016	0.6 ^c	1.04	0.0014	1.9170795
Riñones (r)	14.1 ^b	0.0078	0.98 ^d	1.05	0.0023	7.2635099
Hígado Total (h)	19.94 ^b	0.0110	4.9 ^d	1.04	0.0123	6.7763547
Arteria hepática (ha)	2.4 ^b	0.0013	----	----	----	----
Vena hepática (hv)	17.54	0.0096	----	----	----	----
Bazo (b)	2 ^c	0.0011	0.26 ^e	1.05	0.0006	5.0532225
Intestino (int)	15.54 ^a	0.0085	3.8 ^e	1.04	0.0091	4.2332274
Corazón (cor)	5.8 ^d	0.0032	0.33 ^b	1.03	0.0008	3.8419169
Pulmón (pul)	100 ^c	0.0550	0.67 ^d	1.05	0.0016	5.9292963
Músculo (m)	27.8 ^b	0.0153	40.43 ^b	1.04	0.0972	3.0704933
Hueso (hu)	5.4 ^d	0.0030	7.7 ^d	1.43	0.0135	1.5865947
Piel (p)	10.5 ^e	0.0058	16.9 ^d	1.11	0.0381	2.8220737
Adiposo (fa)	5.1 ^d	0.0028	8.2 ^d	0.916	0.0224	7.2657847
Sangre arterial (a)	100 ^c	0.0550	2.72 ^f	1.054	0.006451	----
Sangre venosa (v)	100 ^c	0.0550	5.44 ^f	1.054	0.012903	----

Nota Fuente: a)Sakaeda, 1998⁵¹; b)Brown, 1997⁵²; c)Thompson, 2012⁵³; d)Delp, 1998⁵⁴; e)Davies, 1993⁵⁵; f)Poulin, 2002⁵⁶.

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos y de bioquímicos específicos de la cocaína, para el modelo PBPK en rata.

Parámetro de entrada	Valor
Log coeficiente de partición octanol: agua de la molécula no ionizada (LogP)	2.30 ^a
Coeficiente de partición octanol: agua de la molécula no ionizada (P)	199.53 [*]
Fracción no unida en plasma (fu _p)	0.68 ^b
Relación Sangre: Plasma (B:P)	1.01 ^b
Constante de ionización (pKa)	8.61 ^a
Aclaramiento total para rata (CL _T)	0.0425 L/min ^b
Aclaramiento renal para rata (CL _r)	0.0022 L/min ^c
Aclaramiento hepático para rata (CL _h)	0.0383 L/min ^c
Proporción de la concentración de agua célula sanguínea-plasma (Kpu _{BC})	1.4709 ^c
Ka _{BC}	0.7664 ^c

Nota Fuente: a) Wishart, DS, y colaboradores DrugBank. (2010). Comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration⁵⁷; *P=10^{^(LogP)}. b) Sukbuntherng J, y colaboradores. (1996). Characterization of the Properties of Cocaine in Blood: Blood Clearance, Blood to Plasma Ratio, and Plasma Protein Binding⁵⁸. c) Valores calculados: CL_r=GFR*fu_p; GFR=3.2mL/min⁵⁹, o bien que es el 5.2% del aclaramiento total⁵⁸; y CL_h=CL_T*0.9 considerando que se biotransforma en hígado el 90% de la dosis absorbida³²; Kpu_{BC} y Ka_{BC} fueron calculados con la ecuación 4.

Simulación del modelo PBPK

Después de realizar diferentes pruebas en Maple™ 18, se obtuvieron los gráficos mostrados en la Figura 14 para representar la concentración de cocaína en distintos órganos, incluyendo la sangre venosa y arterial, mostrando un comportamiento de decrecimiento exponencial.

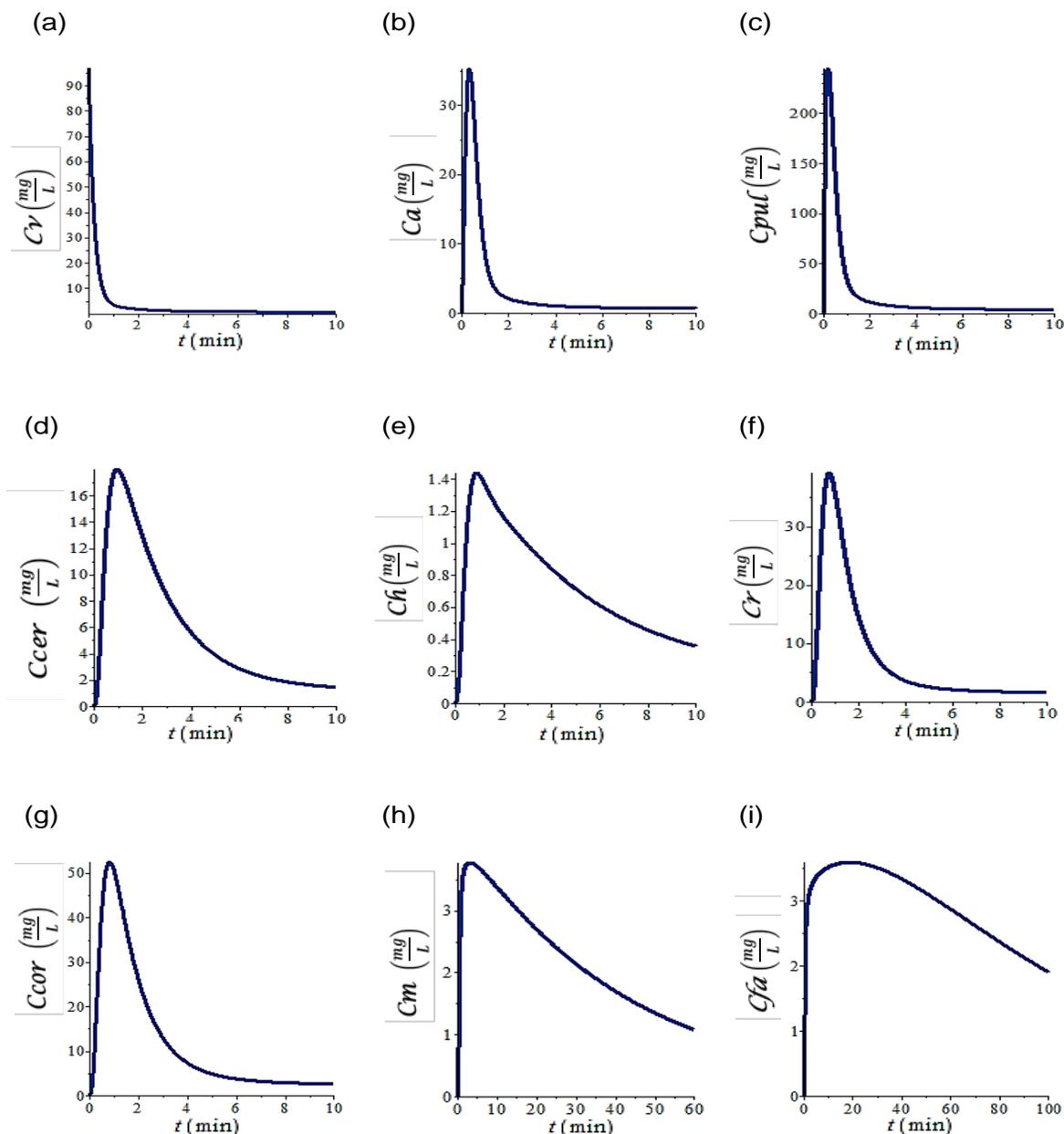


Figura 14. Concentraciones predichas de cocaína (mg/L) en sangre venosa (a), sangre arterial (b), pulmón (c), Cerebro (d), hígado (e), riñón (f), corazón (g), músculo (h) y tejido adiposo (i), después de una administración de 5mg/kg de cocaína en rata. Sólo para músculo y tejido adiposo, el tiempo de simulación se extendió más de 10 minutos (a 60 y 100 minutos respectivamente) debido a que en ese tiempo aún no se mostraba un decrecimiento tan marcado como en el resto de los compartimentos.

Con los parámetros y resultados obtenidos en la simulación del modelo PBPK para cocaína en rata se pudieron calcular los parámetros farmacocinéticos que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros calculados en el presente estudio, con ayuda del modelo PBPK.

Parámetro	Cálculo	Valor
Volumen de distribución	$V_d = V_v + V_a + \sum V_T P_T$	3.06 L/kg
Kel (sangre venosa)	Pendiente de graficar LnCp vs t	1.10 min ⁻¹
t _{1/2} (sangre venosa)	$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}}$	0.63 minutos

Base de datos de distribución y de la farmacocinética de la cocaína, reportados por distintos autores

Tabla 10. Concentraciones de cocaína reportadas por diferentes autores en varios órganos de rata, los valores se presentan en microgramos por gramo de tejido húmedo o por mL de fluido. Se muestran con el fin de hacer comparación entre ellos y con lo obtenido en el modelo PBPK.

Dosis	5 mg/kg			8 mg/kg				
	0.083h	0.25h	0.5h	0.25h	0.5h	1h	2h	4h
Tejido o fluido								
Cerebro	8.8	7.4	2.5	7.27	2.74	0.92	0.21	0.01
Bazo	10.5	7.8	3.9	12.84	7.34	3.62	0.52	0.06
Riñón	11.4	7.1	3.8	10.81	3.46	1.39	0.37	0.08
Pulmones	2.9	2.1	1.4	8.80	3.77	1.46	0.51	0.10
Testículos				6.75	4.78	3.64	0.90	0.05
Intestino				6.71	3.01	1.31	0.45	0.03
Hígado	0.9	1.3	0.5	3.42	1.07	0.81	0.29	0.12
Adiposo				3.48	2.30	1.63	0.21	0.01
Músculo				2.98	1.32	0.59	0.16	0.01
Corazón	5	3.5	1.6	2.76	1.22	0.44	0.12	0.01
Plasma	0.9	0.4	0.3	0.61	0.30	0.11	0.03	0.00
Referencia	(a)			(b)				

Nota Fuente: (a) Rofael H, y Abdel-RahmanHelen M (2003). Reduction of tissue concentration of cocaine in rat by ketamine⁶⁰; (b) Nayak P, Misra A, Mulé S. (1976). Physiological Disposition and biotransformation of [3H] Cocaine in acutely and Chronically Treated Rats.⁶².

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos recopilados de diferentes autores para distintas dosis de administración de cocaína en rata

Parámetro (unidades)	(a)	(b) Suero arterial	(b) Suero venoso	(c)		(d)			(e)
Peso corporal (kg)	0.378-0.386	0.378-0.386	0.378-0.386	0.406	0.395	0.309	0.325	0.34	--
Dosis IV (mg/kg)	2.00	2.00	2.00	5.000	2.500	0.5	1	3	5
Cmax (µg/mL)	--	--	--	0.002	0.0016	--	--		0.064
MRT (min)	30.10	19.60	36.40	34.50	36.100	16.1	15.9	14.5	--
Vc (L/kg)	2.500	0.70	2.26	--	--	--	--	--	--
Vd (L/kg)	4.950	2.20	6.11	5.240	5.800	3.3	3.2	2.8	0.9
CL (L/min/kg)	0.164	0.1122	0.1683	0.155	0.158	0.2044	0.20	0.19	0.051

Nota Fuente: (a) Sun y Lau, 2001. Modelo 1 Cocaína en rata ⁶³; (b) Sun y Lau, 2001. COC en rata. Grupo 1. Suero arterial y Grupo 2. Suero venoso ⁶⁴; (c) Mets, y colaboradores 1999 Cocaína en rata ⁶⁵; (d) Booze, 1997 Cocaína IV en rata; (e) Raje y colaboradores. 2003.

7. DISCUSIÓN

El modelo PBPK planteado se planteó de la manera más simple posible para minimizar el número de parámetros dando como resultado ecuaciones diferenciales de baja complejidad. Por ello, la eliminación de la cocaína sólo se representó por medio del aclaramiento hepático y renal, sin incluir procesos enzimáticos ya que como se describió antes, hay más de una ruta de biotransformación que se presenta en el hígado y también en la sangre (páginas 25 y 26). Además, obsérvese que no se prosiguió con el agrupamiento de los compartimentos (*“lumping”*), ya que para esto es necesario normalizar los perfiles de concentración-tiempo de todos los órganos e identificar aquellos que tengan una cinética de eliminación similar⁴⁵, para lo cual en principio es importante saber si lo obtenido *in silico* es congruente.

Como resultado de la simulación en MapleTM 18, se observó que la vida media de la cocaína en sangre venosa de rata es muy corta, con un valor de 0.63 minutos (Tabla 9) sugiriendo que casi instantáneamente se biotransforma o se elimina del organismo.

De igual manera en los tejidos se absorbe en menos de 2 minutos y se elimina de ellos en menos de 10 minutos, a excepción de músculo y tejido adiposo dónde se absorbe más lentamente y disminuye la concentración a la mitad, en un tiempo mayor a 20 y 40 minutos respectivamente (Figura 14).

Como siguiente paso es necesario comparar datos experimentales reportados en la literatura con lo obtenido por el modelo, para así poder comprender mejor la distribución de la cocaína en los órganos seleccionados. Adicionalmente se obtuvieron datos experimentales que también se pueden considerar para observar tendencias de distribución en los tejidos, además de proporcionar una idea de los tiempos de muestreo más apropiados para las matrices. Este procedimiento y los resultados de las muestras son presentados como complemento del trabajo en el anexo-A siendo que el propósito del trabajo es simplemente plantear el modelo.

En los resultados de Rofael H. y Abdel-RahmanHelen M⁶⁰ y Nayak P. y colaboradores⁶² mostrados en la Tabla 10, se observa que los órganos donde se alcanza una mayor concentración de cocaína es en cerebro, bazo y riñón, y en el caso de la dosis de 8mg/kg en el pulmón también se alcanza una concentración alta (8.8µg/g), lo cual se puede entender por ser los compartimentos de menor tamaño, con volúmenes menores a 3mL (ver Tabla 7 en resultados), y en el caso del pulmón también por ser el primer órgano que recibe la concentración proveniente de la sangre venosa, tal y como se planteó la Ecuación 11. Esto también tendría que aplicar para el corazón, tal como se observa en lo predicho por el modelo PBPK (Figura 14), sin embargo, los resultados reportados no muestran una concentración similar o mayor a la de los órganos ya mencionados. La mejor explicación a esto podría ser que, muy probablemente, sólo se usó una muestra para determinar la concentración en el total del tejido sin que los autores hayan considerado como tal que el corazón está dividido, y al igual que el pulmón se conecta a sangre arterial y venosa, pues en ninguno de los casos se especifica la manera en que se tomó la muestra de este órgano, para que este tipo de muestras proporcione datos poco cuestionables, es necesario trabajar con un conjunto de muestras representativas, para lo cual se sugiere juntar una cantidad, moler y tomar la muestra a analizar de un batido. Para el modelo PBPK también es posible realizar una consideración adicional

para este órgano, e inclusive se propone realizar una mejor estimación del coeficiente de partición tejido: sangre. Bonate y colaboradores⁶⁶ en 1996 reportan un modelo PBPK para la cocaína, y en su caso dividieron al corazón en izquierdo y derecho, además de plantear una ecuación para corregir la concentración en este tejido. Sin embargo, no reportan el efecto sobre el modelo de hacer dicha corrección o no.

Otro compartimento del que evidentemente se debe analizar su EDO en el modelo PBPK es el sanguíneo, ya que los resultados recopilados en la Tabla 10 muestran que la concentración de cocaína en plasma es la menor de todos los tejidos, lo cual es congruente considerando que es un volumen mayor y que además en la sangre hay enzimas que biotransforman a la cocaína. Además, el descenso de la concentración no es de inmediato. Para tener otro tipo de referencia, en la Tabla 11 se recopilaron parámetros farmacocinéticos de la cocaína reportados por distintos autores, donde se puede observar que aún con una dosis menor a la empleada en este estudio, la vida media de la cocaína (reportada como tiempo medio de retención, MRT) es mayor a 10-15 minutos, inclusive hasta más de 30 minutos (siendo el calculado en este modelo de 0.63 minutos). Esto indica que en la EDO de los compartimentos sanguíneos y del pulmón hace falta considerar un parámetro o parámetros que permitan mantener la concentración de cocaína por más tiempo, y comprobar que ese cambio sea significativo en el ajuste del modelo porque, como ejemplo, Bonate y colaboradores no encontraron diferencia estadística entre incluir o no sitios de unión en los pulmones⁶⁶. Tal vez, tenga que ajustarse más a la realidad, es decir, a cómo ocurre la circulación sanguínea entre el corazón y los pulmones, y/o considerando alguna dilución por el transporte entre venas y arterias³³, como lo quisieron plantear Bonate y colaboradores⁶⁶. Además, hay que recordar que en las EDO's planteadas existe un término negativo que representa la concentración de cocaína que se va eliminando, y el valor que va tomando es de acuerdo a la concentración inmediata anterior, por lo que en la EDO de la sangre venosa (Ecuación 12) el primer valor que se está restando es la concentración venosa inicial, un valor grande y que en realidad no debería restarse por completo, e inclusive al inicio se podría presentar una fase de distribución tardía, tal como se aprecia en la Figura 18-b de los resultados experimentales (anexo-A). Es por ello que se puede pensar que un cambio que haría falta en la EDO de la sangre venosa es el incorporar

algún otro parámetro bioquímico que ayude a describir mejor el curso temporal de la cocaína en este compartimento, como unión a proteínas, o datos enzimáticos.

Un parámetro más que se calculó es el volumen de distribución (Tabla 9), que se determinó considerando los volúmenes de los compartimentos y los coeficientes de partición, obteniendo un valor de 3.06 L/kg, que es menor en comparación a lo calculado por Mets y colaboradores⁶⁵, quienes administraron una dosis de 5mg/kg y una de 2mg/kg, señalando que el valor de este parámetro es independiente de la dosis administrada, al igual que lo concluyen Booze y colaboradores⁶⁷. Sin embargo, en la Tabla 11, donde se muestran estos resultados, también se puede apreciar que entre autores obtienen valores distintos para el volumen de distribución, sobre todo Raje y colaboradores⁶⁸, que presentan el valor más pequeño de todos. Un punto importante en esto, es que para este cálculo se parte de usar las concentraciones encontradas en sangre venosa, y tal como lo muestran Sun y Lau (b)⁶⁴, resulta diferente usar sangre venosa que sangre arterial. En cambio, en el cálculo para el modelo PBPK se usan todos los volúmenes de los distintos compartimentos y además involucra la lipofilidad a cada uno de ellos (con los coeficientes de partición), lo cual podría explicar la diferencia entre los valores, ya que estos parámetros varían un poco para cada rata, por su peso corporal total, y el de cada uno de sus órganos.

Ahora bien, se pueden analizar las tendencias en la distribución de la cocaína en los distintos órganos, y compararlo con los resultados que se recopilan en la Tabla 10 con los datos obtenidos en el experimento preliminar realizado en este trabajo (anexo-A).

En la simulación del modelo PBPK, la Figura 14 muestra que el tejido adiposo es donde se queda durante más tiempo la cocaína, lo cual se puede entender por la naturaleza lipofílica de la cocaína, y que por lo mismo el coeficiente de partición es mayor en comparación de los otros órganos. Experimentalmente esto también se puede apreciar en los experimentos de Nayak P. y colaboradores⁶² (Tabla 10), pues en comparación con los otros órganos que no eliminan a la sustancia de abuso, es en el tejido adiposos donde se observa una disminución paulatina de la concentración.

Este comportamiento es similar en el músculo, pero al tener un coeficiente de partición con valor menor al del tejido adiposo, se comprende que la afinidad de la cocaína por este tejido sea menor, es decir, que su permanencia en el músculo no es tan prolongada (Figura 14). En los resultados mostrados en la Figura 18-a (anexo-A) se puede observar que en el músculo la concentración de cocaína disminuye lentamente, en comparación con la contracción en el cerebro.

A pesar de las tendencias encontradas en tejido adiposo y muscular, es importante mencionar que ambos órganos son difíciles de estudiar, pues su composición e irrigación sanguínea es diferente a lo largo de todo el organismo⁶⁶, por lo que, experimentalmente, es necesario especificar el origen del tejido a analizar (parte anatómica del cuerpo) para poder realizar la comparación con el modelo PBPK de forma correcta.

Por otro lado, con las curvas de hígado y riñón de la Figura 14, obtenidas en la simulación del modelo PBPK, se puede decir que aunque en el riñón se alcance una mayor concentración de cocaína que en hígado, se elimina más rápido de éste, y concuerda con lo obtenido experimentalmente por Nayak P. y colaboradores⁶² (Tabla 10). Además, por el poco tiempo que permanece la sustancia en éstos órganos es que se puede entender que al menos en la orina, se detecte la cocaína en no más de 36-72 horas³⁶, y adicionalmente habla de la hidrólisis rápida en el hígado, pues la permanencia de la droga en este órgano tampoco es extensa si se considera que recibe lo proveniente de otros órganos.

Por toda esto sobre la distribución de la cocaína en los distintos órganos considerados para el modelo PBPK, está claro que no es lo mejor ajustarla a un modelo monocompartimental o bicompartimental (como lo sugieren Javaid y colaboradores⁴¹ y Cone³³ respectivamente), porque además de eliminarse de la sangre de manera rápida al inicio, por la distribución hacia los órganos, también se presenta una eliminación más lenta en músculo y tejido adiposo por una mayor afinidad, lo que indica que se debe considerar un modelo multicompartimental.

Adicionalmente, también es posible hacer una relación entre la concentración sanguínea y la del cerebro, que es el órgano blanco de mayor actividad

farmacodinámica. En este caso existe un término que explica el retardo entre el máximo de la concentración plasmática y el máximo de la concentración en el sitio-efecto, que se denomina canónicamente histéresis⁶⁹. En el caso de la cocaína se puede observar que en los primeros 10 minutos (Tabla 10) mientras la concentración aumenta en el cerebro, en plasma ya está disminuyendo, lo cual también se puede apreciar en la simulación de modelo PBPK (Figura 14), aunque en menor tiempo.

Esta relación resulta de suma importancia en el ámbito forense, ya que el poder relacionar las concentraciones plasmáticas de cocaína en diferentes matrices podría ser de ayuda para estimar el tiempo desde el último consumo. Pues en conjunto a la muestra sanguínea que se pueda obtener de un individuo para su análisis, el diagnóstico de intoxicación por cocaína debe incluir criterios clínicos que se manifiestan sobre el Sistema Nervioso central, cardiovascular y respiratorio⁷⁰. En estudios previos^{61,71,72,33} se observó que por el hecho de encontrar concentraciones mayores de cocaína en cerebro que en sangre, puede ser el cerebro una mejor muestra forense en el análisis post mortem cuando se sospeche del uso de cocaína, pues la naturaleza lipofílica de esta sustancia le permite acumularse más en cerebro, además de ser más estable, es decir, de no ser degradada tan rápidamente como ocurre en la sangre⁷².

Lo anterior indica que es importante realizar este estudio con mayor detenimiento, para contar con resultados experimentales que refuercen lo predicho. Por ejemplo, los resultados que se muestran en el anexo-A (Tabla 13 y Figura 18), no demuestran claramente esta relación de concentraciones en cerebro y sangre venosa, pero sí se aprecia que la cocaína se podría encontrar hasta 48 horas después de su consumo en el cerebro, lo que no sucede en la sangre venosa. Sería entonces útil realizar más experimentos *in vivo* que aporten evidencias sobre la relación de las concentraciones de cocaína en ambas matrices. Se podría incluso realizar experimentos *in vitro* para obtener más datos que incorporar al modelo PBPK, como de los procesos enzimáticos que ocurren en sangre y cerebro, y sobre la permeabilidad entre estos tejidos.

En la Figura 15 se esquematiza un resumen de las observaciones mencionadas para identificar mejor las diferencias en las distintas matrices estudiadas y la relación existente entre algunas de ellas.

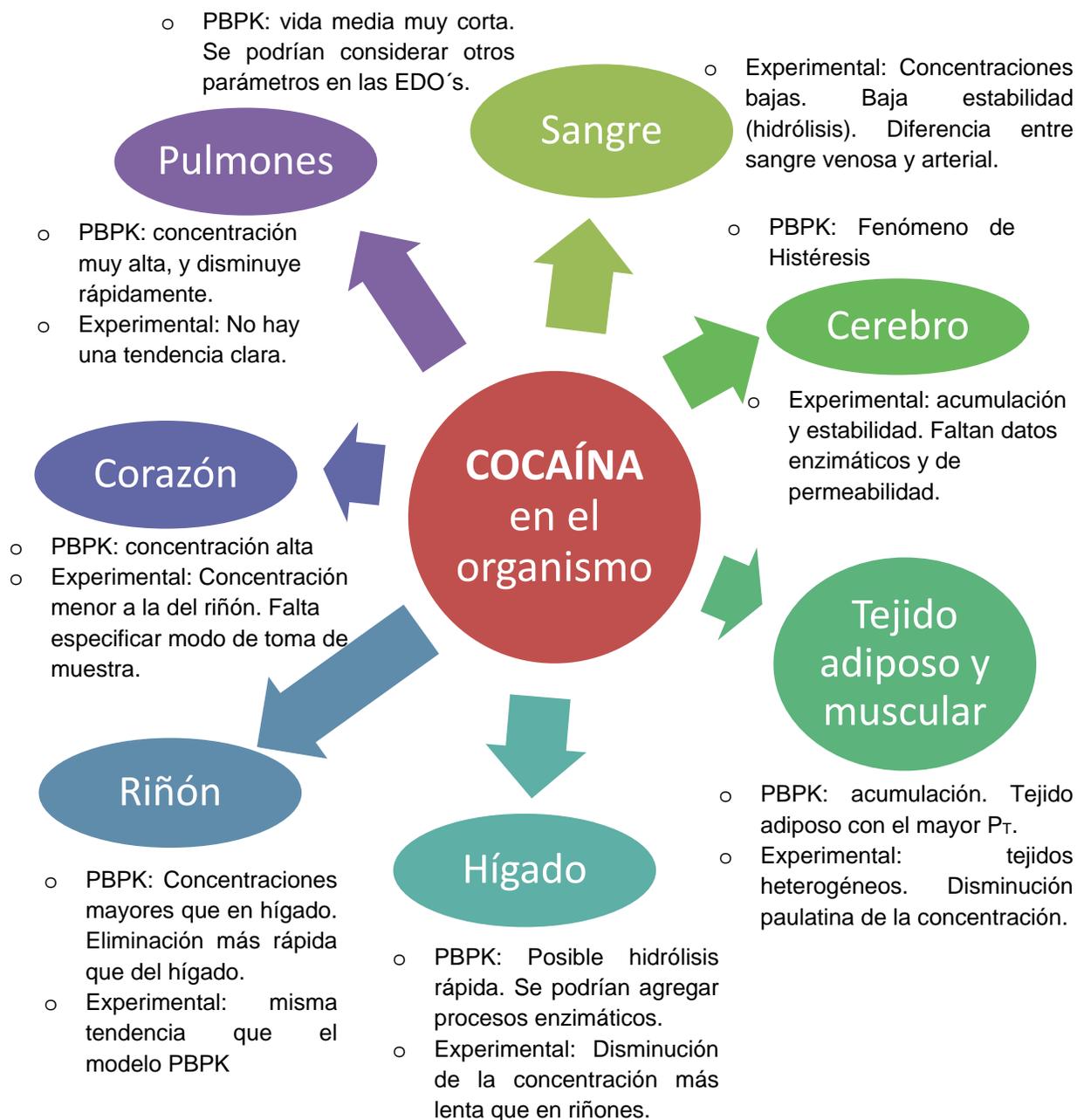


Figura 15. Resumen de los resultados observados en el modelo PBPK de cocaína para rata y de su comparación con datos experimentales.

8. CONCLUSIONES

Se planteó un modelo PBPK para describir la distribución de la cocaína en diferentes órganos, siendo el tejido adiposo donde se observó un mayor tiempo para llegar a la concentración máxima y para ser eliminada.

Los datos que se recopilaron de la literatura demuestran la variabilidad que se puede dar en la farmacocinética de la cocaína y que los modelos tradicionales propuestos por los autores son limitados para entender la distribución de la droga.

El modelo PBPK se formuló basándose en parámetros fisiológicos específicos para rata, la composición de los tejidos y parámetros específicos de la cocaína, por lo que se pudo comprender que estos son los factores que hacen que en algunos órganos se alcance una concentración mayor o que se retenga por más tiempo la cocaína.

En el caso de los compartimentos de sangre venosa, pulmones y sangre arterial, no es suficiente con que las ecuaciones diferenciales ordinarias sigan la distribución sistemática, si no que hace falta considerar, quizá, otros aspectos fisiológicos y/o bioquímicos para describir mejor el curso temporal de la cocaína en ellos.

El modelo PBPK planteado demuestra tener potencial para describir la toxicocinética de la cocaína y poder relacionar las concentraciones sanguíneas con las de cerebro (que igual se manifiesta físicamente en el individuo) y así poder ser empleado como herramienta de interpretación forense.

9. PERSPECTIVAS

- a) Reajustar las ecuaciones diferenciales ordinarias de los compartimentos sanguíneos y de los pulmones para que la vida media de la cocaína en sangre sea acorde a lo observado experimentalmente. Así como el tiempo que permanece la sustancia en cada tejido.

De acuerdo con lo observado, se pueden mencionar algunos aspectos a considerar para mejorar el modelo PBPK de cocaína en rata, como incluir la biotransformación de la cocaína con parámetros enzimáticos para que las concentraciones de la sustancia de abuso sean más exactas, e inclusive se podría modelar la formación, distribución y eliminación de al menos un metabolito para que en paralelo a las determinaciones del analito también se hagan las de un metabolito y sea doble comparación.

- b) Obtener más datos experimentales sobre la distribución y cinética de la cocaína en los distintos órganos que fueron considerados, mediante un estudio bien diseñado con administraciones controladas en animales de laboratorio.

En este aspecto, la parte experimental realizada ayudó a establecer los métodos de extracción de la cocaína más adecuados para las diferentes matrices, que fueron: extracción en fase sólida para sangre; y extracción líquido-líquido para cerebro y músculo. Esto, con base a la confirmación de la extracción de analito de interés en el cromatógrafo de gases.

De acuerdo con la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, y dado que el método no fue desarrollado por el laboratorio de toxicología no nos corresponde dicha validación. Sin embargo, dicho método se encuentra validado por el laboratorio que desarrollo la metodología, seleccionando la matriz más solicitada y representativa (sangre). Por lo que la metodología analítica empleada, fue utilizada como técnica de confirmación en el INCIFO para muestras positivas a consumo de cocaína.

Por otro lado, se sugiere realizar modificaciones cromatográficas que sean adecuados para poder identificar los metabolitos de la cocaína, principalmente a la benzoilecgonina, ya que a pesar de incluir un paso de derivatización antes del análisis cromatográfico no se detectó el metabolito.

10. REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública; Secretaría de Salud; *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Drogas*. México; 2012. http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ENA_2011_DROGAS_ILICITAS_.pdf. Accessed December 10, 2017.
2. Musshoff F, Stamer UM, Madea B. Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):53-62. doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.011
3. Bennett T, Holloway K. The Causal Connection Between Drug Misuse and Crime. *Br J Criminol*. 2009;49(4):513-531. doi:10.1093/bjc/azp014
4. Goldstein PJ. The Drugs/Violence Nexus: A Tripartite Conceptual Framework. *J Drug Issues*. 1985;15(4):493-506. doi:10.1177/002204268501500406
5. Quijano-Mateos, Alejandra; Castillo-Alanis, Alejandra; Bravo-Gómez M. Mathematical Models Employed to Predict the Timeframe of Intoxications as Interpretation Tools in Forensic Cases. *J Forensic Toxicol Pharmacol*. 2017;6(1). doi:10.4172/2325-9841.1000153
6. Himmelstein KJ, Lutz RJ. A Review of the Applications of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1979;7(2):127-145. doi:10.1007/BF01059734
7. Rowland M, Peck C, Tucker G. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:45-73. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100540 [doi]
8. Clewell HJ. The application of physiologically based pharmacokinetic modeling in human health risk assessment of hazardous substances. *Toxicol Lett*. 1995;79(1-3):207-217. doi:10.1016/0378-4274(95)03372-R
9. Aarons L. Physiologically based pharmacokinetic modelling: A sound mechanistic basis is needed. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60(6):581-583. doi:10.1111/j.1365-2125.2005.02560.x
10. Maharaj A, Edginton A. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling and Simulation in Pediatric Drug Development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3. doi:10.1038/psp.2014.45
11. Goodman Gilman A. *Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica*. 12a. ed. México: Mc Graw-Hill; 2012.
12. Mendoza N. *Farmacología Médica*. México: Editorial Medica Panamericana; 2008.
13. Flórez J. *Farmacología Humana*. 6a. edició. España: Elsevier Masson SAS; 2014.
14. Rang, HP; Dale M. *Farmacología*. 6a. Edició. España: Elsevier; 2008.

15. Karch S. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. (Taylor & Francis Group L, ed.). California, U.S.: CRC Press; 2007.
16. Schmitt W, Willmann S. Physiology-based pharmacokinetic modeling: Ready to be used. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):449-456. doi:10.1016/j.ddtec.2004.09.006
17. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). *Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment*. (National Center for Environmental Assessment, ed.). Washington, DC: Epa/600/R-05/043F; 2006. <http://epa.gov/ncea>.
18. Clewell RA, Clewell HJ. Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;50(1):129-143. doi:10.1016/j.yrtph.2007.10.012
19. Espié P, Tytgat D, Sargentini-Maier M-L, Poggese I, Watelet J-B. Physiologically based pharmacokinetics (PBPK). *Drug Metab Rev.* 2009;41(February):391-407. doi:10.1080/10837450902891360
20. Clewell H, Clewell RA, Andersen ME, Hammer Institutes for Health Sciences; Research Triangle Park; NC U. Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Risk Assessment. *Elsevier BV All rights Reserv.* 2011:536-570.
21. Muria M Di, Lamberti G, Titomanlio G. Physiologically Based Pharmacokinetics : A Simple , All Purpose Model. 2010:2969-2978.
22. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. *Man para uso los Lab Nac Anal estupefacientes.* 2012:1-48.
23. Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity-A Review. *Disease-a-Month.* 2009;55(1):6-38. doi:10.1016/j.disamonth.2008.10.002
24. Energy Control. *Servicio de Análisis de Sustancias (2015)*. España; 2015.
25. Basabe R. Diseño de un método para identificar y cuantificar cocaína en sangre por HPLC/MS. 2004.
26. Karch SMF. *Drug Abuse Handbook*. 2nd ed. USA: Taylor & Francis Group; 2007.
27. National Institute on Drug Abuse. Cocaine drug facts. 2016;(June):1-5. https://d14rmgrtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/cocainedrugfacts_final_june2016.pdf.
28. Degenhardt L, Singleton J, Calabria B, et al. Mortality among cocaine users: A systematic review of cohort studies. *Drug Alcohol Depend.* 2011;113(2-3):88-95. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.07.026
29. Téllez-Mosquera J, Cote-Menéndez M. Efectos toxicológicos y

neuropsiquiátricos producidos por consumo de cocaína. *Rev Fac Med.* 2005;53(1). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000100003&lng=en&tlng=es. Accessed October 15, 2016.

30. Jones RT. Pharmacokinetics of Cocaine: Considerations When Assessing Cocaine Use by Urinalysis.
31. Maurer HH, Sauer C, Theobald DS. Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. *Ther Drug Monit.* 2006;28(3):447-453. doi:10.1097/01.ftd.0000211812.27558.6e
32. Casales M, Zaragosa A, Fernandez C, Fernandez L. Metabolismo oxidativo de la cocaína en el hígado. 1997:287-309.
33. Cone EJ. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of cocaine. *J Anal Toxicol.* 1995;19(September 1984):459-478.
34. Jatlow P. Cocaine: Analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. *Yale J Biol Med.* 1988;61(2):105-113.
35. Sánchez JF. Diagnóstico químico-toxicológico del consumo de cocaína en humanos. *Rev CENIC Ciencias Biológicas.* 2001;32(3):189-199.
36. Sánchez Bruzón JF, Granda Fraga M, Oropesa Rodríguez R. Drogas de abuso Parte II: Diagnóstico del consumo de Cocaína Drugs of misuse. *Rev Cub Med Dep Cul Fís.* 2004;1(2).
37. Del Bosque J, Mairena AF, Díaz DB, et al. La cocaína: consumo y consecuencias. *Artículo Orig Salud Ment.* 2014;3737(5):381-389.
38. Fundación Gonzalo Río Arronte, I.A.P; Angulo-Rosas, E; Bernal-Reyes, J; Cruz-Martín del Campo, S; Fernández-Cáceres, C; Millán-Camacho, A; Palencia-Huezo C. *Guía Del Comunicador. Información Sobre Trastornos Del Uso de Drogas.* México; 2014.
39. Tancini F, Wu Y-L, Schweizer WB, et al. 1,1-Dicyano-4-[4-(diethylamino)phenyl]buta-1,3-dienes: Structure-Property Relationships. *European J Org Chem.* 2012;2012(14):2756-2765. doi:10.1002/ejoc.201200111
40. Pastor R, Llopis JJ, Baquero A. Interacciones y consecuencias del consumo combinado de alcohol y cocaína: una actualización sobre el cocaetileno. *Adicciones.* 2003;15(2):159-164.
41. Javaid JI, Musa MN, Fischman M, Schuster CR, Davis JM. Kinetics of cocaine in humans after intravenous and intranasal administration. *Biopharm Drug Dispos.* 1983;4(1):9-18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6839006>.
42. Zheng F, Zhan C-G. Modeling of Pharmacokinetics of Cocaine in Human Reveals the Feasibility for Development of Enzyme Therapies for Drugs of Abuse. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(7):e1002610. doi:10.1371/journal.pcbi.1002610

43. Poulin P, Theil FP. A priori prediction of tissue: Plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *J Pharm Sci.* 2000;89(1):16-35. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<16::AID-JPS3>3.0.CO;2-E
44. Rodgers T, Leahy D, Rowland M. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling 1 : Predicting the Tissue Distribution of Moderate-to-Strong Bases. *J Pharm Sci.* 2005;94(6):1259-1276. doi:10.1002/jps.20322
45. Pilari S, Huisinga W. Lumping of physiologically-based pharmacokinetic models and a mechanistic derivation of classical compartmental models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2010;37:365-405. doi:10.1007/s10928-010-9165-1
46. Waddell W, Bates R. Intracellular pH. *Physiol Rev.* 1969;49(2):1969.
47. Tehrani A, Lam Y, Lin A, Dosch S, Ho C. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of human red blood cells. *Blood Cells.* 1982;8(2):245-261.
48. Kummerow D, Hamann J, Browning J, Wilkins R, Ellory J, Bernhardt I. Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K⁺(Na⁺)/H⁺ exchange under low ionic strength. *J Membr Biol.* 2000;176:207-216.
49. Arcila V, Conde C, Nieto J, García F. Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas wistar/UIS (*Rattus norvegicus*) con parámetros establecidos en laboratorios de altos estándares. *Rev Spei Domus.* 2010;6(12):45-51. <http://wb.ucc.edu.co/sdmvz/files/2013/06/articulo-6-vol-6-n-12.pdf>. Accessed August 16, 2017.
50. Palacios F. *Métodos Numéricos: Resumen Y Ejemplos Tema 4: Resolución Aproximada de EDO's.*; 2008. <http://epsem.upc.edu/~fpq/numerico/resum/num-edos-resum.pdf>. Accessed August 29, 2017.
51. Sakaeda T, Fukumura K, Takahashi K, Matsumura S. Blood Flow Rate in Normal and Tumor-bearing Rats in Conscious State , under Urethane Anesthesia , and during Systemic Hypothermia. 1998;6(4):261-272.
52. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health.* 1997;13(4):407-484. doi:10.1177/074823379701300401
53. Thompson, Matthew D; Beard, Daniel A; Wu F. Use of partition coefficients in flow-limited physiologicallybased. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2012;39(4):313-327. doi:10.1007/s10928-012-9252-6
54. Delp MD, Evans M V, Duan C, Michael D, Evans M V. Effects of aging on cardiac output , regional blood flow , and body composition in Fischer-344 rats. 1998:1813-1822.
55. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993;10(7):1093-1094.

56. Poulin P, Theil F-P. Prediction of Pharmacokinetics prior to In Vivo Studies. II. Generic Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Drug Disposition. *Pharm Assoc J Pharm Sci J Pharm Sci J Pharm Sci*. 2002;91(91):1358-1370.
57. Wishart, DS; Knox, C; Guo, AC; Shrivastava, S; Hassanali, M; Stothard, P; Chang, Z; Woolsey, J; DrugBank : A comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkp970
58. Sukbuntherng J, Martin DK, Pak Y, Mayersohn M. Characterization of the Properties of Cocaine in Blood: Blood Clearance, Blood to Plasma Ratio, and Plasma Protein Binding. *J Pharm Sci*. 1996;85(6):567-571. doi:10.1021/js960026h
59. Hinojosa-Laborde C, Jespersen B, Shade R. Physiology Lab Demonstration: Glomerular Filtration Rate in a Rat. *JoVE (Journal Vis Exp)*. 2015;(101):e52425-e52425. doi:10.3791/52425
60. Rofael H, Abdel-Rahman Helen M. Reduction of tissue concentration of cocaine in rat by ketamine. *J Toxicol* 2003;66(3):241-251. doi:10.1080/15287390306372
61. Javaid JI, Davis JM. Cocaine disposition in discrete regions of rat brain. *Biopharm Drug Dispos*. 1993;14(4):357-364. doi:10.1002/bdd.2510140408
62. Nayak P, Misra A, Mulé S. Physiological Disposition and biotransformation of [3H] Cocaine in acutely and Chronically Treated Rats. *J og Pharmacol Exp Ther*. 1976;196:556-569.
63. Sun L, Lau CE. Simultaneous pharmacokinetic modeling of cocaine and its metabolites, norcocaine and benzoylecgonine, after intravenous and oral administration in rats. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(9):1183-1189.
64. Sun L, Lau CE. Arteriovenous serum cocaine concentration difference after intravenous bolus injection and constant-rate infusions: Relation to pharmacodynamic estimates in rats. *Eur J Pharm Sci*. 2001;14(4):261-269. doi:10.1016/S0928-0987(01)00180-4
65. Mets, B; Diaz J, Soo E, Jamdar S. Cocaine, Norcocaine, Ecgonine methylester and Benzoylecgonine pharmacokinetics in the rat. *Elsevier Science Inc*. 1999;65(12):1317-1328. doi:10.1016/S0140-6736(11)60068-8
66. Bonate, Peter L; Swann, Alan; Silverman P. Preliminary Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Cocaine in the Rat: Model Development and Scale-Up to Humans. *J Pharm Sci*. 1996;85(8):0-5.
67. Booze, R.M.; Lehner, A.F; Wallace, D.R; Welch, M.A; Mactutus CF. Dose-Response Cocaine Pharmacokinetics and Metabolite Profile Following Intravenous Administration and Arterial Sampling in Unanesthetized, Freely Moving Male Rats. *Clin Lymphoma*. 1997;19(1):7-15. doi:10.3816/CLM.2009.n.003.Novel

68. Rajc S, Cao J, Hauck A, Gao H, Eddington N. Evaluation of the Blood-Brain Barrier Transport, Population Pharmacokinetics, and Brain Distribution of Bzotropine Analogs and Cocaine Using in Vitro and in Vivo Techniques. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307(2):801-808. doi:10.1124/jpet.103.053504
69. Sepulveda P. *Conceptos Farmacocineticos En TIVA.* Santiago, Chile.; 2012. <http://www.medens.com/UploadedMediaFiles/M1L3.3> Farmacología II.pdf. Accessed September 4, 2017.
70. Organización Mundial de la Salud. *GUÍA DE BOLSILLO DE LA CLASIFICACIÓN CIE-10. Clasificación de Los Trastornos Mentales Y Del Comportamiento.* Décima rev. (Editorial Medica Panamericana, ed.). Madrid, España: Churchill Livingston; 2000. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42326/1/8479034920_spa.pdf. Accessed October 1, 2017.
71. Hernandez A, Andollo W, Lee W. Analysis of cocaine and metabolites in brain using solid phase extraction and full-scanning gas chromatography / ion trap mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 1994;65:149-156.
72. Moore C, Browne S, Tebbett I, Negrusz A. Determination of cocaine and its metabolites in brain tissue using High-Flow Solid-Phase extraction columns and High-Performance Liquid Chromatography. *Forensic Sci Int.* 1992;53(2):215-219.
73. Rodríguez-Yunta E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioeth.* 2007;13(1):25-40. doi:10.4067/S1726-569X2007000100004
74. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
75. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2007;22(3):659-661. doi:10.1096/fj.07-9574LSF
76. Abusada G, Abukhalaf I, Alford D, et al. Solid-Phase Extraction and GC / MS Quantitation of Cocaine , Ecgonine Methyl Ester , Benzoyllecgonine , and Cocaethylene from iconium , Whole Blood , and Plasma. *J Anal Toxicol.* 1993;17:353-358.
77. Farina M, Yonamine M, Silva OA. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Sci Int.* 2002;127(3):204-207. doi:10.1016/S0379-0738(02)00124-X
78. Shimomura ET, Hodge GD, Paul BD. Examination of postmortem fluids and tissues for the presence of methylecgonidine, ecgonidine, cocaine, and benzoyllecgonine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem.* 2001;47(6 I):1040-1047.
79. Pérez A MÁ. Confirmación de metabolitos de cocaína en sangre de muestras forenses empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (Tesis licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. 2017.

11. ANEXO-A: Estudio preliminar de administraciones controladas en animales de laboratorio

11.1. Experimentación en animales

En los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos existen variaciones interindividuales que pueden ser a nivel de: las enzimas que metabolizan a los fármacos u otras sustancias químicas, los transportadores y las moléculas blanco de las sustancias químicas y otros genes biomarcadores. Esta variabilidad trae como consecuencia diversas respuestas a las sustancias químicas, diferentes grados de toxicidad y distintas concentraciones después de la administración². Por estas razones, y por seguir las normas éticas para la investigación preclínica (cualquier experimento hecho en seres humanos debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal⁷³), se decidió comenzar con estudios de administraciones controladas en animales de laboratorio, y así poder evitar variables como la dosis, el ambiente, la interacción con otros xenobióticos, y en cierta medida la variabilidad genética, con el propósito de comprender mejor las relaciones matemáticas entre las concentraciones encontradas en tejidos y poder tener un punto de comparación con el modelo PBPK.

Materiales y reactivos.

- 1 Matraz volumétrico de 10.0mL.
- Solución salina estéril al 0.9% de cloruro de sodio, PiSA® (SSI)
- 1 jeringa de 10mL para extraer la solución salina de su contenedor.
- 12 Catéteres intravenosos periférico desechable Punzocat®
- 12 Jeringas de plástico de capacidad de 1mL con aguja removible SensiMedical®
- 1 Frasco con Isoflorano.
- 11 Tubos Capilares con heparina LAUKA® cortados a la mitad.
- 22 Tubos BD Vacutainer® de 13x75mm, con 10mg de fluoruro de sodio y 8mg de oxalato de potasio, marcados para contener 800µL de sangre.
- 1 tubo de Duralagrma GRIN MED-GR02®.
- 12 Tubos Falcon de 15mL.

- Alcohol, algodón y una Franela para limpiar.
- 1 Plumón indeleble y cinta masking tape TUK®.
- 2 Gradillas para tubos.
- Guantes de nitrilo, cubrebocas, cofias y batas de laboratorio.
- 1 Estuche de disección (pinzas de punta roma y tijeras).
- Fluoruro de sodio.
- 24 Frascos de plástico de boca ancha estéril con tapa de rosca de 20mL.
- 12 Frascos de plástico de boca ancha estéril con tapa de rosca de 40mL.
- 1 hielera de unicel con hielo para transportar las muestras biológicas.
- Bolsas para residuos biológico-infecciosos amarillas y rojas.

Animales.

Se emplearon 12 ratas Wistar-machos de peso corporal promedio de 269.5 g (rango, 258.8-280.2 g), que fueron alojadas en los cuartos de experimentación de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química, UNAM en condiciones controladas de ciclos de luz-oscuridad, temperatura y humedad. Se enumeraron de manera aleatoria marcándolas con un muesca en las orejas, y se acomodaron en cajas de policarbonato de 32 x 47 x 20cm etiquetadas, una para cada 3 animales, con agua y alimento suficiente, respetando así las indicaciones de área necesaria establecidas en la NOM-062-ZOO-1999⁷⁴.

11.1.1. Administración de la cocaína.

Para calcular la dosis de cocaína a administrar en cada rata, se consideró una dosis promedio de consumo humano (0.714 mg/Kg por vía IV) y los factores de conversión $K_m=37$ para humano y $K_m=6$ para rata basados en el área corporal (body surface area) según lo recomendado por la FDA reportado en *FASEB J.* 2007;22(3):659-661⁷⁵. La dosis administrada de cocaína en cada rata fue de 5 mg/Kg por vía intravenosa, y el cálculo se muestra a continuación:

$$\text{Dosis de consumo en Humano} = \frac{50\text{mg de cocaína}}{70\text{Kg peso corporal}} = 0.714\text{mg/kg}$$

$$\text{Dosis experimental en animales} = \text{Dosis de consumo Humano} * \frac{\text{Km humanos}}{\text{Km rato}}$$

$$\text{Dosis experimental en animales} = 0.714\text{mg/kg} * \frac{37}{6} = 4.4\text{mg/kg} \rightarrow 5\text{mg/kg}$$

Se preparó una disolución de clorhidrato de cocaína (COC*HCl; 113% de pureza; donada por el INCIFO) de 5mg/mL, pesando 0.0442g en balanza analítica que se traspasaron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0mL y se llevó al aforo con SSI estéril. De esta disolución se les administro por vía intravenosa a las ratas (con ayuda del catéter intravenoso y la jeringa de 1mL), cierto volumen de acuerdo a su peso para que la dosis fuera de 5mg/kg (considerando un volumen residual de 0.04mL), tal como lo muestra el siguiente ejemplo:

Rata de 0.2588kg* $\left(\frac{5\text{mg dosis}}{\text{kg}}\right) * \left(\frac{\text{mL}}{5\text{mg COC*HCl}}\right) + 0.04\text{mL}_{\text{residual}} = 0.30\text{mL}$ de la disolución de COC*HCL se le administra a la rata por vía intravenosa.

En cada caso, se esperó a que la rata se estabilizara para devolverla a su caja de policarbonato, ya que al inyectarles la sustancia las ratas presentaron convulsiones.

11.1.2. Recolección de muestras.

Muestras sanguíneas: Para cada tiempo de muestreo se escogieron 2 animales y se les indujo anestesia con isoflurano por vía respiratoria. Se utilizó un lubricante ocular (Duralagrima GRIN MED-GR02®) después de coleccionar las muestras sanguíneas por punción en el seno venoso retro-orbital de 800 µL a los siguientes tiempos después de la administración de cocaína: 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 11, 24, 35 y 48h (ver Tabla 12). Estas muestras se recolectaron en tubos vacutainer con oxalato de potasio, y NaF 1.25% (w/v) y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

Muestras de tejido muscular y cerebro: Para cada tiempo de muestreo (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 11, 24, 35, 48 y 72 h) se sacrificó a una rata en una cámara de bióxido de carbono (CO₂), teniendo en cuenta lo establecido por la Norma Oficial Mexicana

NOM-062-ZOO-1999⁷⁴. Para determinar la muerte de los animales se debían presentar estos signos indicativos simultáneamente: ausencia de ventilación pulmonar y latido cardíaco, asociados a la ausencia de reflejos, dilatación pupilar y cianosis de las mucosas por falta de oxigenación. Una vez que se aseguraba la muerte del animal se prosiguió a la recolección de los órganos: cerebro, hígado y tejido muscular (músculo femoral y del peritoneo), como se muestra en la Figura 15. Se conservaron en frascos de plástico con solución salina y NaF al 0.4%, para almacenarse a 4°C hasta su análisis.

En la Tabla 12 se señalan las muestras obtenidas (sangre y tejidos) para cada tiempo de muestreo.

Tabla 12. Muestras requeridas para cada tiempo de muestreo en la experimentación con animales

Tiempo de muestreo (h)	Muestras a obtener	
	Sangre	Tejidos
0.08	X	
0.25	X	X
0.5	X	X
1	X	X
2	X	X
4	X	X
8	X	X
12	X	X
24	X	X
36	X	X
48	X	X
72		X

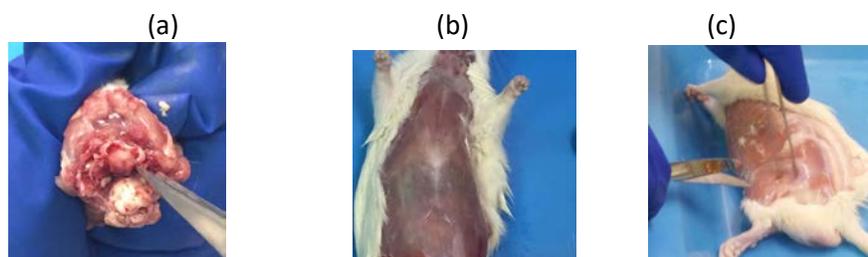


Figura 16. Se exponen fotos de los órganos que fueron extraídos de las ratas, después de ser sacrificadas en cámara de CO₂: cerebro (a), y músculo del peritoneo (b) y femoral (c).

11.2. Determinaciones analíticas

Materiales e instrumentos.

- Nave para pesar.
- Espátulas.
- 2 Matraces volumétricos de 100mL.
- 1 matraz de 250mL.
- 1 matraz volumétrico de 10mL
- 1 Frasco con tapa.
- Pipetas graduadas de 10, 5 y 1mL; y Propipeta.
- Pipetas pasteur de plástico, de 3mL.
- Micropipetas: de 10 a 100 μ L, y de 100 a 1000 μ L; con sus respectivas puntas.
- Tijeras y pinzas de punta roma.
- Mortero de ágata con pistilo.
- Tubos Falcon de 15mL.
- Gradillas para tubos.
- Jeringas de 3mL.
- Filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) para jeringas, tamaño de poro 0.20 μ m, phenomenex®.
- Columnas de fase reversa C-18, para extracción de fase sólida Bond Elut® VARIAN, INC.
- Viales para cromatógrafo de 2mL Agilent Technologies®.
- Guantes de nitrilo, lentes de seguridad y bata de laboratorio.

Reactivos.

- Agua Milli-Q.
- Solución salina estéril al 0.9% de cloruro de sodio, PiSA® (SSI)
- Metanol grado HPLC, J. T. Baker®.
- Ácido acético concentrado
- Diclorometano, para cromatografía de líquidos y gases, OmniSolv®.
- Alcohol iso-propílico, para cromatografía de líquidos y gases, OmniSolv®.
- Hidróxido de amonio. Baker Analyzed®.
- Cloroformo, grado analítico. Productos químicos Monterrey, SA de CV.
- Etanol RA. Grupo internacional ICR S.A. de C.V.
- Fosfato de sodio dibásico, reactivo analítico A.C.S, Reactivos y Productos Químicos Finos, S.A. de C.V.
- Fosfato de sodio monobásico, reactivo analítico, Productos químicos Monterrey, SA de CV.
- Carbonato de sodio anhidro granular, reactivo analítico, Mallinckrodt®.
- Bicarbonato de sodio, reactivo analítico, Laboratorios LAITZ, S.A.

- Estándar secundario de clorhidrato de cocaína 113% de pureza; donada por el INCIFO

Equipos.

- Balanza electro analítica. Adventurer™. OHAUS. (0.0001g; 210g).
- Potenciómetro.
- Agitador de tubos (vortex), VX100, Labnet International, Inc.
- Baño ultrasónico, Branson serie CPXH BRANSONIC™.
- Centrífuga, No. 6496, Hz 50-60, SOLBAT®.
- Colector de vacío para extracción en fase sólida, con bomba de vacío y manómetro.
- Parrilla de calentamiento con adaptador para tubos, con termómetro. Colocada debajo de una fuente de Nitrógeno para evaporar.
- Horno de Cultivo.

11.2.1. Preparación de disoluciones

Soluciones amortiguadoras.

Estas disoluciones se guardaban en refrigeración con el fin de evitar problemas de contaminación por microorganismos.

Solución amortiguadora de fosfatos, a pH 6.0. Preparar una solución de fosfatos 0.1M, considerando un $pK_a=7.2$. Pesar 1.2985g de NaH_2PO_4 y 0.0838g Na_2HPO_4 y traspasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver las sales primero, con un poco de agua destilada, verificar el pH con potenciómetro y en caso necesario ajustar el pH con gotas de Hidróxido de amonio al 10%. Después llevar al aforo con el mismo disolvente.

Solución amortiguadora de carbonatos, a pH de 9.0. Preparar 100 mL de la disolución, en matraz volumétrico, considerando un $pK_a=10.33$. Pesar 0.477g de Na_2CO_3 y 0.8023g de $NaHCO_3$, para obtener una concentración 0.1M y un pH de 9.0. Las sales se disuelven con agua destilada y antes de llegar al aforo se verifica el pH con potenciómetro. En caso necesario, ajustar el pH con gotas de hidróxido de amonio al 10% y al final llevar a la marca de aforo del matraz con el agua destilada.

Disoluciones necesarias para las extracciones.

Ácido acético 1M. Preparar 250.0 mL de ácido acético 1M para todas las extracciones de sangre.

Mezcla de elución para extracción en fase sólida. De esta mezcla se preparan diariamente 10 mL para las extracciones de sangre. Primero hacer la mezcla de diclorometano e isopropanol (80:20), y una vez incorporados los reactivos retirar 0.2mL con la pipeta graduada de 1mL, y con otra pipeta se adicionan 0.2mL de hidróxido de amonio concentrado, agitar hasta ser homogénea la mezcla.

Mezcla para extracción líquido-líquido. En un frasco con tapa preparar la mezcla de cloroformo-etanol (80:20), tomando los volúmenes con pipetas graduadas. Esta mezcla se mantiene tapada y se prepara diariamente para evitar pérdidas de cloroformo por su alta volatilidad.

Curva de calibración.

Solución estándar stock de cocaína de 1mg/mL. Pesar 0.0089g de clorhidrato de cocaína (COC*HCl; 113% de pureza; donada por el INCIFO) en balanza analítica y traspasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0mL. Llevar al aforo con metanol grado HPLC.

Solución estándar de cocaína de 500µg/mL. A partir de la disolución stock de COC*HCl, preparar 10.0mL de la solución de COC*HCL a 500µg/mL. Utilizar material volumétrico.

A continuación, se muestra una tabla de las alícuotas tomadas de la solución estándar de cocaína de 500µg/mL y los volúmenes finales para los puntos de la curva

Alícuota (µL)	Volumen final (mL)	Concentración (µg/mL)
640	1	320
320	1	160
80	1	40
40	1	20
20	1	10
10	1	5

11.2.2. Preparación de las muestras biológicas para el análisis por CG

SANGRE. La determinación se realizó modificando el procedimiento descrito por Abusada y colaboradores⁷⁶. Se toman 400µL de la muestra de sangre, se colocan en un tubo Falcon de 15mL. Posteriormente se les adicionó 1mL de metanol grado HPLC y se mezclan durante 1 minuto en vortex, posteriormente se centrifuga a 4500rpm por 10min. El sobrenadante se separa y el botón se re-suspende, se mezcla con 1mL de metanol para darle el mismo tratamiento. El sobrenadante se juntó con el anterior y se mezcla con 4mL de 0.1M solución amortiguadora de fosfatos (pH 6), utilizando vortex, para posteriormente pasar por la columna de extracción de fase sólida (EFS).

Extracción en fase sólida (EFS) de los analitos

Se utilizaron columnas de fase reversa C-18, Bond Elut® VARIAN, INC. Y se procedió de acuerdo con el Manual de métodos de certificación de Bond Elut®, para la extracción de cocaína y benzoilecgonina en sangre (M2713) para analizar en cromatografía de gases.

Acondicionamiento de las columnas EFS: Las columnas se acondicionan subsecuentemente con 2mL metanol y 2mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6, usando vacío (≤ 3 pulgadas de mercurio).

Paso de las muestras: Se hace pasar lentamente el volumen total obtenido de la muestra biológica a través de la columna, ajustando el vacío de tal manera que el flujo fuese de aproximadamente 1mL/min.

Lavado de las columnas EFS: Bajo vacío, se pasan 6mL de agua Milli Q en la columna, seguido de 3mL de ácido acético 1M, el cartucho se deja secar durante 5 minutos sin vacío. Se adicionan 6mL de metanol.

Elución de los analitos: Se adicionan 2mL de una mezcla recién preparada de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amonio (80:20:2) bajo el efecto de la gravedad. Los extractos se colectan en viales de 2mL, evaporando a sequedad bajo flujo de nitrógeno a 55°C para continuar con la derivatización.

TEJIDOS: CEREBRO Y MÚSCULO. Con base al experimento de Shimimura y colaboradores⁷⁸, se pesó 1g de tejido, y se trituró en un mortero de ágata después de cortarlo con tijeras quirúrgicas y adicionar 1.5mL solución amortiguadora de carbonato de sodio de 0.1M (pH 9). La mezcla es colectada en un tubo Falcon de 15mL, enjuagando el mortero y pistilo con con 1.5mL de la solución amortiguadora de carbonato (pH 9). En cada caso, la mezcla se homogeniza en vortex durante 30 segundos, posteriormente la muestra se coloca en un baño de mesa ultrasónico Branson serie CPXH BRANSONIC™ durante 5 minutos, posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 4500rpm para después, en el mismo tubo, continuar con la extracción líquido-líquido.

Extracción líquido-líquido (ELL) de los analitos

A los tubos Falcon con las muestras biológicas (homogenizados de tejido) se les añadió 2mL de la mezcla de cloroformo-etanol (80:20) y se agita cada tubo y en seguida se centrifuga a 4500rpm por 10 minutos.

Al finalizar la centrifugación se separa la fase orgánica con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y se deposita en una jeringa de 3mL de capacidad, sin émbolo, para pasarla por un filtro de PTFE, con tamaño de poro de 0.20µm, antes de ser colectado en un vial de 2mL. Los extractos se evaporaron a sequedad bajo flujo de nitrógeno a una temperatura de 55°C para después ser derivatizados.

Derivatización.

Para la derivatización, se añadieron 50 µl de BSTFA que contiene 1% de TMCS, al vial de 2mL, se tapa el vial y se mezcla, posteriormente se incuba a 70°C durante 20 minutos. Antes de hacer el análisis en el cromatógrafo, se deja enfriar a temperatura ambiente.

11.2.3. Análisis cromatográfico

Se preparó una curva de calibración (de 5 a 320 µg/mL) para corroborar la linealidad del sistema, además de que cada día de análisis se registraba la adecuabilidad del sistema. Para los análisis cromatográficos se consideró como base el estudio realizado por Miguel Pérez en su trabajo de tesis titulado “Confirmación de metabolitos de cocaína en sangre de muestras forenses empleando Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas”⁷⁹. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis son las siguientes:

Cromatógrafo de Gases Agilent Technologies® 6890N Network GC System	
Volumen de inyección	2µL de la muestra con el automuestreador.
Inyector	Split/splitless. Temperatura de 220°C, presión de 0.95PSI y un flujo total de 17.8 mL/min.
Purga	A un flujo de 10mL/min
Trampa	Teledyne Tekmar®
Gas acarreador	Hidrógeno, a flujo de 1mL/min, presión inicial de 0.99 PSI, y velocidad media de 54 cm/s.
Columna capilar	HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (30.0m x 250µm x 0.25 µm)
Programa de temperatura	Temperatura inicial 70°C, con un incremento de 25°C/min hasta 230°C por 3 minutos, 10°C/min hasta 290°C. <i>Post run</i> de 2 minutos a 300°C.
Detector de Masas	(Cuadrupolo) Agilent Technologies® 5973Network, en modo barrido de 50 a 500 uma.
Software	De data análisis e instrumento para GC de Agilent, para procesamiento y análisis de las muestras.

11.2.4. Cuantificación de las muestras

Para la determinación analítica de las concentraciones de las muestras, se prepararon curvas de calibración que se muestra en la Figura 17, obteniéndose la ecuación 13, donde la pendiente es el factor de respuesta (Fr).

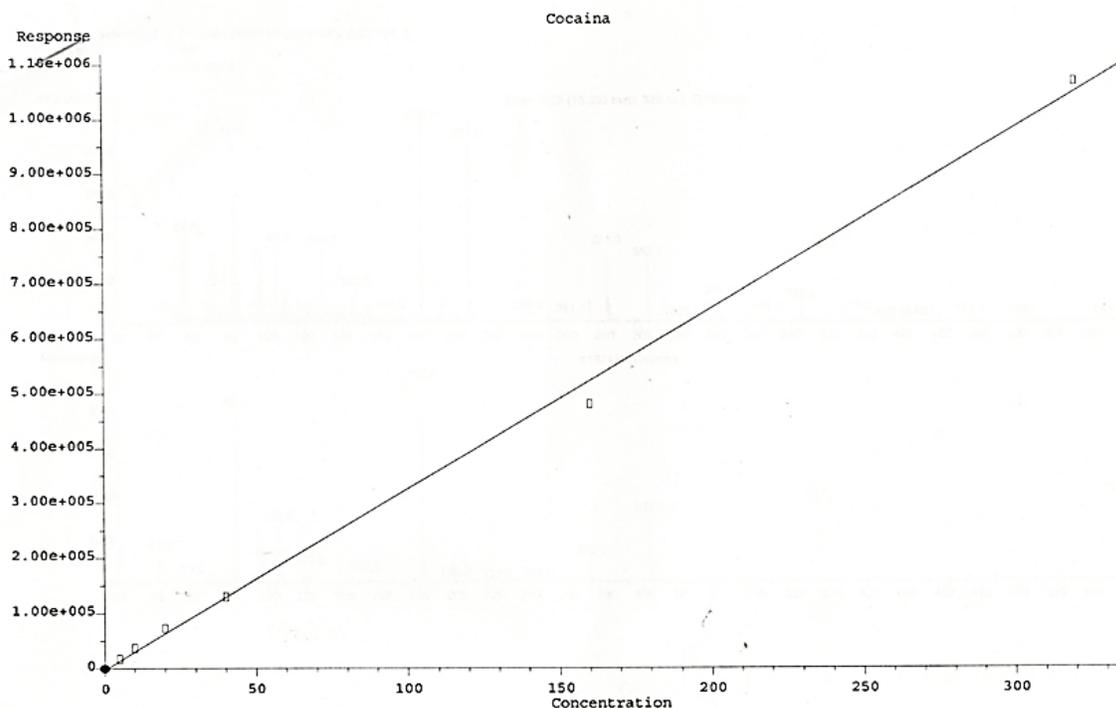


Figura 17. Curva de calibración realizada para obtener el factor de respuesta que se utiliza en el cálculo de las concentraciones de cocaína en diferentes matrices biológicas. Las concentraciones se indican en microgramos por mililitro (µg/mL), en un rango de 5 a 320 µg/mL.

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 3280.73X - 2680 \quad (13)$$

Con los datos obtenidos de las áreas de cada una de las muestras y el factor de respuesta (3280.73), se calcula el valor de la concentración. A continuación, se muestra un ejemplo para el cálculo de una muestra de cerebro.

Muestra: Cerebro; tiempo de muestreo: 0.25h

Respuesta en el equipo (área bajo la curva): 466391

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Respuesta}}{\text{Factor de respuesta}} * \frac{\text{volumen de reconstitución}}{\text{cantidad de muestra (g)}} = \frac{466391}{3280.73} * \frac{0.05\text{mL}}{0.9886\text{g}} = 7.19\mu\text{g/g}$$

11.3. Resultados Experimentales

En la Tabla 13 se recopilaron las concentraciones calculadas de músculo, cerebro y en la sangre, y se ilustran de manera gráfica en la Figura 18. Se observa que las concentraciones en cerebro son mayores que en músculo. Para el caso de la sangre venosa, la Figura 18(b) muestra que la distribución de la cocaína no es inmediata. Y en los tres casos se observan curvas con comportamiento de decrecimiento exponencial.

Los resultados que se rescataron se muestran a continuación:

Tabla 13. Concentraciones encontradas en el presente estudio para músculo, cerebro, y sangre venosa; los valores se presentan en microgramos por gramo de tejido

Tiempo (h)	0.08	0.25	0.5	1	2	4	8	12	24	48
Músculo	--	2.01	--	1.93	--	1.59	1.43	1.10	0.30	0.12
Cerebro	--	7.19	--	--	--	4.44	3.57	2.07	--	--
Sangre	11.46	21.24	3.35	4.53	1.73	2.49	--	--	--	--

Nota: Las concentraciones mostradas corresponden a las encontradas en una rata.

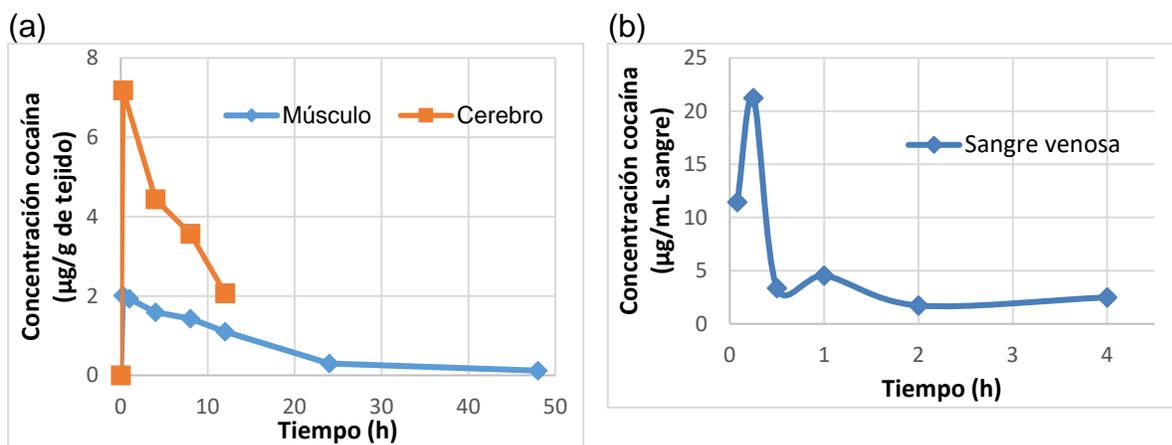
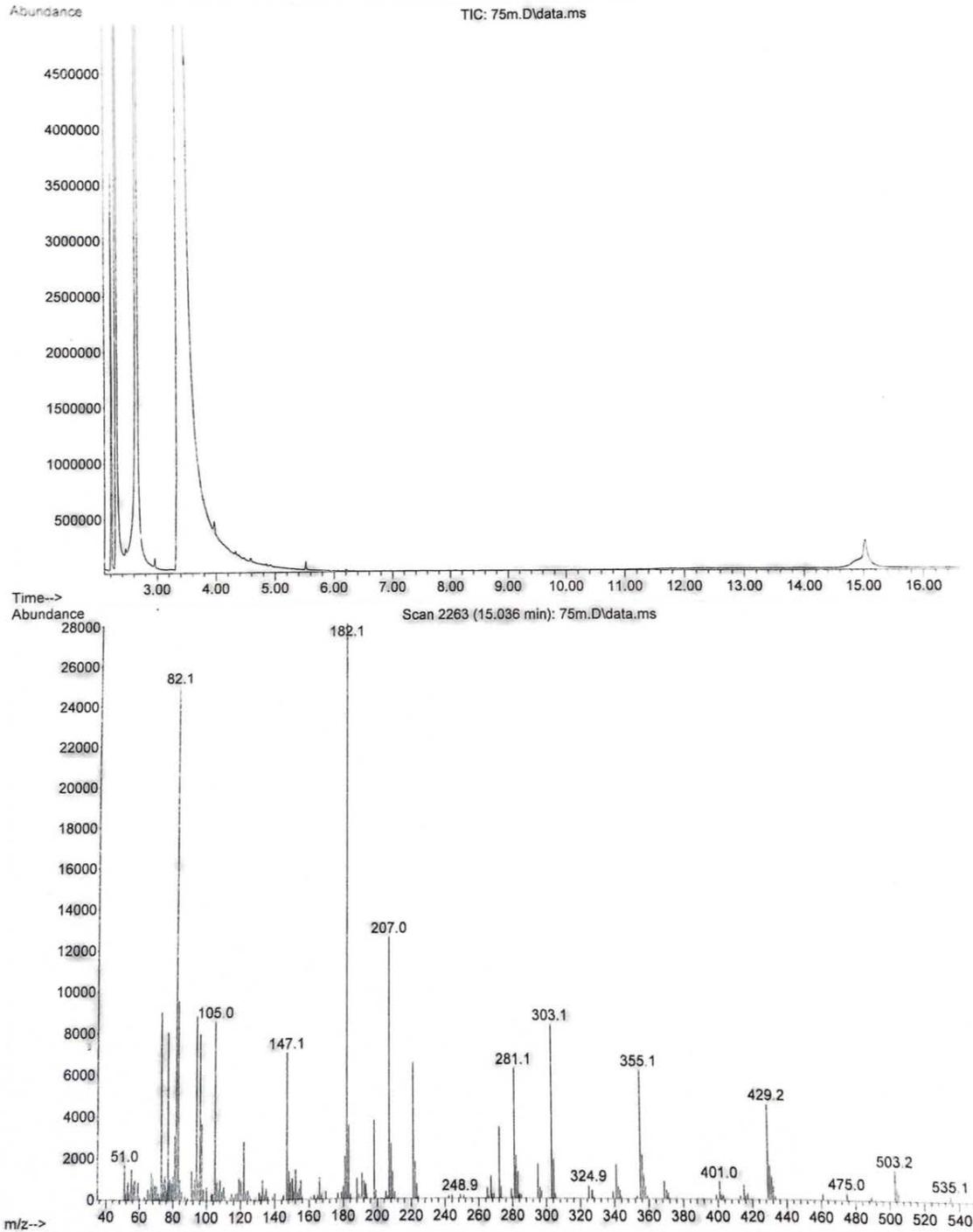


Figura 18. Curso temporal de la cocaína en músculo y cerebro (a); y en sangre venosa (b).

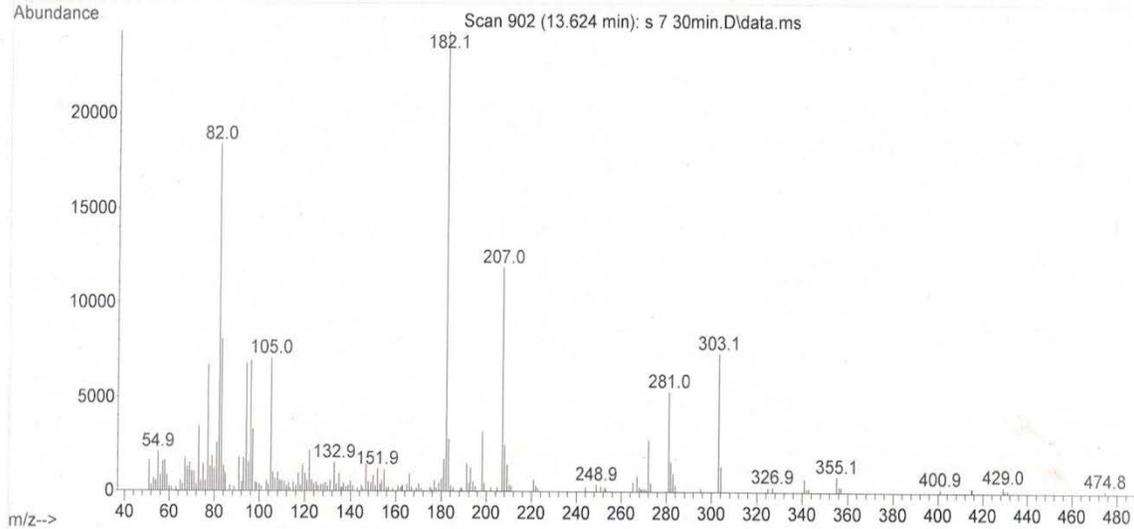
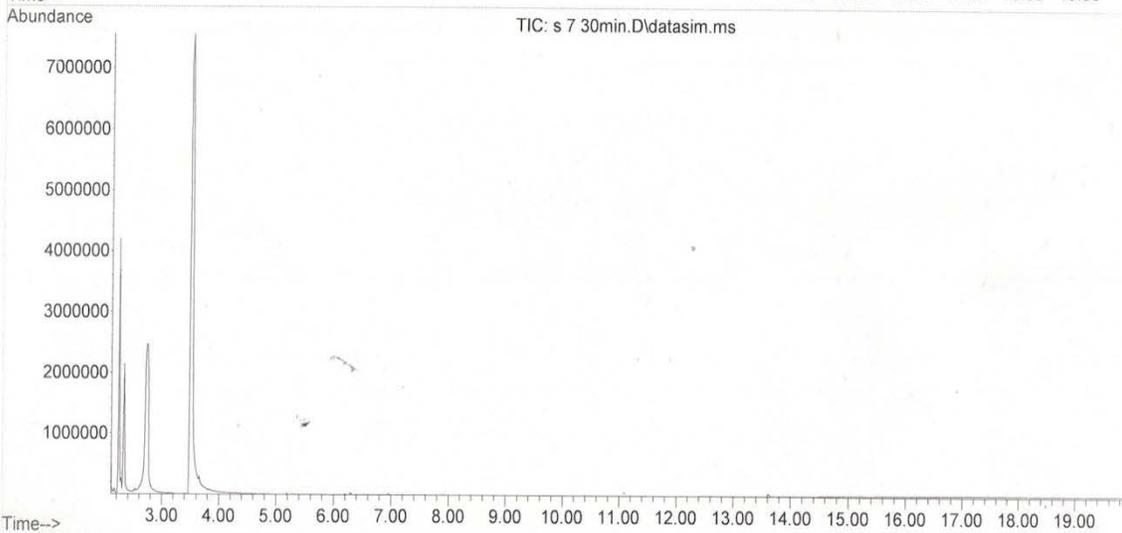
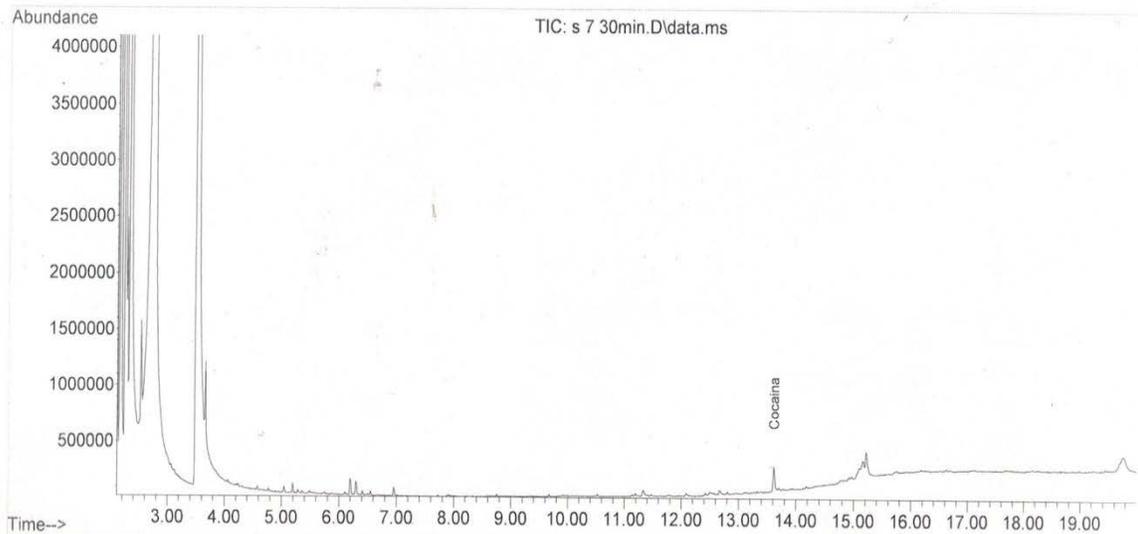
12. ANEXO-B: Ejemplos de los cromatogramas obtenidos en las determinaciones analíticas

Solución de cocaína, a una concentración de 75 µg/mL.



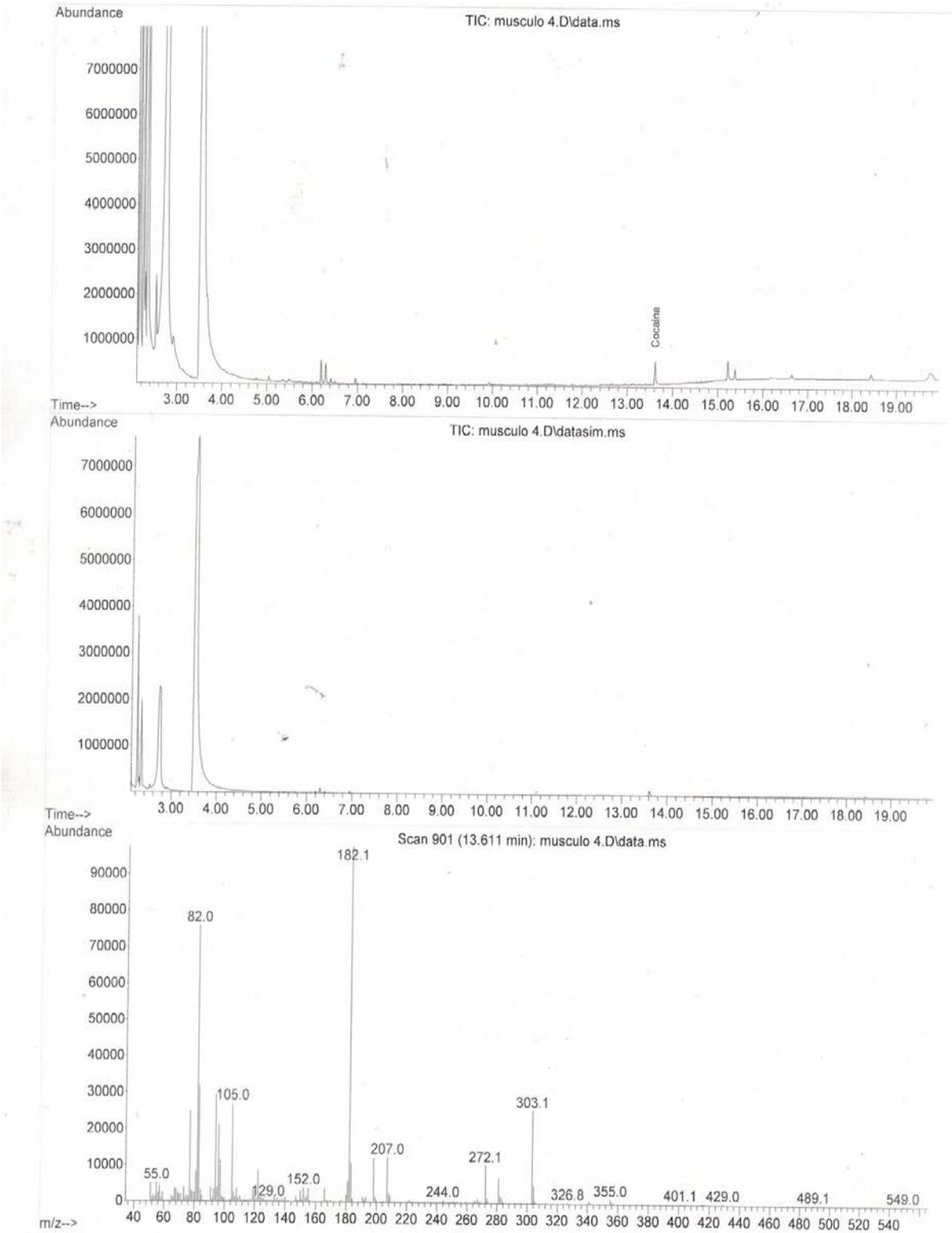
Matriz: Sangre

Tiempo de muestreo: 30min



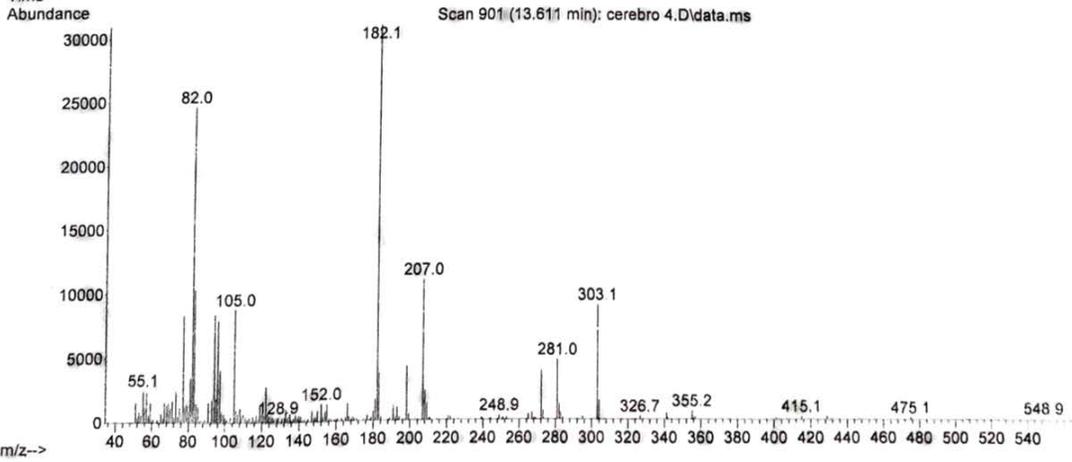
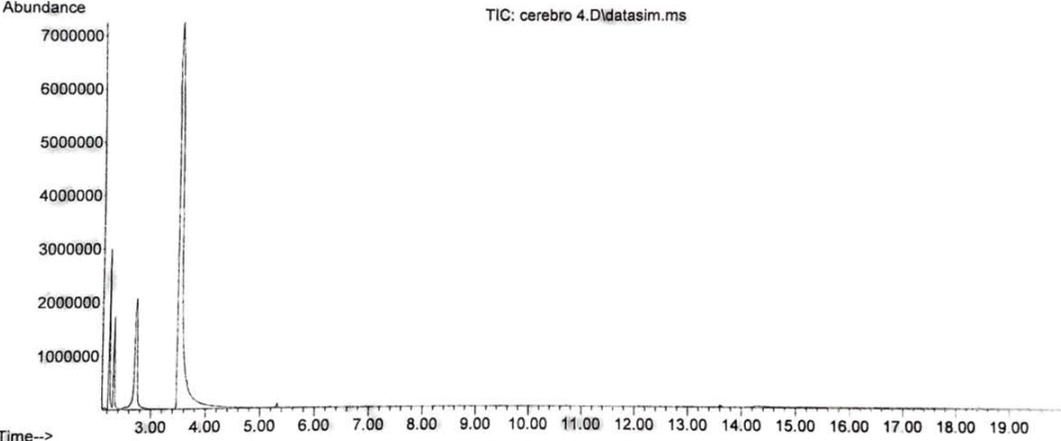
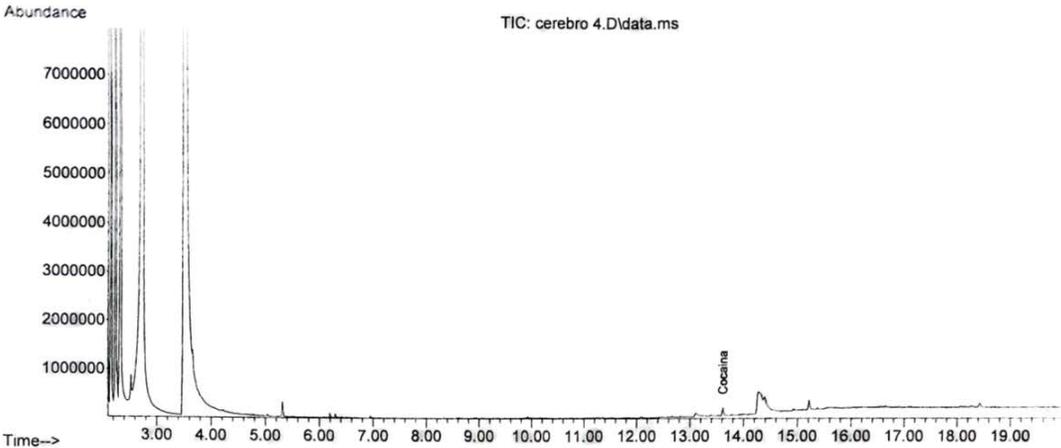
Matriz: Músculo

Tiempo de muestreo: 4 horas



Matriz: Cerebro

Tiempo de muestreo: 4 horas.



13. ANEXO-C: Dictamen de aprobación CICUAL



FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/158/16
ASUNTO: Aprobación de Protocolo

DRA. MA. ELENA BRAVO GÓMEZ
LAB. DE TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA FORENSE
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.
Presente

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

“Desarrollo de modelos matemáticos que permitan la estimación del momento del último consumo de sustancias de abuso a partir de estudios toxicocinéticos”

No. de animales empleados en el estudio: 34 ratas machos HSDHan:Wistar

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

Con una vigencia de: 1 año posterior a la fecha de aprobación.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. de México a 30 de junio del 2016

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente

C.c.p. Dr. Jorge Vázquez, Director de la FQ.
C.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
C.c.p. Comisión de Seguridad e Higiene, FQ.
C.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaría Administrativa, FQ.
C.c.p. Expediente CICUAL.