



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS DE QUIPAZINA Y
N-2-HIDROXIETIL QUIPAZINA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB MARIO ALBERTO DÍAZ ORTIZ

Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, 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	Dra. Helgi Helen Jung Cook
Vocal	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero
Vocal	Dra. María Eva González Trujano
Vocal	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha
Secretario	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
Asesor	Dr. Andrés Navarrete Castro
Sustentante	QFB Mario Alberto Díaz Ortiz

Lugar donde se desarrolló el trabajo de tesis:

Laboratorio 126, Conjunto E, Departamento de Farmacia
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo el presente trabajo y por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con número de becario 597802.

Al financiamiento para la compra de animales y reactivos de los proyectos PAIP5000-9143 e IN213818.

A la Facultad de Química, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la UNAM, por la formación profesional.

A mi tutor, Dr. Andrés Navarrete Castro, por sus valiosos consejos y constante apoyo para la realización este proyecto, así como las enriquecedoras charlas que tuvimos a lo largo de estos dos años de trabajo.

Al jurado asignado, Dra. Helgi Helen Jung Cook, Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, Dra. María Eva González Trujano, Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha y Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, por las valiosas aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz por el apoyo en la realización de los espectros de masas.

DEDICATORIA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Diabetes.....	11
2.2 Tipos de diabetes.....	11
2.2.1 Diabetes tipo 1.....	11
2.2.2 Diabetes tipo 2.....	11
2.2.3 Diabetes gestacional.....	12
2.3 Tratamientos para la diabetes tipo 2.....	12
2.3.1 Tratamientos farmacológicos para la diabetes tipo 2.....	12
2.4 Serotonina.....	14
2.4.1 Receptores de serotonina.....	14
2.4.2 Acción de la serotonina en células β -pancreáticas.....	14
2.4.3 Mecanismo de acción de la serotonina en células β	15
2.5 Quipazina.....	16
2.5.1 Nuevos derivados de QPZ.....	17
2.6 Farmacocinética.....	18
2.6.1 Absorción.....	18
2.6.2 Biotransformación.....	18
2.7 Metabolismo de quinolinas y piperazinas.....	20
2.8 Perfil neurofarmacológico.....	20
2.9 Estudios de relación farmacocinética/farmacodinamia.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos particulares.....	24
6. PARTE EXPERIMENTAL	25
6.1 Desarrollo y validación del método analítico.....	26
6.1.1 Adecuabilidad.....	26
6.1.2 Intervalo lineal.....	26
6.1.3 Intervalo de trabajo.....	27
6.1.4 Límites de detección y cuantificación	28
6.1.5 Recuperación y sesgo.....	29
6.1.6 Repetibilidad.....	29
6.1.7 Reproducibilidad.....	29
6.1.8 Sensibilidad.....	29
6.1.9 Selectividad.....	30
6.1.10 Robustez.....	30
6.2 Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	30
6.3 Ensayo de biotransformación de QPZ y TR3370.....	32
6.3.1 Análisis de muestras de ensayos metabólicos por espectrometría de masas.....	34
6.4 Estudios farmacocinéticos <i>in vivo</i> en ratas Wistar.....	34
6.5 Monitorización de los niveles de glucosa.....	36
6.6 Determinación del perfil neurofarmacológico.....	36
6.6.1 Evaluación de la coordinación motora.....	37
6.6.2 Evaluación de la actividad exploratoria.....	37

6.6.3 Evaluación de la actividad motora.....	37
6.6.4 Prueba del tablero de hoyos.....	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Procesamiento de las muestras.....	39
7.2 Condiciones cromatográficas de análisis.....	39
7.3 Validación del método analítico.....	40
7.4 Ensayos de permeabilidad intestinal <i>in vitro</i>	45
7.5 Ensayos de bitransformación de QPZ y TR3370 en fracción S9 de hígado de rata.....	46
7.5.1 Ensayos cuantitativos de biotransformación.....	46
7.5.2 Ensayos cualitativos de biotransformación.....	47
7.6 Estudios farmacocinéticos <i>in vivo</i> en ratas Wistar.....	52
7.7 Monitorización de los niveles de glucosa.....	54
7.8 Estudios de relación farmacocinética/farmacodinamia.....	56
7.9 Perfil neurofarmacológico.....	57
8. DISCUSIÓN.....	60
8.1 Procesamiento de las muestras.....	61
8.2 Condiciones cromatográficas de análisis.....	61
8.3 Validación del método analítico.....	62
8.4 Ensayos de permeabilidad intestinal <i>in vitro</i>	64
8.5 Ensayos de bitransformación de QPZ y TR3370 en fracción S9 de hígado de rata.....	67
8.5.1 Ensayos cuantitativos de biotransformación.....	67
8.5.2 Ensayos cualitativos de biotransformación.....	69
8.6 Estudios farmacocinéticos <i>in vivo</i> en ratas Wistar.....	71
8.7 Monitorización de los niveles de glucosa.....	74
8.8 Estudios de relación farmacocinética/farmacodinamia.....	78
8.9 Perfil neurofarmacológico.....	80
9. CONCLUSIONES.....	84
10. REFERENCIAS.....	86
ANEXO I.....	90
ANEXO II.....	93
ANEXO III.....	97
ANEXO IV.....	100
ANEXO V.....	104
ANEXO VI.....	108

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Tasa de introducción de nuevos fármacos hipoglucemiantes.....	13
Figura 2. Mecanismo de acción de serotonina en células- β pancreáticas.....	16
Figura 3. Estructura de la QPZ y estructura de TR3370.....	17
Figura 4. Partes de la cámara para el estudio de permeabilidad.....	31
Figura 5. Cámara para estudio de permeabilidad ensamblada.....	31
Figura 6. Método general para el procesamiento de muestras de ensayos metabólicos y de perfiles farmacocinéticos.....	39
Figura 7. Cromatogramas de QPZ en las diversas muestras de análisis.....	42
Figura 8. Cromatogramas de TR3370 en las diversas muestras de análisis.....	44
Figura 9. Gráficas de concentración acumulada de QPZ y TR3370 en el ensayo de permeabilidad.....	45
Figura 10. Resultados obtenidos de los ensayos metabólicos cuantitativos de Quipazina y TR3370.....	48
Figura 11. Proceso de identificación de metabolitos en muestras de Fracción S9 por EM	49
Figura 12. Ruta metabólica de QPZ en fracción S9 de hígado de rata.....	50
Figura 13. Ruta metabólica de TR3370 en fracción S9 de hígado de rata.....	51
Figura 14. Perfiles farmacocinéticos de QPZ y TR3370 en plasma de rata.....	53
Figura 15. Curso temporales de los niveles de glicemia en los estudios farmacocinéticos.....	55
Figura 16. Área bajo la curva de cursos temporales de niveles de glicemia en ratas.....	55
Figura 17. Asas de histéresis entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ y TR3370.....	56
Figura 18. Resultados del perfil neurofarmacológico de QPZ y de TR3370.....	58
Figura 19. Resultados de la evaluación de QPZ y de TR3370 sobre la actividad motora.....	59
Figura 20. Procesos de transporte de fármacos a través de membranas biológicas	67
Figura 21. Reacciones bioquímicas implicadas en la biotransformación de fármacos en la fracción S9 de hígado de rata.....	68
Figura 22. Procesos fisiológicos en la absorción intestinal de xenobióticos.....	73
Figura 23. Efecto de la serotonina sobre algunos órganos y su repercusión en los niveles de glicemia.....	77
Figura 24. Metabolito desalquilado de TR3370.....	78
Tabla 1. Ejemplos fármacos hipoglucemiantes empleados actualmente en terapéutica.....	13
Tabla 2. Preparación de las soluciones de QPZ y TR3370 para la curva de calibración de los ensayos de permeabilidad.....	27
Tabla 3. Preparación de las soluciones de QPZ y TR3370 para la curva de calibración de los ensayos de bitransformación y farmacocinética	27
Tabla 4. Resultados de la validación del método para la cuantificación de QPZ en muestras de ensayo de permeabilidad.....	41
Tabla 5. Resultados de la validación del método para la cuantificación de QPZ en muestras de plasma sanguíneo y de fracción hepática de rata.....	41
Tabla 6. Resultados de la validación del método para la cuantificación de TR3370 en muestras de ensayo de permeabilidad.....	43
Tabla 7. Resultados de la validación del método para la cuantificación de TR3370 en muestras de plasma sanguíneo y de fracción hepática de rata.....	43
Tabla 8. Área de respuesta de benclamina en ensayos de viabilidad de fracción S9.....	46
Tabla 9. Valores plasmáticos promedio de estudios farmacocinéticos.....	52
Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos promedio de QPZ y TR3370.....	54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS (En orden de aparición)

OMS	Organización Mundial de la Salud
ADME	Absorción, distribución, metabolismo, excreción
5-HT	5-Hidroxitriptamina
mCPP	<i>meta</i> -Clorofenilpiperazina
ATP	Adenosintrifosfato
SERT	Transportador para recaptura de serotonina
QPZ	Quipazina
CYP450	Citocromo P450
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
SNC	Sistema Nervioso Central
i.v.	Intravascular
p.o.	Oral
µg/mL	Microgramo sobre mililitro
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
sb₀	Desviación estándar asociado a la ordenada al origen
KHS	Solución Krebs-Henseleit
CV	Coeficiente de variación
rpm	Revoluciones por minuto
EM	Espectrometría de masas
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionización química a presión atmosférica)
TIC	Total Ion Current (Corriente iónica total)
CCAYAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura
TP	Transporte pasivo
TMA	Transporte mediado por acarreadores
MADC	Modelo abierto de dos compartimentos
MAUC	Modelo abierto de un compartimento
ABC	Área bajo la curva
TMR	Tiempo medio de residencia

1. Introducción

De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes fue la segunda causa de muerte en la población mexicana durante el 2016, con un total de 87,000 decesos, correspondientes al 14% del total de defunciones en el país, sólo después de las muertes generadas por enfermedades cardiovasculares (24%).¹ A partir de lo anterior es que surge la necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la diabetes y las complicaciones que conlleva esta enfermedad, como la nefropatía diabética, la retinopatía y el pie diabético, entre otros. Desde que se comenzó a estudiar la etiología de la diabetes, ha habido un gran número de esfuerzos por encontrar tratamientos cada vez más eficaces para la misma.

Al ser la diabetes una enfermedad multifactorial, es posible abordar su tratamiento a partir de agentes farmacoterapéuticos que actúen sobre diferentes blancos moleculares y que conlleven diferentes acciones biológicas, como una mayor liberación de insulina, incremento en la expresión de los receptores de glucosa, una disminución en la absorción intestinal de carbohidratos, entre otros. En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de fármacos que actúan sobre distintos blancos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes.²

Numerosos estudios han revelado que un importante número de candidatos a fármacos no tienen éxito en la larga etapa de desarrollo clínico debido a problemas de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad (ADMET). Para que una molécula pueda llegar a ser un fármaco aplicado en la terapéutica, debe cumplir con ciertas características además de su efectividad, como lo son propiedades fisicoquímicas, y buenos perfiles de seguridad, además de un adecuado perfil farmacocinético.³

En el presente trabajo se presentan las evaluaciones farmacológicas de la quipazina (QPZ), una herramienta farmacológica con actividad serotoninérgica y del nuevo derivado TR3370, los cuales presentan actividad hipoglucemiante¹⁹. Los estudios realizados se pueden dividir en dos grupos: las evaluaciones farmacocinéticas en las que se determinaron de coeficientes de permeabilidad en el intestino, los procesos de biotransformación *in vitro* y el estudio de los perfiles

farmacocinéticos de ambos compuestos; mientras que la monitorización de los niveles de glucosa en sangre, y el perfil neurofarmacológico de ambos compuestos comprenden las evaluaciones farmacodinámicas.

2. Antecedentes

2.1 Diabetes

La diabetes es una condición crónica que ocurre cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina o no puede utilizarla y las personas con esta enfermedad presentan niveles altos de glucosa en sangre. La insulina es una hormona producida en el páncreas, se requiere para transportar la glucosa desde la sangre al interior de las células del cuerpo, en donde es utilizada como energía. La ausencia o ineficacia de la insulina en las personas con diabetes genera que la glucosa continúe circulando en la sangre y no sea absorbida. Con el tiempo, los altos niveles de glucosa en sangre (conocida como hiperglucemia) causan daño en muchos tejidos del cuerpo, dando lugar al desarrollo de complicaciones para la salud que pueden ser incapacitantes y pueden poner en peligro la vida.⁴

2.2 Tipos de diabetes

2.2.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune en la que el sistema de defensa destruye a las células- β productoras de insulina en el páncreas. Como resultado, el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. Esta enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, aunque es más frecuente en niños y jóvenes adultos. Las personas con esta forma de diabetes necesitan de la administración de insulina para controlar los niveles de glucosa. Sin la insulina, una persona con diabetes tipo 1 moriría.⁴

2.2.2 Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es el tipo más común de diabetes. Esta enfermedad es más frecuente en adultos, aunque su incidencia es cada vez mayor en niños y adolescentes. En la diabetes tipo 2, el cuerpo es capaz de producir insulina pero se vuelve resistente a la misma, y con el tiempo los niveles de insulina pueden llegar a ser insuficientes. Aunque las causas exactas del desarrollo de esta enfermedad no se conocen todavía, existen varios factores de riesgo importantes como el sobrepeso, la inactividad física y la nutrición inadecuada.⁴

2.2.3 Diabetes gestacional

La diabetes mellitus gestacional es una forma de diabetes inducida por el embarazo que suele ocurrir a partir de la semana 24 de gestación. Este tipo de diabetes surge porque la acción de la insulina se ve disminuida (resistencia a la insulina) debido a la producción de hormonas en la placenta. Entre otros factores de riesgo se incluyen la edad avanzada, la obesidad, el aumento excesivo de peso en el embarazo, antecedentes familiares, entre otros. La diabetes mellitus gestacional suele presentarse como un trastorno transitorio durante el embarazo y normalmente desaparece al finalizar el mismo. Ya que es raro que aparezcan síntomas característicos de hiperglucemia durante la gestación y podría resultar difícil distinguir entre los síntomas habituales del embarazo, se recomienda realizar una prueba oral de tolerancia a la glucosa a fin de detectar la presencia de esta enfermedad entre las semanas 24 y 28.⁴

2.3 Tratamientos para la diabetes tipo 2

En contraste con las personas con diabetes tipo 1, las personas con diabetes tipo 2 en estadios iniciales no requieren tratamiento diario de insulina para disminuir los niveles de glucosa. El pilar en el tratamiento de este tipo de diabetes es la adopción de una dieta sana, el aumento de la actividad física y mantener un peso corporal normal. Diferentes medicamentos orales están disponibles para ayudar en el control de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, si los niveles de glucosa en sangre continúan aumentando, puede que sea necesario prescribir insulina a personas con diabetes tipo 2.⁴

2.3.1 Tratamientos farmacológicos para la diabetes tipo 2

El aumento en la prevalencia de la diabetes tipo 2 ha favorecido el desarrollo de nuevas estrategias para el control seguro la hiperglucemia (Figura 1). El objetivo de estas terapias es reducir y mantener las concentraciones de glucosa lo más cercano a lo normal por todo el tiempo posible y de este modo prevenir el desarrollo de las complicaciones. A pesar de que algunas terapias no han tenido éxito debido a los efectos adversos o baja eficacia, existen varias alternativas terapéuticas bien aceptadas y que son usadas en todo el mundo. Los mecanismos de acción de estos

fármacos han sido bien establecidos y se resumen en la Tabla 1. A pesar de esto, las respuestas individuales de estos fármacos pueden diferir notablemente entre cada persona, probablemente como resultado de la naturaleza heterogénea de la fisiopatología de la diabetes tipo 2.²

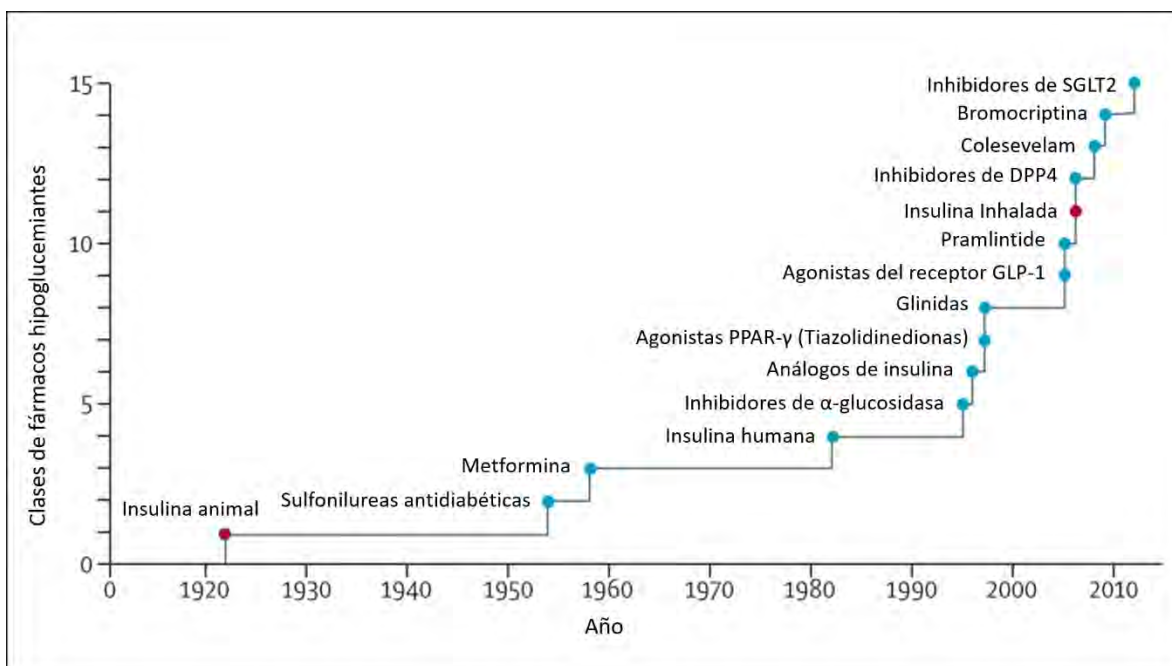


Figura 1. La tasa de introducción de nuevos fármacos hipoglucemiantes se ha acelerado durante los últimos 20 años. Dos tratamientos (insulina animal e insulina inhalada en rojo) no se utilizan más la terapéutica. DPP4= Dipeptidilpeptidasa 4, SGLT2= Co-transportador sodio-glucosa 2, GLP-1= Péptido tipo-glucagon 1 (Adaptado de Kahn S.E, 2014)

Tabla 1. Ejemplos de fármacos hipoglucemiantes empleados actualmente en terapéutica

Mecanismo de acción	Ejemplos
Secretagogos de insulina	Glibenclamida, Gliclazida, Gimpirida
Inhibidores de la gluconeogénesis	Metformina
Agonistas PPAR-γ	Pioglitazona, Rosiglitazona
Inhibidores de α-glucosidasa	Acarbosa, Miglitol, Voglibosa
Inhibidores de DPP4	Alogliptina, Linagliptina, Saxagliptina
Inhibidores de SGLT2	Canaglizofina, Dapaglizofina
Secretagogos de insulina	Nateglinida, Repaglinida
Resinas de unión a ácidos biliares	Colesevelam
Agonistas del receptor de dopamina	Bromocriptina
Análogos de amilina	Pramlintide
Agonistas de receptor GLP-1	Exenatida, Liraglutida, Lixisenatida

2.4 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una bioamina derivada del aminoácido triptófano.⁵ Esta molécula no atraviesa la barrera hematoencefálica y debido a esto, cada reservorio de serotonina tiene distintas funciones.⁶ En el cerebro, la serotonina sirve como un neurotransmisor y regula múltiples aspectos fisiológicos, incluyendo: comportamiento, aprendizaje, apetito y homeostasis de glucosa.⁷ Sin embargo, la serotonina derivada del cerebro solo representa alrededor del 5% del total de serotonina en el cuerpo.⁶ El 95% restante de serotonina es producido en los órganos periféricos y tiene la función de modular distintas reacciones fisiológicas.⁸

2.4.1 Receptores de serotonina

La serotonina ejerce sus efectos en células blanco a través de por lo menos catorce receptores. Trece de estos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y se dividen en tres subfamilias dependiendo de las diferentes proteínas G a las que se encuentran acopladas. Las subfamilias 5-HT₁ y 5-HT₅ se encuentran acopladas a proteínas G_i, la subfamilia 5-HT₂ está acoplada a proteínas G_q y las subfamilias 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ se encuentran acopladas a proteínas G_s. La subfamilia 5-HT₃ es la única que se encuentra asociada a un canal iónico.⁸

2.4.2 Acción de la serotonina en células β -pancreáticas

Experimentos realizados en ratones deficientes de las enzimas responsables de la síntesis de serotonina revelaron que los animales pueden desarrollar diabetes debido a una secreción insuficiente de insulina de las células β . También se demostró que la concentración intracelular de serotonina se correlaciona positivamente con el grado de secreción de insulina.⁹ La intolerancia a la glucosa observada en los experimentos mencionados es comparable con el fenotipo de la diabetes mellitus tipo 2 inducido en ratones knockout al receptor 5-HT_{2C}¹⁰, contradictoriamente, se ha visto que agonistas a este receptor, como el clorhidrato de 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), generan una disminución en la liberación de insulina.¹¹ Sin embargo, se ha detectado una participación importante por parte del

receptor 5-HT_{1A} en la regulación de la liberación de insulina.¹² En humanos, se ha reportado que en casos de sobredosis de sustancias de abuso con actividad serotoninérgica, se generan episodios de hipoglicemia prolongada.¹³

2.4.3 Mecanismo de acción de la serotonina en células β

La acción de la serotonina en las células β del páncreas comienza con el transporte de glucosa al interior de la célula β , y posteriormente la oxidación de la misma y la generación de ATP en las mitocondrias. El aumento en la concentración de ATP genera a su vez el cierre de canales de potasio sensibles a éste y la posterior despolarización de la membrana, llevando a la entrada de calcio a las células por la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. Entre otras funciones, el calcio activa transglutaminasas (TGAsas), que realizan la conjugación de serotonina con una gran variedad de proteínas. En las células β , las proteínas Rab3a y Rab27a, involucradas crucialmente en la exocitosis de la insulina, son activadas por este mecanismo, dando como resultado la secreción de serotonina e insulina. Mientras que la insulina ejerce funciones endocrinas, la serotonina actúa mediante un ciclo autócrino/parácrino. Inicialmente, concentraciones altas de serotonina extracelular ([5-HT]_e) disminuyen la secreción de insulina mediante su acción sobre los receptores 5-HT_{1A}, promoviendo un debilitamiento de esta señal por el aclaramiento de [5-HT]_e mediante el transportador de recaptura de serotonina (SERT) en la membrana. Eventualmente, la concentración intracelular de serotonina ([5-HT]_i) alcanza niveles mucho más altos que [5-HT]_e, y desencadena otro evento de secreción de insulina.⁹ Este mecanismo se ilustra en la Figura 2.

Por otra parte, se ha reportado la participación de receptores los 5-HT_{2B} y 5-HT_{3A} en las células β pancreáticas: el primero de ellos está relacionado con el aumento de la concentración intracelular de calcio y la consecuente liberación de insulina, mientras que el segundo se encuentra relacionado con el incremento en la concentración intracelular de sodio, potasio y calcio.⁸ De esta forma se ha observado que los receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃ se encuentran relacionados directamente con la secreción pancreática de insulina regulada por serotonina.

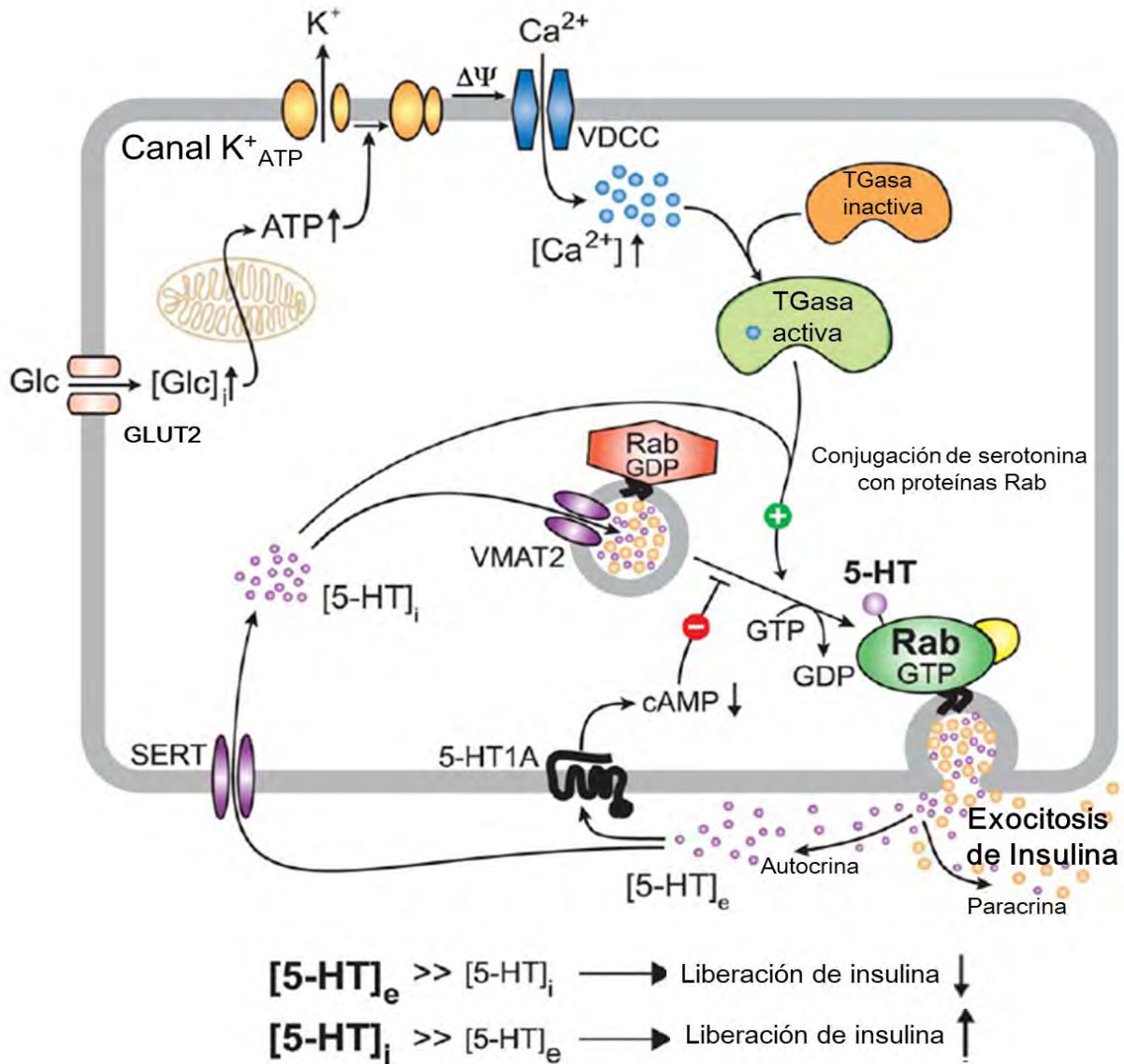


Figura 2. Mecanismo de acción de serotonina en células-β pancreáticas. (Adaptado de Paulman, N., 2009)

2.5 Quipazina

El compuesto quipazina (QPZ) ó 2-(1-piperazinil)quinolina, genera estimulación uterina debido a su acción en sitios sensibles a serotonina. Se ha demostrado que estos efectos pueden ser suprimidos al adicionar metisergida, un antagonista serotoninérgico.¹⁴ En estudios posteriores, se observó que la QPZ genera los mismos efectos que la serotonina en diferentes tejidos como aorta, íleon, tráquea y pulmón, los cuales eran disminuidos al adicionar antagonistas serotoninérgicos.¹⁵ La estructura de la QPZ se muestra en la Figura 3A.

A pesar de que las acciones fisiológicas de la QPZ son muy similares a las de la serotonina, la quinolina presentó una interesante variedad de efectos secundarios como generación de edema plantar en ratas¹⁵ y modificaciones importantes de los comportamientos conductuales en gatos: como expresión de enojo, midriasis, piloerección, protusión de uñas, arqueamiento de la espalda y vocalización.¹⁶ En estudios posteriores, realizados también en gatos, se observaron efectos como movimiento involuntario de extremidades, comportamiento de alucinaciones, acicalamiento, temblores, entre otros, ocurridos dentro de los primeros 5 a 15 minutos después de una administración intraperitoneal de quipazina en un rango de dosis de uno a dos miligramos por kilogramo.¹⁷ Estos y otros efectos no deseados fueron los responsables de que la QPZ no llegara a la terapéutica contemporánea, y limitó su uso como una herramienta farmacológica.

2.5.1 Nuevos derivados de QPZ

En 1994, Terrón y colaboradores sintetizaron y evaluaron una serie de derivados de la QPZ, los cuales conservaron la estructura de quinolina con un sustituyente de piperazina en la posición dos. Estos derivados presentaron principalmente sustituciones en las posiciones cinco y seis, así como en el nitrógeno secundario de la piperazina. De los derivados mencionados, sólo aquellos que presentaron modificaciones en el nitrógeno de la piperazina en los que se adicionó una cadena alifática de uno o dos carbonos con funcionalidades electronegativas en el extremo terminal, fueron los que presentaron resultados similares a la QPZ al evaluarlos sobre músculo liso vascular canino.¹⁸ Posteriormente, los derivados quinolínicos mencionados fueron evaluados sobre la sensibilidad a la insulina, siendo el compuesto 2-[4-(quinolin-2-il)piperazin-1-il]etan-1-ol (TR3370) el más activo, convirtiéndose en un buen candidato para posteriores evaluaciones preclínicas.¹⁹

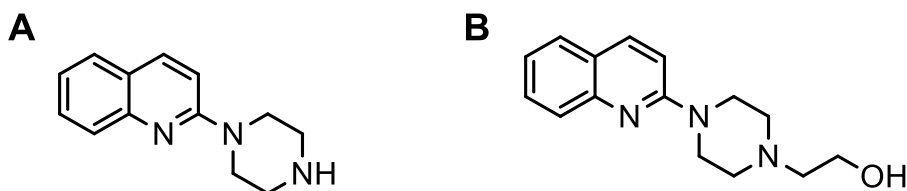


Figura 3. A) Estructura de la QPZ; B) Estructura de TR3370

2.6 Farmacocinética

La farmacocinética se dedica al estudio de la absorción, distribución, metabolismo (o biotransformación) y eliminación (ADME) de fármacos en el humano y en animales. La absorción y la distribución indican el paso de las moléculas de fármaco del sitio de administración a la sangre y a los tejidos blanco respectivamente. La eliminación de fármacos puede ocurrir por biotransformación y excreción de moléculas de la sangre al exterior del cuerpo a través de orina, bilis u otras vías de eliminación.²⁰

2.6.1 Absorción

La determinación de la absorción oral de una sustancia es una parte importante en la preformulación de nuevas entidades farmacológicas. En consecuencia, en años recientes, los estudios de absorción intestinal de fármacos han recibido un considerable interés. En general se cuenta con dos tipos de modelos para estudios de absorción. Los modelos animales están basados en el aislamiento *in situ* de segmentos intestinales. Así, el fármaco es administrado en el segmento intestinal y se determina la disminución de la concentración en el intestino y/o el aumento de la concentración en la sangre. En los modelos alternativos *in vitro* un segmento intestinal es aislado y montado en una cámara de órgano aislado. En este caso, el segmento intestinal es usado como una membrana semipermeable entre una cámara receptora y una donadora. El desarrollo de estos modelos ha hecho posible caracterizar numerosos factores que determinan el transporte transepitelial de fármacos.²¹

2.6.2 Biotransformación

Después de la administración oral en humanos o animales, los fármacos son absorbidos y transportados por la vena porta hacia el hígado, en donde son metabolizados inicialmente por este órgano. En general, los fármacos son predominantemente oxidados mediante enzimas del citocromo P450 (CYP450). En un menor grado, se llevan a cabo flavin-monooxidaciones, así como reacciones de reducción enzimática (por ejemplo esterasas y proteasas) o hidrólisis no enzimática. Los productos de esta transformación se conocen como metabolitos de

fase I. La subsecuente conjugación (reacciones de fase II) de los metabolitos de fase I puede generar metabolitos conjugados con glucurónidos, sulfatos, glutatión, glicina o acetato. En muchos casos, los estudios *in vitro* del metabolismo hepático pueden revelar información preliminar valiosa sobre el metabolismo de un compuesto por el hígado.²²

En el hígado, las enzimas que catalizan las reacciones de metabolismo de fármacos se encuentran principalmente en el endoplasma (microsomas) y la fracción soluble del citoplasma (citosol), junto con pequeñas cantidades en los lisosomas, las mitocondrias y el núcleo. Se han identificado a siete isoformas del citocromo P450 como las principales implicadas en el metabolismo de fármacos: CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4, de las cuales CYP 3A4 y CYP 2D6, son las principales responsables en la oxidación de fármacos.²²

La estabilidad metabólica ha sido definida como el porcentaje de compuesto original remanente con respecto al tiempo en presencia de un sistema de prueba metabólicamente activo. La estabilidad metabólica de nuevas entidades químicas puede ser determinada mediante incubaciones *in vitro* con hepatocitos, fracción S9 o microsomas. Posteriormente, la cuantificación de la entidad química restante, generalmente implica el uso de técnicas cromatográficas como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), la cual generalmente se acopla a un detector que presente una adecuada sensibilidad, como un espectrómetro de masas.²³

La fracción S9 es el producto de un homogenado tisular de un órgano (usualmente hígado). En el Glosario IUPAC de Términos Usados en Toxicología de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, esta fracción se define como la “fracción sobrenadante obtenida del homogenado de un órgano por centrifugación a 9000 g durante veinte minutos en un medio adecuado; y que contiene el citosol y los microsomas.”²⁴ Los componentes microsomales de la fracción S9 contienen isoformas del citocromo P450 (fase I del metabolismo). La porción citosólica contiene la mayor parte de actividades de transferasas (fase II del metabolismo).²⁵ La fracción S9 es más fácil de preparar que los microsomas purificados²⁶, además de ser relativamente más sencilla de utilizar debido a los requerimientos de la misma. En el caso de los microsomas, los hepatocitos y la

fracción S9, estos deben ser fortificados con nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y un sistema de regeneración del mismo. El NADPH es un cofactor requerido para que los citocromos funcionen dentro de los microsomas, ya que suministra los electrones necesarios a través de la NADPH-citocromo reductasa, la cual se localiza en el retículo endoplásmico. Para el uso de microsomas y hepatocitos es necesario adicionar a la mezcla de reacción la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, así como su sustrato y cofactores, para regenerar constantemente el NADPH consumido por los citocromos.²³

2.7 Metabolismo de quinolinas y piperazinas

A pesar de que la QPZ fue una herramienta farmacológica ampliamente utilizada en los años setentas, no se cuenta con información exacta sobre el metabolismo de la misma. Sin embargo, se han realizado diferentes estudios metabólicos que muestran la biotransformación de xenobióticos de naturaleza quinolínica; en donde las principales biotransformaciones detectadas son oxidaciones sobre las posiciones 3, 4, 5, 6, 7 y 8.²⁷ Con respecto a la porción de piperazina, se ha demostrado que la principal modificación en la molécula es la apertura de este anillo por reacciones de desalquilación.^{28, 29}

2.8 Perfil neurofarmacológico

La evaluación del comportamiento conductual en animales de experimentación es de gran relevancia durante el desarrollo de nuevos fármacos, o la evaluación de compuestos potencialmente tóxicos. En este sentido, el estudio comienza con la monitorización inicial de la salud, las funciones sensoriales y las habilidades motoras de los animales antes de que se realicen las pruebas conductuales específicas.³⁰

En general, un perfil neurofarmacológico está dividido en la evaluación de los cambios conductuales, neurológicos y autonómicos después de la administración de dosis crecientes de un fármaco. El perfil conductual incluye la evaluación de la conciencia, el humor, y la actividad motora; el perfil neurológico mide la, excitabilidad del SNC, la postura, la coordinación motora, el tono muscular y los reflejos; por otra parte, el perfil autonómico evalúa aspectos como el tamaño de la

pupila, la salivación, la piloerección, la hipotermia, la coloración de la piel, entre otros.³¹

2.9 Estudios de Relación Farmacocinética/Farmacodinamia

Las asas de histéresis son fenómenos que se observan entre la administración de una sustancia y los efectos clínicos que ésta genera. Estos fenómenos se pueden demostrar mediante el estudio de la relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia, presentándose desde los estudios preclínicos hasta la clínica. Cabe mencionar que cuando se presentan las asas de histéresis, se obtiene una visión general de la complejidad de la acción y distribución del fármaco. Estas situaciones sugieren que la relación entre la concentración del fármaco y el efecto medido no es una simple relación directa. Las asas de histéresis en contra del movimiento de las manecillas del reloj han sido generalmente definidas como el proceso en el que el efecto puede incrementar con el tiempo en una determinada concentración. Por otra parte, en las asas de histéresis en sentido de las manecillas del reloj, el efecto disminuye con el tiempo en una determinada concentración. Las asas de histéresis pueden ocurrir como consecuencia de una importante variedad de mecanismos farmacocinéticos y farmacodinámicos como la tolerancia, el retraso en la distribución, la retroalimentación, los cambios en las velocidades de absorción y/o eliminación, la actividad agonista o antagonista de metabolitos, la internalización del sitio activo, la cinética de receptor lenta, la actividad retardada o modificada, la unión a proteínas dependiente del tiempo y el uso de fármacos racémicos, por mencionar los factores más importantes.³²

3. Planteamiento del problema

La diabetes es una enfermedad que afecta a una gran proporción de la población en México y en el mundo, y es responsable de un importante número de muertes al año en la población que la padece.^{4,1} Con base en esto y a pesar de los esfuerzos por encontrar nuevos fármacos para tratar esta enfermedad, existe un número limitado de tratamientos farmacológicos que regulan adecuadamente los niveles de glucosa en sangre, principalmente en personas con diabetes tipo II.²

En los últimos años, se han realizado avances para entender el papel de la serotonina en los procesos de homeostasis de la glucosa, principalmente relacionada con la liberación de insulina.⁹ Así, se ha evaluado la actividad hipoglucemiante de diversos agonistas serotoninérgicos con la finalidad de poder encontrar una molécula que presente la eficacia adecuada para disminuir los niveles de glucosa a los valores de referencia. De los experimentos mencionados, el compuesto TR3370, un derivado de la QPZ, mostró adecuada actividad farmacológica.¹⁹

A pesar de que la QPZ ha es un buen agonista serotoninérgico¹⁴, e inclusive presenta una actividad hipoglucemiante importante¹⁹, su posible uso clínico se ha visto truncado debido a sus efectos secundarios a nivel del sistema nervioso central,¹⁷ lo que ha generado una búsqueda continua nuevos derivados de la misma con mejor actividad serotoninérgica, pero sin presentar los efectos.

Dicho lo anterior, en el presente trabajo se planteó con la finalidad de determinar si los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de la QPZ y su derivado son similares, tomando en cuenta las diferencias estructurales que presentan. Los datos obtenidos proveerán información relevante respecto a los procesos farmacocinéticos y su toxicología, la cual es muy importante para la optimización y desarrollo de nuevos fármacos³.

4. Hipótesis

Las variaciones entre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de QPZ y su derivado hidroxialquilado, TR3370, se deberán a las diferencias estructurales entre estas moléculas. Esta modificación en la estructura de TR3370 le confiere ventajas en los procesos ADME, así como en sus acciones farmacológicas sobre el compuesto de origen.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la QPZ y su derivado TR3370 mediante ensayos de permeabilidad y de biotransformación *in vitro* y determinar del perfil farmacocinético *in vivo* en ratas, además de monitorizar los niveles de glicemia y realizar del perfil neurofarmacológico en ratones.

5.2 Objetivos particulares

- ✓ Desarrollar y validar un método por CLAE/UV para la cuantificación de QPZ y TR3370 en los estudios de permeabilidad, biotransformación y farmacocinética.
- ✓ Realizar estudios cualitativos y cuantitativos de la biotransformación de QPZ y TR3370 *in vitro* empleando la fracción hepática S9 de hígado de rata.
- ✓ Determinar la constante aparente de permeabilidad de QPZ y TR3370 en duodeno de rata empleando un modelo de difusión en una cámara de órgano aislado.
- ✓ Determinar el perfil farmacocinético de QPZ y TR3370 empleando las vías de administración intravascular (i.v.) y oral (p.o.) en ratas.
- ✓ Correlacionar los resultados obtenidos de los niveles plasmáticos de QPZ y TR3370 con los niveles de glicemia en un estudio de relación farmacocinética/farmacodinamia.
- ✓ Determinar la actividad de QPZ y TR3370 sobre el SNC mediante la realización de un perfil neurofarmacológico en ratones.

6. Parte Experimental

Los compuestos QPZ y TR3370 fueron proporcionados por el Dr. Adelfo Reyes de la FES Zaragoza, UNAM. El resto de reactivos empleados fueron de la marca Merck (EUA) o JT Baker (EUA) con un grado de pureza RA (reactivo analítico). Los disolventes (metanol y acetonitrilo) empleados para los análisis cromatográficos fueron de la marca JT Baker (EUA) y grado HPLC. El agua, para los análisis cromatográficos fue obtenida de un filtro Milli-Q.

El equipo cromatográfico empleado fue de la marca Waters (EUA) y consistió en una bomba cuaternaria modelo 600 acoplada con un desgasificador en línea, un inyector modelo 717 y un detector de arreglo de diodos (DAD) en el UV modelo 2996.

La fracción S9 de hígado de rata fue adquirida del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los cofactores (NADP⁺ y glucosa-6-fosfato) fueron adquiridos de Cayman Chemical ® (EUA), mientras que el cloruro de magnesio fue de la marca Merck (EUA).

Las ratas empleadas para los estudios de farmacocinética presentaban un peso corporal entre 250 y 300 g. Los ratones para los estudios perfil neurofarmacológicos tenían un peso corporal entre 25 y 30 g. Todos los animales se mantuvieron con libre acceso de agua y alimento. Cada grupo de estudio consistió en al menos seis animales y después de cada experimento fueron sacrificados por una sobredosis de pentobarbital (ratas), o por dislocación cervical (ratones). El número de animales utilizados por experimento fue el mínimo necesario para tener un análisis estadístico confiable, tomando en cuenta que estos experimentos son considerados como estudios piloto,³³ puesto que no existe información previa de los compuestos estudiados. Todos los experimentos siguieron los estándares éticos de normas nacionales para la investigación experimental del dolor en animales (NOM-062-ZOO-1999)³⁴ y fueron autorizados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química (CICUAL/243/17) y (CICUAL/220-2/17).

6.1 Desarrollo y Validación del Método Analítico

El desarrollo del método analítico para la cuantificación de QPZ y TR3370 inició con la evaluación de diversas condiciones analíticas por cromatografía de líquidos con la finalidad de determinar aquellas que permitieran una adecuada separación de los analitos en las muestras, sin interferencias de la matriz utilizada en los ensayos. Los cambios más importantes fueron en: la fase estacionaria, la fase móvil (composición, pH y fuerza iónica), el flujo, el modo de elución (gradiente o isocrático) y la temperatura. Una vez determinadas las condiciones adecuadas de trabajo se procedió a la validación del método.

Por otra parte, una metodología fue desarrollada para el procesamiento de las muestras obtenidas a lo largo de los experimentos buscando que fuera sencilla, rápida, y que permitiese un recobro adecuado de los analitos a cuantificar, para lo cual se evaluaron diversas condiciones.

Los blancos empleados para el proceso de validación correspondieron a plasma de rata para los estudios farmacocinéticos, fracción S9 de hígado de rata para los ensayos de biotransformación y KHS para la evaluación *in vitro* de la permeabilidad intestinal.

6.1.1 Adecuabilidad

Para determinar el adecuado funcionamiento del sistema cromatográfico en las determinaciones analíticas se evaluó la forma y la simetría de los picos cromatográficos, la consistencia en la respuesta obtenida y la ausencia de acarreo después de cada inyección. Así, se inyectaron por sextuplicado una solución de los compuestos a evaluar a una concentración de 500 µg/mL en solución. El coeficiente de variación (%CV) se evaluó en las respuestas obtenidas para cada analito.

6.1.2 Intervalo lineal

Muestras de blanco adicionadas con QPZ o TR3370 a las concentraciones de 20, 10, 5, 2, 1 y 0.5 µg/mL se inyectaron por triplicado para los métodos de cuantificación en fracción hepática y plasma; las concentraciones empleadas para el método de permeabilidad fueron 0.6, 0.2, 0.066, 0.022 y 0.007 mM equivalentes a concentraciones de 127.8, 42.6, 14.06, 4.68 y 1.49 µg/mL de QPZ y a

concentraciones de 154.2, 51.4, 19.96, 5.65 y 1.80 $\mu\text{g/mL}$ de TR3370 respectivamente. Las soluciones fueron preparadas siguiendo las diluciones mostradas en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

Tabla 2. Preparación de las soluciones de QPZ y TR3370 para la curva de calibración de los ensayos de permeabilidad

Concentración inicial (mM)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de KHS (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (mM)
0.6*	0.666	1.334	2	0.2
0.2	0.22	1.780	2	0.022
0.022	0.318	0.682	1	0.007
0.6*	0.11	890	1	0.066

* Se prepararon las soluciones Stock (0.6 mM) de QPZ y de TR3370 pesando 0.987 y 0.881 mg respectivamente, se disolvieron en KHS y se llevaron a un volumen final de 5mL.

Tabla 3. Preparación de las soluciones de QPZ y TR3370 para la curva de calibración de los ensayos de bitransformación y farmacocinética

Concentración inicial (mg/mL)	Volumen de alícuota (μL)	Volumen de plasma ó S9 (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
2.5*	8	0.992	1	20
2.5*	4	0.996	1	10
2.5*	2	0.998	1	5
0.025*	80	0.920	1	2
0.025*	40	0.960	1	1
0.010	50	0.950	1	0.5

* Se prepararon las soluciones de QPZ y de TR3370 empleadas para los ensayos de biotransformación (2.5 mg/mL), posteriormente, esta solución fue diluida posteriormente 10 veces, hasta una concentración final de 0.025 mg/mL.

Posteriormente, se graficó la respuesta analítica (y) contra el nivel de concentración adicionado (x). Se confirmó visualmente la existencia de linealidad en el intervalo. El gráfico de residuales se elaboró y se confirmó la aleatoriedad de los mismos alrededor de la recta.

6.1.3 Intervalo de trabajo

Para determinar el intervalo de trabajo se emplearon los resultados obtenidos en la determinación del intervalo lineal (sección 6.1.2) y se consideraron únicamente los niveles que cumplieran con los criterios de repetibilidad y recuperación.

Para obtener la curva de calibración más adecuada se realizó la prueba de homoscedasticidad. Se calculó la varianza del nivel de concentración menor (S_1^2) y la varianza del nivel de concentración mayor (S_2^2) de cada curva. Posteriormente se determinó el valor de F por medio de la siguiente expresión:

$$F_{exp} = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

La F experimental (F_{exp}) obtenida se comparó con la F de tablas con un nivel de significancia del 99%.

En caso de determinarse que los datos obtenidos eran de naturaleza heteroscedástica, se calculó el factor de peso (W_i) para cada uno de los modelos de calibración de regresión propuestos por Almeida y colaboradores, los cuales fueron: x^0 , $1/y^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$, $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$. Después, se calculó el valor de los residuales por medio de la siguiente expresión:

$$Residual = (y_{observada} - y_{predicha})$$

La gráfica de residuales se construyó en función de la concentración para determinar si la distribución de los valores obtenidos se encontraba por arriba o por debajo de la media.

Para seleccionar la mejor curva, se calculó la sumatoria del porcentaje de error relativo (%RE) de los modelos de calibración propuestos por Almeida y colaboradores, utilizando la siguiente expresión:³⁵

$$\%RE = \frac{Concentración_{obtenida} - Concentración_{nominal}}{Concentración_{nominal}} \times 100$$

Una vez que se seleccionó la mejor curva, al igual que para la determinación del intervalo lineal, la respuesta analítica (y) se graficó contra la concentración adicionada (x), posteriormente se calculó el valor de la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (R).

6.1.4 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Empleando los resultados de la determinación del intervalo de trabajo, se calculó el valor de la pendiente (m) y la desviación estándar de la ordenada al origen (sb_0) de la respuesta analítica (y), contra el nivel de concentración estimado. Los límites se determinaron con las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3 * sb_0}{m}$$

$$LC = \frac{10 * sb_0}{m}$$

6.1.5 Recuperación y sesgo

Las muestras de blanco (plasma sanguíneo de rata, fracción S9 de hígado de rata y KHS) adicionadas con concentraciones conocidas de QPZ o TR3370 se analizaron bajo las condiciones predeterminadas y la concentración recuperada para cada nivel de concentración adicionada fue calculada. Para determinar el sesgo se efectuó la resta aritmética de la concentración añadida menos la concentración recuperada.

6.1.6 Repetibilidad

La concentración de cada analito por sextuplicado en un mismo día a tres niveles de concentración (niveles inferior, medio y superior estimados en el intervalo de trabajo) fue determinada y el porcentaje de recuperación de los seis resultados se calculó para cada nivel. La media (\bar{x}), desviación estándar (S_r) y el coeficiente de variación (CV_r) de los porcentajes de recuperación obtenidos se determinaron para cada nivel adicionado.

6.1.7 Reproducibilidad (Precisión intermedia)

La concentración de analito fue determinada por duplicado en tres diferentes días a un nivel de concentración (nivel medio estimado en el intervalo de trabajo), y se calculó el porcentaje de recuperación de los seis resultados. Se calcularon la media (\bar{x}), desviación estándar (S_r) y el coeficiente de variación (CV_R) para los porcentajes de recuperación obtenidos.

6.1.8 Sensibilidad

Los datos empleados para la estimación del intervalo de trabajo fueron utilizadas para, graficar la respuesta analítica (y) en función de la concentración adicionada (x) para el cálculo de la pendiente de la recta, y se estableció la relación entre el cambio de la respuesta analítica por unidad de concentración.

6.1.9 Selectividad

Muestras de blanco sometidas a las mismas condiciones que las de los analitos fueron evaluadas con las mismas condiciones cromatográficas. Posteriormente se analizaron los cromatogramas obtenidos en busca de la presencia de interferencias debidas a la matriz en el tiempo de retención de la QPZ y de TR3370.

6.1.10 Robustez

Tres variables fueron seleccionadas e identificadas como relevantes en el proceso de análisis de las muestras (pH de la fase móvil, temperatura de la columna y concentración del amortiguador en la fase móvil), mismas que de manera deliberada se modificaron ligeramente para este ensayo. Con base en los resultados obtenidos en el análisis de las muestras por duplicado con combinaciones en las variaciones de los factores elegidos, se determinó la capacidad del método de permanecer inalterado por las mismas.

6.2 Estudios de permeabilidad *in vitro*

La porción inicial de intestino delgado (2 cm) con un corte longitudinal proveniente de una rata Wistar con un peso entre 250 y 300 g a la que se le aplicó eutanasia con una sobredosis de pentobarbital se colocó en una cámara de órgano aislado. El compartimiento hacia donde se encontraba la cara correspondiente a la luz intestinal fue considerado el compartimento donador, mientras que el compartimento hacia donde se encontraba la parte basolateral del intestino correspondió al compartimento receptor. Se llenó la cámara por ambos compartimentos con un volumen fijo de 5 mL de solución fisiológica Krebs-Henseleit en cada uno. La preparación de la solución (para un litro) consistió en 6.903 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.351 g de cloruro de potasio (KCl), 0.368 g de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.295 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.165 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 2.1 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 1.998 g de glucosa y 0.017 g de EDTA. La cámara se mantuvo durante todo el experimento a una temperatura de 37°C con ayuda de agua recirculante y en ambos compartimentos

de la cámara se colocaron mangueras para el burbujeo constante de aire y la agitación del medio en el interior del compartimento. Previo al inicio de experimento se mantuvieron estas condiciones durante 30 minutos para el acondicionamiento del segmento intestinal. En las Figuras 4 y 5 se presentan un esquema de la cámara antes y después de ser ensamblada, respectivamente.

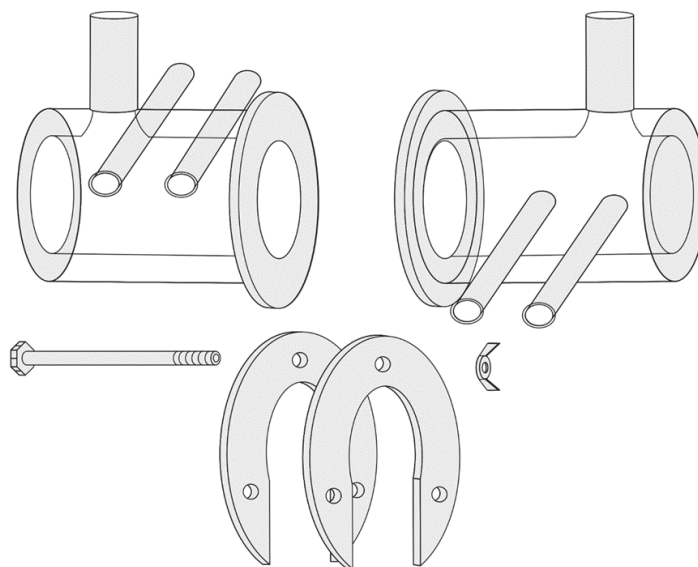


Figura 4. Partes de la cámara para el estudio de permeabilidad.

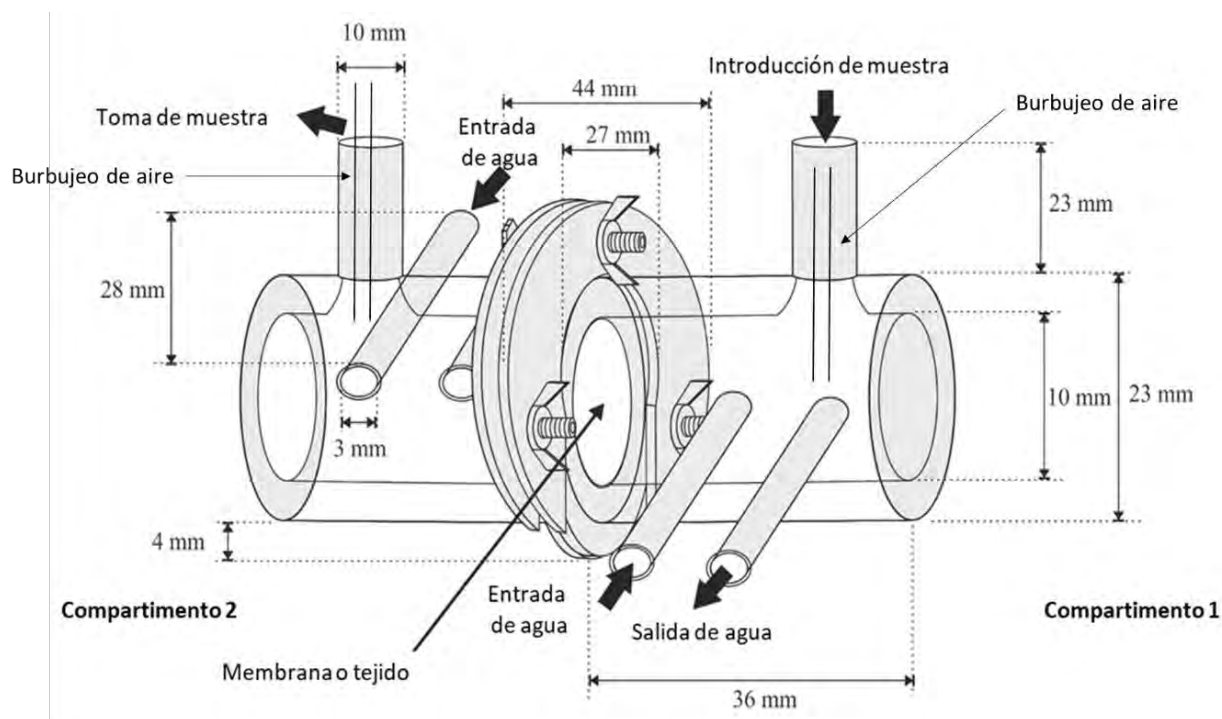


Figura 5. Cámara para estudio de permeabilidad ensamblada.

Soluciones de QPZ y de TR3370 fueron preparadas a una concentración de 1.8 mg/mL, la cual fue definida en estudios de permeabilidad realizados anteriormente en el grupo de trabajo.³⁶ Un mililitro de KHS fue extraído del compartimento donador y se sustituyó por un mililitro de la solución de QPZ o de TR3370, obteniendo una concentración inicial de QPZ o TR3370 de 360 µg/mL, esto se consideró como el inicio del experimento (tiempo cero). Muestras de 200 µL fueron colectadas tanto del compartimento donador como del compartimento receptor en los intervalos de tiempo de 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min. Durante todo el experimento el volumen de muestreo fue ajustado con KHS. Las muestras recolectadas fueron inmediatamente filtradas con filtros de nylon de 0.45 µm, colocadas en tubos Eppendorf y congeladas hasta su análisis posterior. Seis repeticiones fueron realizadas para cada ensayo.

El cálculo de la constante aparente de permeabilidad se llevó a cabo empleando la siguiente ecuación:

$$Kp = \frac{V}{60 A C_0} \frac{\Delta Q}{\Delta t}$$

En donde Kp es la Constante aparente de permeabilidad (cm/s); V el volumen de líquido en el compartimento donador (cm³); A la superficie de membrana (cm²); C₀ la concentración inicial en el compartimento donador (µM) y $\frac{\Delta Q}{\Delta t}$ el cambio de la concentración de compuesto en el compartimento receptor en función del tiempo (µM/min).²¹

6.3 Ensayo de biotransformación de QPZ y TR3370

Para los ensayos de biotransformación de la QPZ y el TR3370, se empleó un medio de reacción compuesto por una solución al 1.15% de KCl en una solución amortiguadora de Tris-HCl, ajustada a un pH de 7.4. Para la preparación de esta solución se emplearon las siguientes cantidades: 3.028 g de Tris-HCl y 0.575 g de KCl en 500 mL de agua destilada; el pH final de las soluciones se ajustó con HCl o NaOH de acuerdo a las necesidades.

Las soluciones de cofactores requeridos fueron preparadas en el amortiguador antes mencionado el mismo día de la realización del ensayo y manteniéndolas a una temperatura aproximada de 4°C. Los cofactores empleados fueron: cloruro de magnesio (MgCl₂) 5 mM (7.11 mg en 1.4 mL de amortiguador), glucosa-6-fosfato 5 mM (10.64 mg en 1.4 mL de amortiguador), y NADP⁺ 0.5 mM (2.66 mg en 1.4 mL de amortiguador).

La preparación de la mezcla de reacción consistió en volúmenes de 200 µL de cada una de las siguientes soluciones: MgCl₂, glucosa-6-fosfato, NADP⁺ y fracción S9 (20 mg de proteína por mililitro). La determinación de la concentración de proteínas en la fracción S9 se realizó mediante la técnica de Biuret.³⁷ Posteriormente se adicionaron 200 µL de amortiguador, obteniendo un volumen final de 1 mL. Las mezclas anteriores se colocaron en un agitador automático de la marca IKA, modelo MS 3 digital, y con baños de agua, se mantuvo una temperatura de 37°C durante todo el experimento a una velocidad de agitación de 100 rpm. El tiempo de reacción fue medido a partir de la adición del compuesto a evaluar (4 µL de una solución de 2.5 mg/mL) para una concentración final del compuesto de 10 µg/mL.²²

Previo a la evaluación de la biotransformación de QPZ y TR3370, fue necesario realizar un ensayo que permitiese determinar la viabilidad de las fracciones hepáticas. Para ello se usó como marcador de metabolismo bencilamina, sometiéndola a las mismas condiciones previamente descritas.

Dos tipos de ensayo de biotransformación se realizaron para QPZ y TR3370. El primero de ellos fue a punto final, en el que las reacciones se detuvieron con 1 mL de acetonitrilo frío a las 2 horas de iniciado el experimento. El segundo experimento consistió en la monitorización de la reacción a los tiempos de 1, 2, 3 y 4 h, con la finalidad de establecer la cinética de disminución de QPZ y TR3370. Para cada ensayo se realizaron seis repeticiones. Después de detener las reacciones se procedió al tratamiento de las muestras y su posterior análisis.

Para precipitar las proteínas presentes en el medio, se adicionó 1 mL de acetonitrilo frío en tubos Eppendorf y después se incorporó la muestra a analizar (1 mL). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10

minutos, y se separó el sobrenadante (aproximadamente 2 mL) en un tubo nuevo. Posteriormente, los sobrenadantes se llevaron a sequedad en una estufa a 40° C con vacío. Las muestras se reconstituyeron con 1 mL de fase móvil para su posterior análisis.

6.3.1 Análisis de muestras de ensayos metabólicos por EM

Las muestras fueron evaluadas por espectrometría de masas (EM) de alta resolución empleando la técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI) en un espectrómetro de masas de la marca Perkin Elmer modelo AxION 2. Previamente, las muestras de los ensayos metabólicos fueron llevadas a sequedad por completo y reconstituidas en un mililitro de metanol grado HPLC. 2 µL de la solución anterior fueron introducidos al espectrómetro para su análisis.

Los espectros de corriente iónica total (TIC, por sus siglas en inglés) fueron analizados y se seleccionaron los pesos moleculares que coincidieran con los de los posibles metabolitos de QPZ y de TR3370 propuestos con el software *MetaPrint 2D*.³⁴ Tomando en cuenta los pesos moleculares y las fórmulas condensadas de los metabolitos se realizó un análisis mediante el programa *TOF MS Driver 6.2*, el cual permite determinar a partir de los resultados experimentales obtenidos, la probabilidad de que la señal analizada corresponda con la fórmula molecular condensada de las estructuras de interés. A partir de los datos de los espectros de masas se propusieron las posibles rutas metabólicas de QPZ y TR3370.

6.4 Estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratas Wistar

Los estudios farmacocinéticos se realizaron empleando ratas macho de la cepa Wistar, con un peso entre 300 y 350 g. Ocho horas previas a la realización del experimento, los animales fueron sometidos a condiciones de ayuno con acceso libre a agua. Posteriormente, a cada animal se le colocó una cánula en la arteria caudal de la cola, la cual consistió en una manguera de polietileno con un diámetro interno de 0.28 mm y un diámetro externo de 0.61 mm de la marca Clay Adams adaptada de uno de los extremos a una aguja de calibre 23G. Previamente, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 45 mg/kg. Una vez que

los animales se recuperaron de la anestesia, se les administró QPZ o TR3370 por vía intravascular u oral a una dosis de 30 mg/kg, (cuatro grupos experimentales con seis individuos por cada uno). Los animales se colocaron en cajas de acrílico que limitaron su movimiento para evitar que se retiraran la cánula o se lastimaran la zona de la canulación.

Previo a la administración de los tratamientos se tomó una muestra de sangre por medio de la cánula, considerando a ésta como el blanco del experimento. Después de las diferentes administraciones se tomaron muestras de 200 μ L de sangre en los intervalos de tiempo de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 min y fueron trasvasadas a tubos Eppendorf de dos mililitros, los cuales contenían 20 μ L de heparina sódica al 1% en solución salina isotónica. El volumen extraído en cada toma de muestra era repuesto con solución salina isotónica con heparina al 1% con la finalidad de no alterar los volúmenes fisiológicos en los animales. Una vez concluidos los tiempos de muestreo, los animales se sometieron a un proceso de eutanasia mediante una sobredosis de pentobarbital.

Todas las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante diez minutos, posteriormente se tomaron 100 μ L del sobrenadante (plasma) y se colocaron en un tubo Eppendorf que contenía 300 μ L de acetonitrilo frío. Las suspensiones se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido (400 μ L) se colocó en un tubo Eppendorf, mismo que posteriormente se llevó a sequedad a 40°C y vacío. Finalmente, las muestras se reconstituyeron con 200 μ L de fase móvil previo a su análisis mediante el método validado.

Los resultados de concentraciones plasmáticas de QPZ o TR3370 fueron graficados en función del tiempo y se determinaron los valores de los parámetros farmacocinéticos empleando un modelo no compartimental. La determinación de la constante de eliminación (k_{el}) se obtuvo empleando la pendiente terminal, correspondiente a la fase de eliminación de los perfiles farmacocinéticos y la constante de absorción (k_a) se calculó empleando el método de los residuales. Adicionalmente, se realizó el análisis estadístico para determinar la diferencia significativa entre estos parámetros para ambos tratamientos.

6.5 Monitorización de los niveles de glucosa

De manera simultánea a la toma de muestras sanguíneas se realizó la medición de los niveles de glucosa en sangre. Para ello se empleó un glucómetro comercial de la marca *One Touch Ultra* y tiras reactivas compatibles con el mismo. Con los valores obtenidos se construyeron gráficas del curso temporal del porcentaje de variación de la concentración de glucosa, definido como:

$$\% \text{ Variación} = \frac{[\text{Glucosa en tiempo } (t)] - [\text{Glucosa basal } (t = 0)]}{[\text{Glucosa basal } (t = 0)]} \times 100$$

Se adicionó un grupo control con la finalidad de determinar la duración del efecto farmacológico en los animales de estudio, este último consistió en ratas a las cuales se les realizó una incisión en la cola a manera de simular el proceso de canulación en las mismas y se les colocaron en cajas de contención para simular en las condiciones de las ratas en los estudios farmacocinéticos. Muestras sanguíneas fueron colectadas en los mismos tiempos de muestreo que en los estudios farmacocinéticos y se determinó la concentración de glucosa en las mismas.

6.6 Determinación del perfil neurofarmacológico

Para determinar la actividad de la QPZ y el TR3370 sobre el sistema nervioso central se realizaron un conjunto de pruebas a la conducta de los animales de experimentación. Para los experimentos se emplearon ratones machos de la cepa ICR con un peso entre 25 y 30 g y los grupos de experimentación fueron conformados por seis animales para cada dosis y por cada tratamiento de la siguiente forma: grupo 1, solución Salina (SS); grupo 2, QPZ (1, 3 y 10 mg/kg); y grupo 3, TR3370 (1, 3 y 10 mg/kg). Todos los tratamientos se administraron intraperitonealmente y al término de las evaluaciones neurofarmacológicas se tomó

una gota de sangre a cada animal por punción de la parte terminal de la cola con la finalidad de determinar sus niveles de glicemia.

6.6.1 Evaluación de la coordinación motora

Durante tres días previos a la realización de los experimentos, los ratones fueron sometidos a un entrenamiento en el equipo Rotarod (7650, Ugo Basile, VA, IT), en el cual se colocaban los animales en el rodillo giratorio a 16 rpm por 2 min. Al término de este tiempo, los animales fueron retirados (fase de entrenamiento). En una segunda etapa (fase de prueba) los animales fueron tratados y se evaluó el tiempo que permanecían los animales sobre el vástago del equipo en funcionamiento a los tiempos de 10, 20 y 30 min después de la administración de cada tratamiento.³⁹

6.6.2 Evaluación de la actividad exploratoria

La prueba del cilindro de exploración consistió en colocar a los ratones individualmente dentro de un cilindro transparente de vidrio de 30 cm de alto y 11 cm de diámetro interno, después de 30 min de la administración de los tratamientos. Una vez que el ratón se encontraba en el interior del cilindro, se contabilizaron las veces que éste se levantaba verticalmente sobre sus patas traseras o sobre las paredes del recipiente durante un periodo de 5 minutos.³⁹

6.6.3 Evaluación de la actividad motora

La prueba del actímetro se realizó en un aparato compuesto por una caja de aluminio y propileno de 40x40x40 cm, la cual cuenta con 32 rayos infrarrojos, 16 en cada brazo (LE8825, Harvard Apparatus, MA, USA). Este equipo establece el tipo de movimiento que tienen los ratones en movimientos rápidos normales (f-mov), movimientos lentos normales (s-mov), movimientos rápidos estereotipados (f-ste) y movimientos lentos estereotipados (s-ste). Después de 35 min de la administración el tratamiento farmacológico, cada animal fue colocado en el centro del tablero y se registraron automáticamente los movimientos durante 5 minutos.³⁹

6.6.4 Prueba del tablero de hoyos

La prueba del tablero de hoyos se realizó en una superficie cuadrada (40x40 cm) con una altura de 25 cm, la cual cuenta 16 hoyos de 3 cm de diámetro distribuidos homogéneamente en el tablero (6650, Ugo Basile, VA, IT). En esta prueba, los animales fueron colocados individualmente sobre el tablero 40 minutos después de la administración del fármaco, y se contabilizó el número de veces que los animales introducían la cabeza por el agujero.³⁹

7. Resultados

7.1 Procesamiento de las muestras

Un método para el procesamiento adecuado de las muestras de las evaluaciones biológicas fue desarrollado, buscando que éste fuera lo más práctico posible. Los recobros obtenidos de los mismos fueron de 90.3% para QPZ y 98.6 % para TR3370.

De las diferentes condiciones probadas se seleccionaron aquellas que permitiesen un adecuado recobro de los analitos, además de que fuesen lo más rápidas y sencillas, tomando en cuenta que se requeriría el análisis de múltiples muestras por experimento a lo largo del proyecto. El procedimiento general para el procesamiento de muestras de plasma sanguíneo y de fracción hepática de hígado de rata se ejemplifica en la Figura 6.



Figura 6. Método general para el procesamiento de muestras de ensayos metabólicos y de perfiles farmacocinéticos

7.2 Condiciones cromatográficas de análisis

Las condiciones cromatográficas que permitieron la detección adecuada de las moléculas de interés se mencionan a continuación.

Para el análisis de QPZ las condiciones fueron las siguientes: la fase estacionaria utilizada fue una columna base de sílica derivatizada con octadecilo

(C18) de la marca RESTEK Ultra Aqueous con tamaño de partícula de 5 μm y dimensiones de 150x4.6 mm; la fase móvil consistió en una mezcla 60:40 de acetonitrilo y de amortiguador de formiato de amonio (HCOONH_4) 10 mM ajustado a un pH entre 4.3 y 4.5 con ácido fórmico. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min en modo isocrático. El volumen de inyección fue de 10 μL y la detección se realizó a λ 340 nm.

Las condiciones óptimas determinadas para el análisis de TR3370 fueron iguales que para QPZ, con la diferencia que la fase móvil no contenía ácido fórmico para modificar la acidez de la misma, por lo que el pH se encontraba en un rango entre 6.0 y 6.5.

7.3 Validación del método analítico

La validación de los métodos cromatográficos se realizó para la cuantificación de QPZ y TR3370 en las muestras generadas en los experimentos. En el caso de QPZ, todos los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Por otra parte, en la validación de los métodos para TR3370 la mayoría de los parámetros evaluados cumple con los criterio de aceptación, no así los valores de recuperación de la concentración más baja de este compuesto.

Los datos obtenidos para las curvas de calibración no pasaron la prueba de homosceasticidad. La evaluación de los diferentes factores de peso mostró que en todos los casos, el factor x^0 presentó el menor porcentaje de error relativo. Los resultados de las evaluaciones de los factores de peso se muestran en los anexos I, II, III y IV

Con respecto a la validación de QPZ, las Tablas 4 y 5 muestran los resultados de la validación del método para la cuantificación de la misma en muestras de los ensayos de permeabilidad y en las muestras de ensayos de biotransformación y farmacocinéticos, respectivamente. Por otra parte, la Figura 7 muestra algunos cromatogramas correspondientes a las diversas muestras analizadas, cabe mencionar que en ninguno de los análisis se observaron señales que interferieran con la cuantificación de la QPZ.

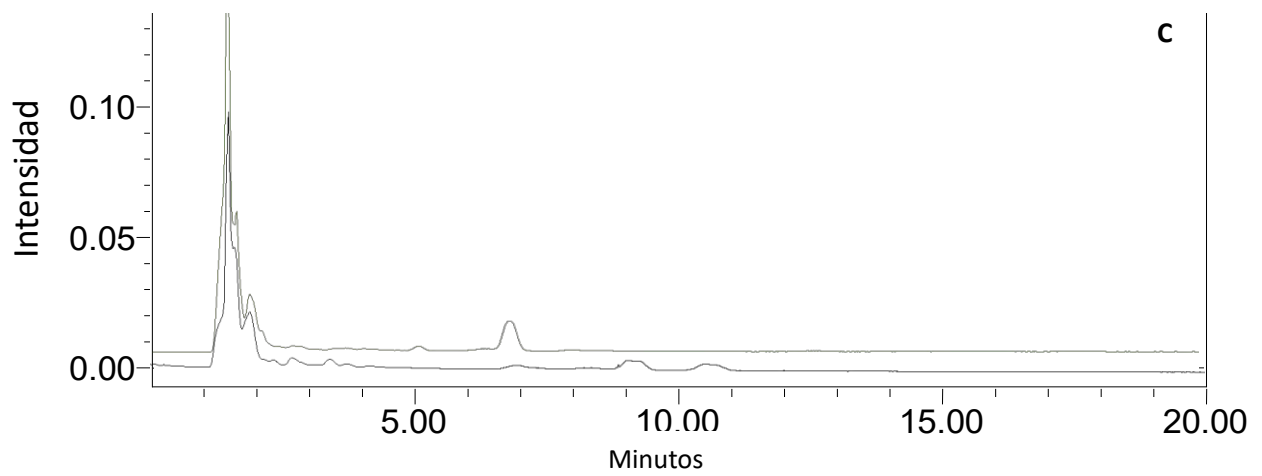
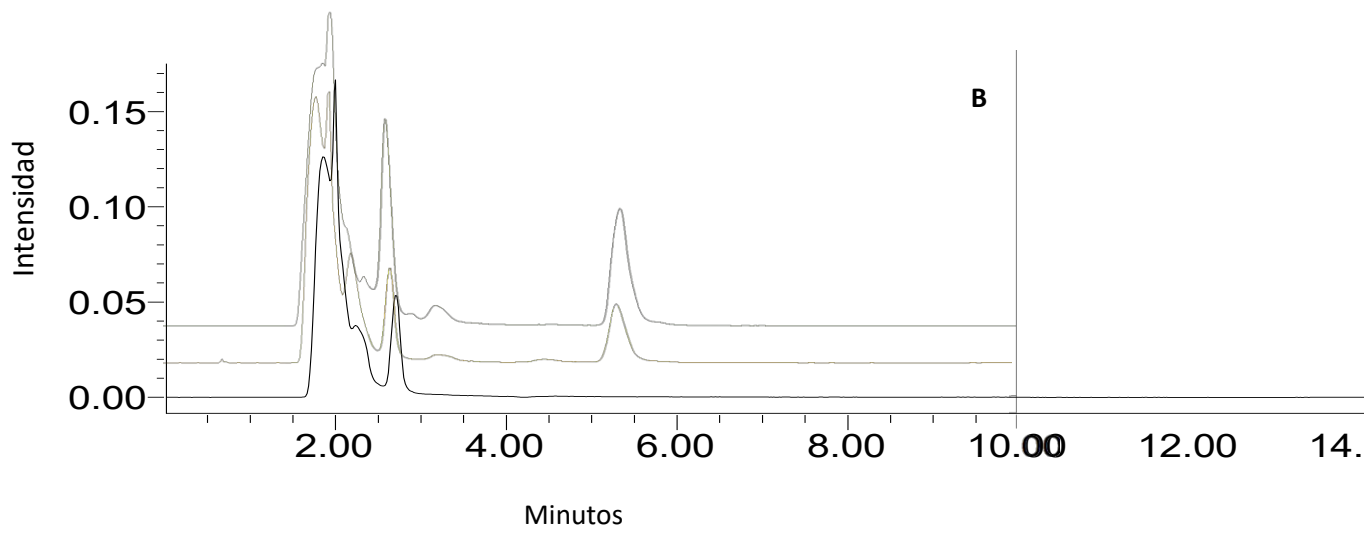
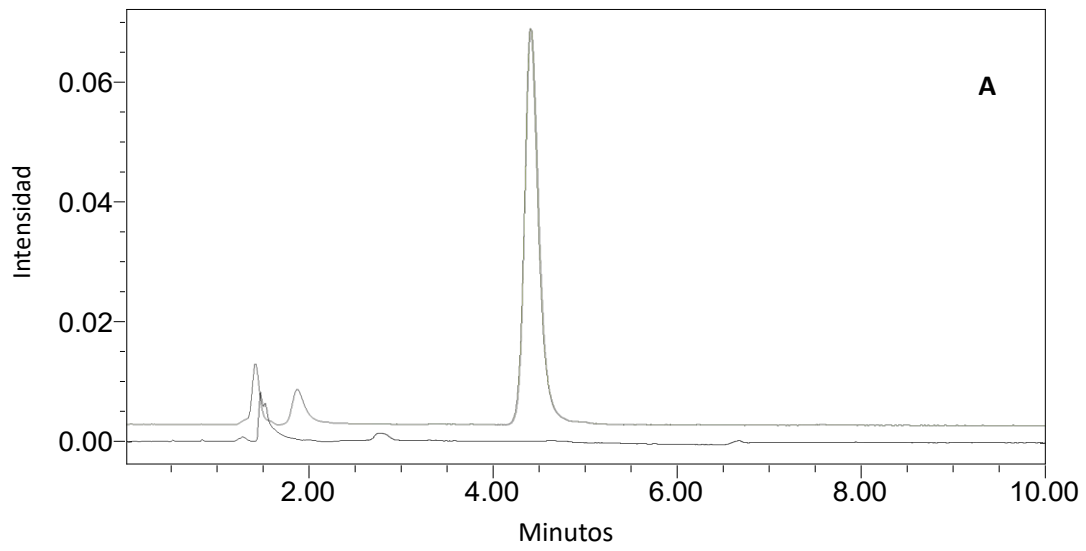
Los resultados detallados de la validación del método para los ensayos de permeabilidad de QPZ se encuentran en el Anexo I, en el Anexo II se encuentran los resultados detallados de la validación del método en muestras de plasma y de fracción hepática para la cuantificación de QPZ.

Tabla 4. Resultados de la validación del método para la cuantificación de QPZ en muestras de ensayo de permeabilidad

Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado	Cumple
Adecuabilidad	% CV ≤ 6 %	% CV Tiempo: 2.01 %	✓
		% CV Área: 5.4 %	✓
		% CV Altura: 0.85 %	✓
Intervalo lineal	a) Comportamiento lineal		✓
	b) Comportamiento aleatorio en gráfico de residuales		✓
Intervalo de trabajo	m ≥ 1.0	Y = 1.241x10 ⁷ (X) – 63623	✓
	R ² ≥ 0.98	0.9997	✓
Límite de cuantificación	LC ≤ 0.02 mM	0.014 mM	✓
Recuperación	70 – 120 %	0.6 mM: 99.83 – 100.33 %	✓
		0.2 mM: 100.0 – 100.5 %	✓
		0.066 mM: 93.94 – 104.54 %	✓
		0.022 mM: 97.27 – 97.72 %	✓
		0.007 mM: 111.42 – 115.71 %	✓
Repetibilidad	CV _r ≤ 20 %	0.6 mM: 0.2 %	✓
		0.066 mM: 4.7 %	✓
		0.007 mM: 1.57 %	✓
Reproducibilidad	CV _R ≤ 32 %	4.30 %	✓
Selectividad	No se observan señales en el tiempo de retención de QPZ		✓

Tabla 5. Resultados de la validación del método para la cuantificación de QPZ en muestras de plasma sanguíneo y de fracción hepática de rata

Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado	Cumple
Adecuabilidad	% CV ≤ 6 %	% CV Tiempo: 2.01 %	✓
		% CV Área: 5.4 %	✓
		% CV Altura: 0.85 %	✓
Intervalo lineal	a) Comportamiento lineal		✓
	b) Comportamiento aleatorio en gráfico de residuales		✓
Intervalo de trabajo	m ≥ 1.0	Y = 7028 (X) – 919.9	✓
	R ² ≥ 0.98	0.9942	✓
Límite de cuantificación	LC ≤ 2.0 µg/mL	1.78 µg/mL	✓
Recuperación	70 – 120 %	20 µg/mL: 92.20 – 101.09 %	✓
		10 µg/mL: 87.65 – 97.29 %	✓
		5 µg/mL: 85.37 – 100.39 %	✓
		2 µg/mL : 78.83 – 89.70 %	✓
		1 µg/mL: 97.03 – 101.78 %	✓
		0.5 µg/mL: 95.38 – 116.36 %	✓
Repetibilidad	CV _r ≤ 20 %	20 µg/mL: 3.81 %	✓
		10 µg/mL: 4.68 %	✓
		1 µg/mL: 5.16 %	✓
Reproducibilidad	CV _R ≤ 32 %	5.15 %	✓
Selectividad	No se observan señales en el tiempo de retención de QPZ		✓



naranja QPZ metabolizada). C) En plasma para estudios de farmacocinética

Las Tablas 6 y 7 resumen los resultados obtenidos en los parámetros evaluados en la validación de los métodos para TR3370, en los Anexos III y IV se encuentran los resultados detallados de los mismos.

Tabla 6. Resultados de la validación del método para la cuantificación de TR3370 en muestras de ensayo de permeabilidad

Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado	Cumple
Adecuabilidad	% CV ≤ 6 %	% CV Tiempo: 2.4 % % CV Área: 2.9 % % CV Altura: 4.8 %	✓ ✓ ✓
Intervalo lineal	a) Comportamiento lineal b) Comportamiento aleatorio en gráfico de residuales		✓ ✓
Intervalo de trabajo	m ≥ 1.0 R ² ≥ 0.98	Y = 1.79x10 ⁷ (X) – 122079 0.9972	✓ ✓
Límite de cuantificación	LC ≤ 0.2 mM	0.041 mM	✓
Recuperación	70 – 120 %	0.6 mM: 100.41 – 100.48 % 0.2 mM: 88.15 – 89.40 % 0.066 mM: 110.61 – 112.12 % 0.022 mM: 109.09 – 104.54 % 0.007 mM: 164.77 – 169.14 %	✓ ✓ ✓ ✓ X
Repetibilidad	CV _r ≤ 20 %	0.6 mM: 0.03 % 0.066 mM: 0.64 % 0.022 mM: 1.99 %	✓ ✓ ✓
Reproducibilidad	CV _R ≤ 32 %	3.96 %	✓
Selectividad	No se observan señales en el tiempo de retención de TR3370		✓

Tabla 7. Resultados de la validación del método para la cuantificación de TR3370 en muestras de plasma sanguíneo y de fracción hepática de rata

Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado	Cumple
Adecuabilidad	% CV ≤ 6 %	% CV Tiempo: 2.4 % % CV Área: 2.9 % % CV Altura: 4.8 %	✓ ✓ ✓
Intervalo lineal	Comportamiento lineal Comportamiento aleatorio en gráfico de residuales		✓ ✓
Intervalo de trabajo	m ≥ 1.0 R ² ≥ 0.98	Y = 14325 (X) +493 0.9948	✓ ✓
Límite de cuantificación	LC ≤ 2.0 µg/mL	1.69 µg/mL	✓
Recuperación	70 – 120 %	20 µg/mL: 93.35 – 101.6 % 10 µg/mL: 92.10 – 101.9 % 5 µg/mL: 88.2 – 93.2 % 2 µg/mL : 103.5 – 112.0 % 1 µg/mL: 110.0 – 114.0 % 0.5 µg/mL: 105.3 – 122.0 %	✓ ✓ ✓ ✓ ✓ X
Repetibilidad	CV _r ≤ 20 %	20 µg/mL: 4.05 % 10 µg/mL: 4.17 % 1 µg/mL: 1.53 %	✓ ✓ ✓
Reproducibilidad	CV _R ≤ 32 %	6.69 %	✓
Selectividad	No se observan señales en el tiempo de retención de TR3370		✓

La Figura 8 muestra cromatogramas de TR3370 en las muestras, notándose la ausencia de señales que interfieran con la respuesta del analito.

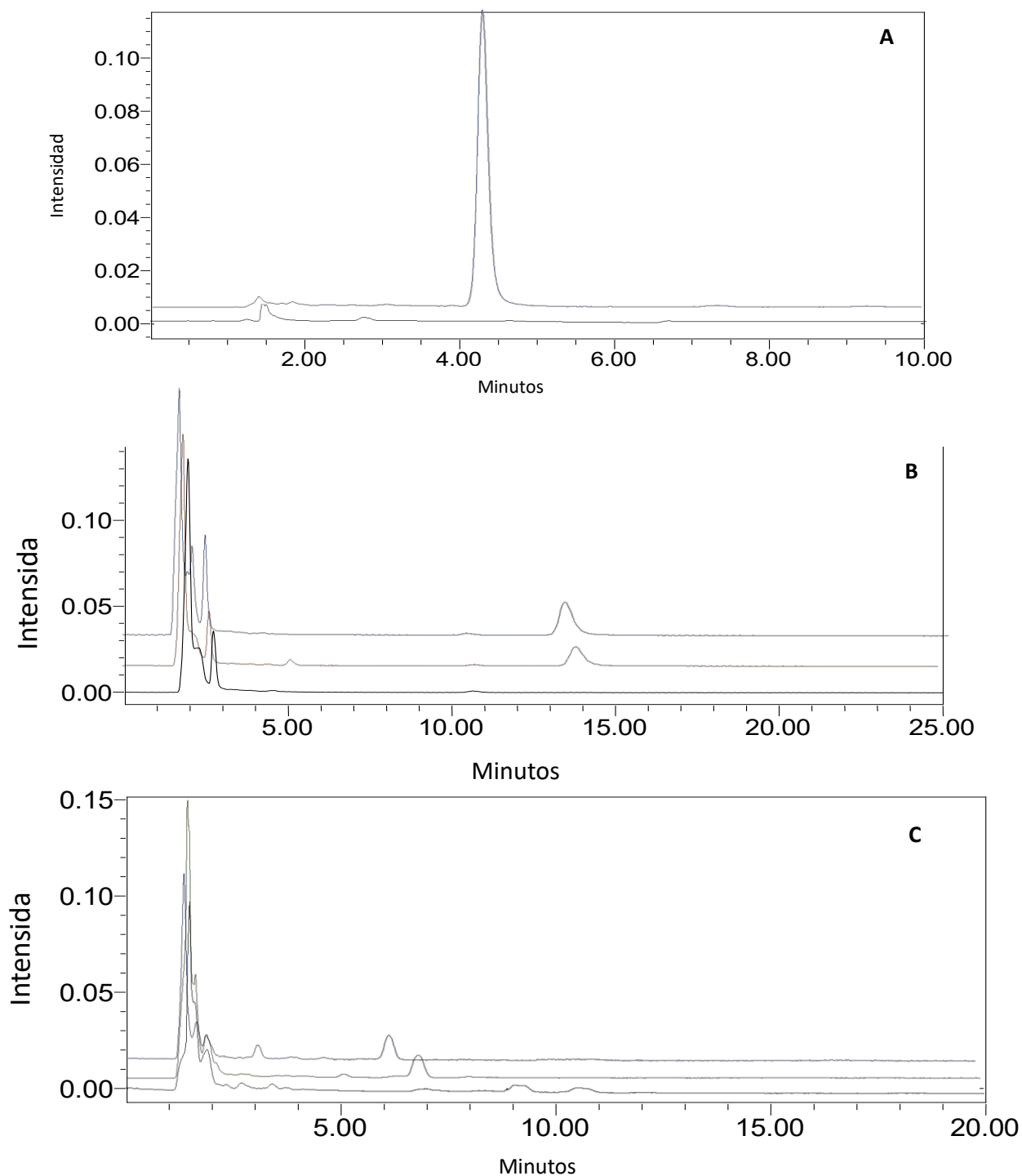


Figura 8. A) Cromatogramas de TR3370 en ensayo de permeabilidad, en azul TR3370. B) Cromatogramas de TR3370 en ensayos de biotransformación (en naranja TR3370 metabolizado, en azul sin metabolizar). C) En plasma para estudios de farmacocinética a pH 4.5 (En naranja muestra de QPZ en plasma, en azul TR3370 en plasma). Los cromatogramas en color negro corresponden a los blancos.

7.4 Ensayos de permeabilidad intestinal *in vitro*

Los coeficientes de permeabilidad (K_p) de QPZ y de TR3370 fueron calculados, observándose que el valor de este parámetro para TR3370 es aproximadamente tres veces mayor que el determinado para QPZ. Lo anterior indica que TR3370 presenta una mayor permeabilidad intestinal que QPZ.

A partir de los datos obtenidos en los ensayos de permeabilidad con el segmento intestinal de rata se construyeron las curvas de concentración acumulada de compuesto (QPZ o TR3370) en el compartimento receptor, las cuales se muestran en la Figura 9. De acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.1.3 se determinó si los datos obtenidos de estos experimento eran heteroscedásticos con la finalidad de determinar el mejor modelo de ajuste. Determinarse que los datos no son homosceásticos La evaluación de los diferentes factores de peso mostró que factor $1/x$ presentó un mejor ajuste de las rectas.

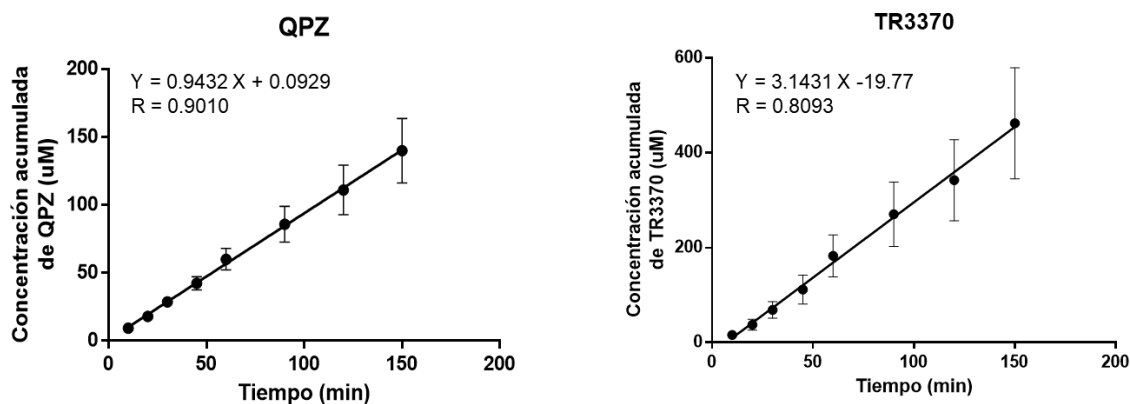


Figura 9. Gráficas de concentración acumulada de QPZ y TR3370 en el ensayo de permeabilidad, se muestran promedios ($n=6$) con su correspondiente Error Estándar de la Media (EEM). En la parte superior se presentan la ecuaciones ajustadas con el factor de peso $1/x$.

Cálculo de K_p para QPZ se muestra media \pm EEM ($n=6$):

$$K_p = \frac{5 \text{ cm}^3}{60 (0.07854 \text{ cm}^2) (1214.5 \text{ } \mu\text{M})} * 0.9432 \text{ } \mu\text{M}/\text{min} = 8.14 \times 10^{-4} \pm 1.52 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$$

Cálculo de K_p para TR3370 se muestra media \pm EEM ($n=6$):

$$K_p = \frac{5 \text{ cm}^3}{60 (0.07854 \text{ cm}^2) (1361.5 \text{ } \mu\text{M})} * 3.1431 \text{ } \mu\text{M}/\text{min} = 24.8 \times 10^{-4} \pm 7.49 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$$

7.5 Ensayo de biotransformación de QPZ y TR3370 en fracción S9 de hígado de rata

Previo a la realización de los ensayos de biotransformación, la viabilidad de la fracción hepática se determinó mediante la biotransformación de bencilamina (una molécula de referencia). La biotransformación se lleva a cabo por la enzima monoaminooxidasa (MAO), la cual transforma a esta molécula a benzaldehído. Empleando cromatografía de líquidos de alta resolución se determinó el grado de consumo de bencilamina. Los resultados obtenidos de la disminución de este xenobiótico indicaron, en primera instancia, que los preparados presentaban condiciones adecuadas de actividad metabólica, mientras que por otra parte, se determinó la disminución de aproximadamente un 25% de la bencilamina inicial. La determinación del consumo de esta molécula se realizó comparando el área de respuesta de los ensayos metabólicos de bencilamina con la respuesta generada por muestras de bencilamina sin metabolizar, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Área bajo la curva de respuesta de bencilamina en ensayos de viabilidad de Fracción S9.

Bencilamina sin metabolizar	Bencilamina metabolizada	% Remanente de bencilamina
485723	309922	63.8
539002	458744	85.1
524199	371677	70.9
418868	318435	76.0
527818	395078	74.8
567076	415683	73.3

Los resultados obtenidos de los ensayos con bencilamina indican que la fracción S9 se encontraba viable y activa, por lo que se podía proseguir con los estudios de biotransformación para QPZ y TR3370.

7.5.1 Ensayos cuantitativos de biotransformación

Los primeros ensayos de biotransformación que se realizaron mostraron que a partir de las primeras 2 h de experimentación existe una diferencia significativa entre la cantidad inicial de QPZ o TR3370 y la cantidad remanente de los mismos. Los ensayos cinéticos, por otra parte, mostraron que después de 4 h se consume aproximadamente un 40% de ambas sustancias.

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos de los ensayos cuantitativos de biotransformación. La Figura 10A muestra la cantidad remanente de los compuestos de origen a las dos horas de iniciado el experimento. Las Figuras 10B y 10C indican la cantidad remanente de QPZ y TR3370, respectivamente, a lo largo de 4 h de experimento.

7.5.2 Ensayos cualitativos de biotransformación

Por medio de la identificación de los iones moleculares $(M+H)^+$ de las moléculas de origen y de los posibles metabolitos de QPZ y TR3370, fue posible plantear las posibles rutas metabólicas que siguen estas moléculas en el hígado. Los resultados indican la participación de procesos oxidativos sobre las porciones quinolónicas de las moléculas, así como la desalquilación de las porciones en piperazina de las mismas. En el caso de TR3370 se detectó la pérdida de la porción hidroxietilada de la molécula, dando lugar a la formación de QPZ.

La corriente iónica total generada de la muestra de QPZ correspondiente a 2 h se muestra en la Figura 11. Empleando el software mencionado (*TOF MS Driver 6.2*) fue posible detectar los pesos moleculares de los posibles metabolitos presentes en la muestra y posteriormente evaluar por medio de algoritmos matemáticos, la probabilidad de que la identidad química de la señal m/z corresponda al metabolito de interés. Este procedimiento se ejemplifica en la Figura 11, mismo que se repitió para cada muestra (0, 1, 2, 3 y 4 h) para ambas sustancias, buscando todos los metabolitos probables.

A partir de los datos generados se construyeron las posibles rutas metabólicas a las que son sometidos QPZ y TR3370 por las fracciones hepáticas. La Figura 12 corresponde a la posible ruta metabólica de QPZ, mientras que la Figura 13 indica la posible ruta metabólica de TR3370.

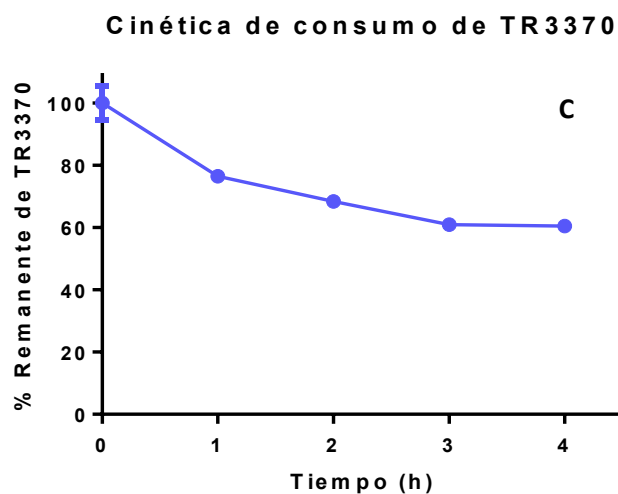
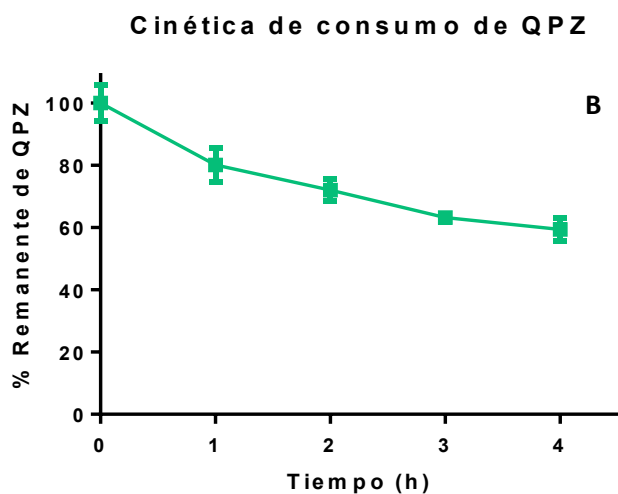
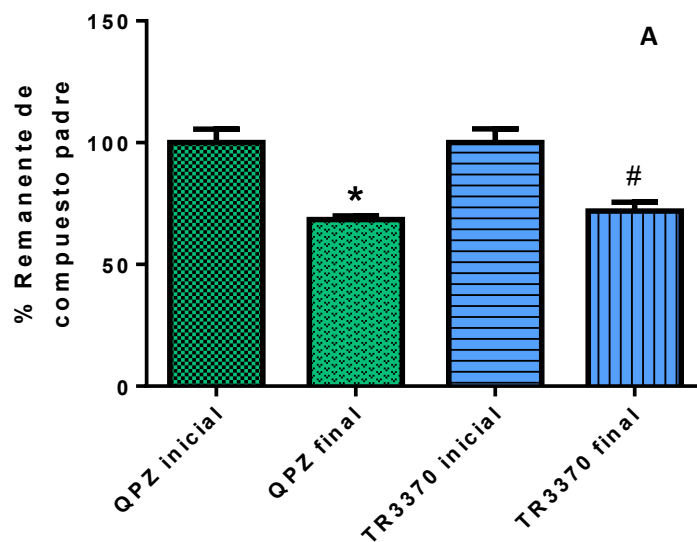
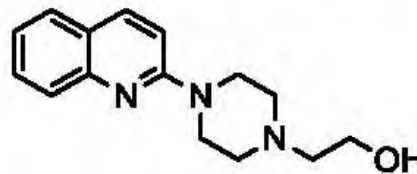
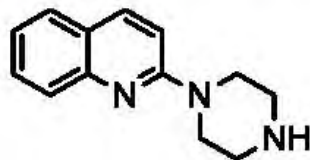
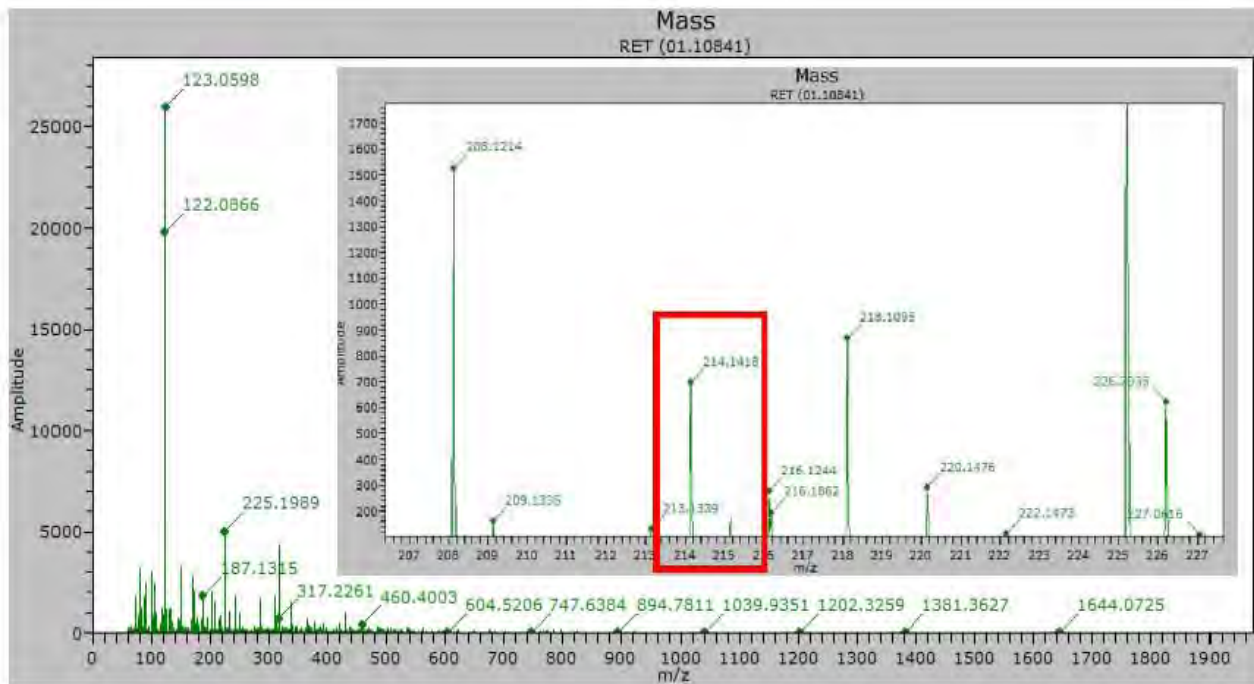


Figura 10. Resultado obtenidos de los ensayos metabólicos cuantitativos de QPZ y TR3370. A) Resultados del punto final a las dos horas. Se muestran los promedios de las determinaciones (n=6) con Error Estándar de la Media (EEM) * diferencia significativa vs QPZ inicial, $p < 0.05$, prueba t pareada; # diferencia significativa vs TR3370 inicial, $p < 0.05$, prueba t pareada. B) Cinética de consumo de QPZ en fracción hepática. C) Cinética de consumo de TR3370 en fracción hepática.



Candidates	Score	ppm-error	Details
C7H15N7O	0.984	-3.53	
C11H19NO3	0.973	9.07	
C8H15N9	0.972	49.2	
C7H19NO6	0.965	-62.5	
C10H17N2O3	0.964	-49.9	
C8H15N5O2	0.963	-66.2	
C14H17N2	0.957	21.6	
C13H15N3	0.956	-37.4	
C10H19N3O2	0.955	61.8	
C15H17O	0.952	-31.1	
C10H19N3S	0.951	-21.5	
C12H21O3	0.945	68.1	
C6H19N3O3S	0.928	-93.1	
C8H23NO5	0.924	108	
C15H19N	0.922	80.7	
C11H19NO5	0.921	-74.2	
C11H17O4	0.919	-103	
C14H15NO	0.918	-90.1	
C9H15N3O3	0.918	-109	
C5H11N9O	0.914	-122	
C9H19N5O	0.912	114	
C11H21N2O2	0.9	121	
C12H23NS	0.896	96.5	

Candidates	Score	ppm-error	Details
C12H23N3O5	0.936	-4.81	
C15H15N3O	0.907	-17.9	
C13H23NO4	0.906	20.6	
C14H19N5	0.871	25.3	
C10H19N5O3	0.844	-35.6	
C15H21N2O	0.83	51	
C11H23N5S	0.779	33.9	
C13H23NO2S	0.716	-48.5	
C12H23NO3	0.696	64.2	
C16H19NO2	0.679	-61.6	
C11H19N3O4	0.678	-71.2	
C12H19N7	0.674	-72	
C17H23NO	0.637	79.9	
C10H19N5O5	0.634	-10.3	
C14H27NO5	0.61	93	
C20H17	0.606	-94.9	

Figura 11. Proceso de identificación de metabolitos en muestras de Fracción S9 por medio de EM APCI. A partir de la TIC se identifica la señal correspondiente a $(M+H)^+$ del posible metabolito. Posteriormente se valora con la base de datos la puntuación (score) y el error del candidato.

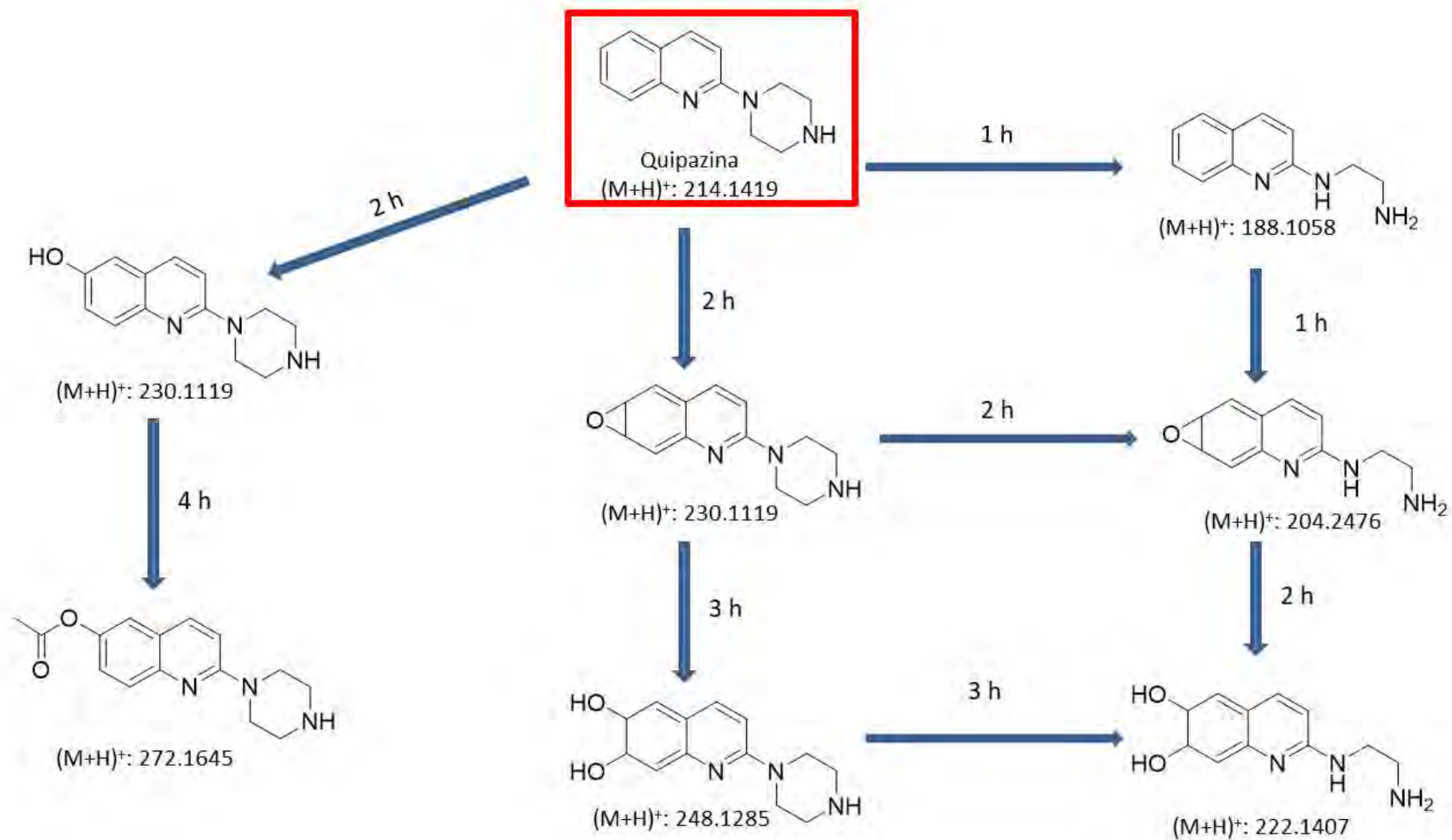


Figura 12. Posibles compuestos generados por el metabolismo de QPZ en fracción S9 de hígado de rata; basado en el análisis por espectrometría de masas de muestras de QPZ sometidas a biotransformación durante cuatro horas. Se muestran los valores detectados en la TIC como $(M+H)^+$.

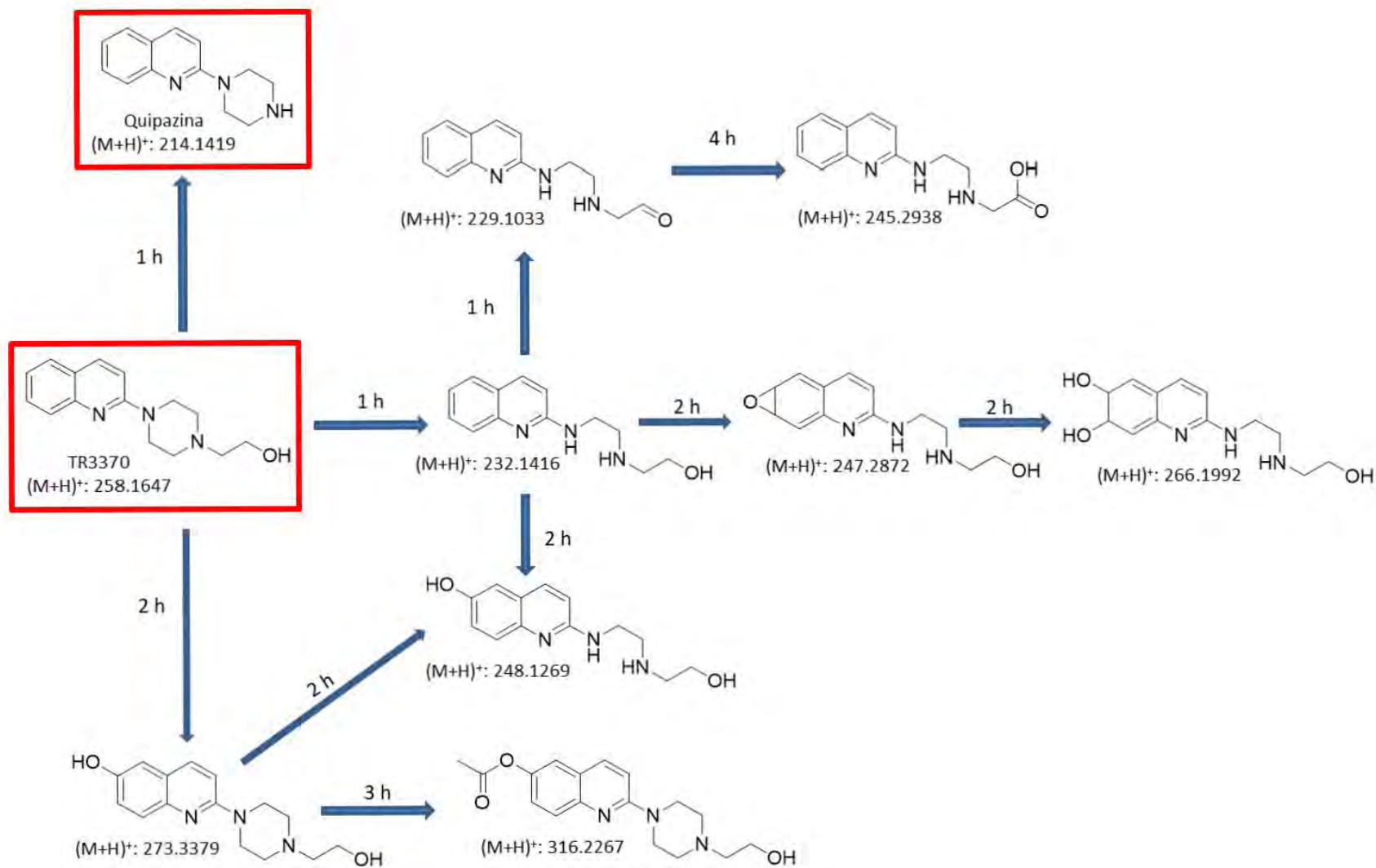


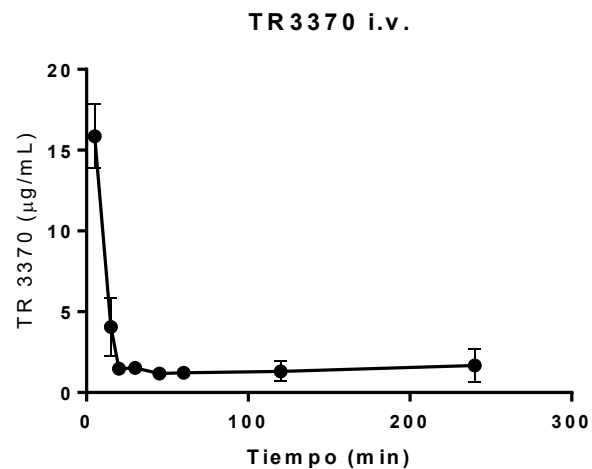
Figura 13. Posibles compuestos generados por el metabolismo de TR3370 en fracción S9 de hígado de rata; basado en el análisis por espectrometría de masas de muestras de TR3370 sometidas a biotransformación durante cuatro horas.. Se muestran los valores detectados en la TIC como (M+H)⁺.

7.6 Estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratas Wistar

El método analítico desarrollado y validado anteriormente fue empleado para la cuantificación de QPZ y de TR3370 en muestras sanguíneas de rata para estudios farmacocinéticos. En la Tabla 9 se encuentran los valores promedios de cada tiempo de muestreo con su correspondiente error estándar de la media (EEM) para los resultados de ambas administraciones (i.p. y p.o.). Posteriormente los perfiles farmacocinéticos de QPZ y de TR3370 se obtuvieron para las dos vías de administración empleadas (Figura 14). En el caso de las administraciones intravasculares se observa un rápido descenso en las concentraciones plasmáticas de ambas sustancias, siendo más evidente para el caso de TR3370, el cual, en la mayoría de los animales de estudio, no se detectó en plasma 4 h después de la administración, a diferencia de QPZ cuya detección se logró hasta las 6 h. En el caso de las administraciones orales, se observa que los procesos de absorción son muy similares para ambos tratamientos, así como el tiempo en el que se alcanzan las concentraciones máximas. Gráficamente se observa que la disminución en las concentraciones plasmáticas de TR3370, tras una administración oral, es mayor que la de QPZ en la misma vía de administración; este fenómeno se observa también en las administraciones intravasculares.

Tabla 9. Valores plasmáticos promedio \pm EEM en los diferentes tiempos de muestreo de QPZ y TR3370 en los ensayos farmacocinéticos (n=6).

Tiempo (minutos)	Concentración plasmática ($\mu\text{g}/\text{ML}$)			
	Administración intravascular		Administración oral	
	Quipazina	TR3370	Quipazina	TR3370
5	23.45 \pm 4.80	15.86 \pm 1.97	12.41 \pm 4.59	1.60 \pm 0.35
10	---	---	15.44 \pm 4.25	2.84 \pm 1.25
15	11.82 \pm 3.41	4.07 \pm 1.63	15.76 \pm 8.69	3.79 \pm 1.93
20	---	1.48 \pm 0.31	18.65 \pm 5.12	4.51 \pm 1.76
30	10.85 \pm 3.19	1.52 \pm 0.27	23.43 \pm 10.25	5.69 \pm 2.65
45	8.51 \pm 3.04	1.18 \pm 0.23	28.30 \pm 12.79	6.74 \pm 3.23
60	7.17 \pm 2.81	1.23 \pm 0.16	22.91 \pm 12.73	8.40 \pm 2.81
120	6.43 \pm 2.76	1.31 \pm 0.57	20.93 \pm 13.97	2.90 \pm 1.05
180	4.78 \pm 1.93	---	16.67 \pm 10.41	1.93 \pm 1.00
240	2.34 \pm 0.95	1.68 \pm 0.74	9.81 \pm 7.07	1.74 \pm 0.67
300	1.65 \pm 0.91	---	4.05 \pm 1.52	1.12 \pm 0.31
360	1.28 \pm 0.71	---	2.39 \pm 0.99	1.08 \pm 0.51



TR3370 p.o.

Figura 14. Perfiles farmacocinéticos de QPZ y TR3370 en plasma de rata. Se muestran promedios \pm EEM (n=6).

En la Tabla 10, se presentan los resultados de los parámetros farmacocinéticos determinados para QPZ y TR3370 en las dos vías de administración evaluadas. Los parámetros mencionados corresponden a la constante de eliminación (k_{el}), área bajo la curva de cero a infinito (ABC_0^∞), tiempo medio de residencia (TMR), concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo en que se alcanza la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$), constante de absorción (k_a) y fracción de dosis absorbida (F).

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos promedio \pm EEM de QPZ y TR3370 (n=6).

Parámetro	Administración intravascular		Administración oral	
	Quipazina	TR3370	Quipazina	TR3370
k_{el} (h^{-1})	$0.50 \pm 0.06^*$	1.03 ± 0.38	$0.54 \pm 0.08^*$	0.70 ± 0.11
ABC_0^∞ (μg h/mL)	$33.17 \pm 12.71^*$	16.12 ± 4.73	$29.09 \pm 10.89^*$	7.32 ± 1.91
TMR (h)	2.30 ± 0.34	1.55 ± 0.34	2.47 ± 0.27	1.93 ± 0.25
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu g/mL$)	---	---	$28.30 \pm 12.79^*$	8.40 ± 2.81
t_{max} (h)	---	---	1.12 ± 0.16	0.69 ± 0.09
k_a (h^{-1})	---	---	2.40 ± 0.37	2.18 ± 0.64
F	---	---	0.87	0.45

Donde * indica diferencia significativa de TR3370 vs QPZ ($p < 0.05$), aplicando una prueba estadística t de Student,.

7.7 Monitorización de los niveles de glucosa

De manera general, y contrario a lo esperado, los niveles de glucosa en sangre presentaron un aumento considerable, mismo que en la mayoría de los casos se mantuvo hasta los tiempos finales del experimento.

En la Figura 15 se muestran los cursos temporales de los niveles de glucosa de las muestras sanguíneas recolectadas para los ensayos farmacocinéticos. El valor de ABC para los mismos se muestra en la Figura 16, donde se puede apreciar una diferencia significativa para el caso de QPZ en su administración intravascular. Cabe destacar que la administración oral de QPZ, así como ambas administraciones de TR3370 no presentaron un aumento significativo de los niveles de glucosa en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

Por otra parte, para cada individuo se construyeron las gráficas comparativas entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ y de TR3370 en los estudios farmacocinéticos, las cuales se encuentran en el anexo V.

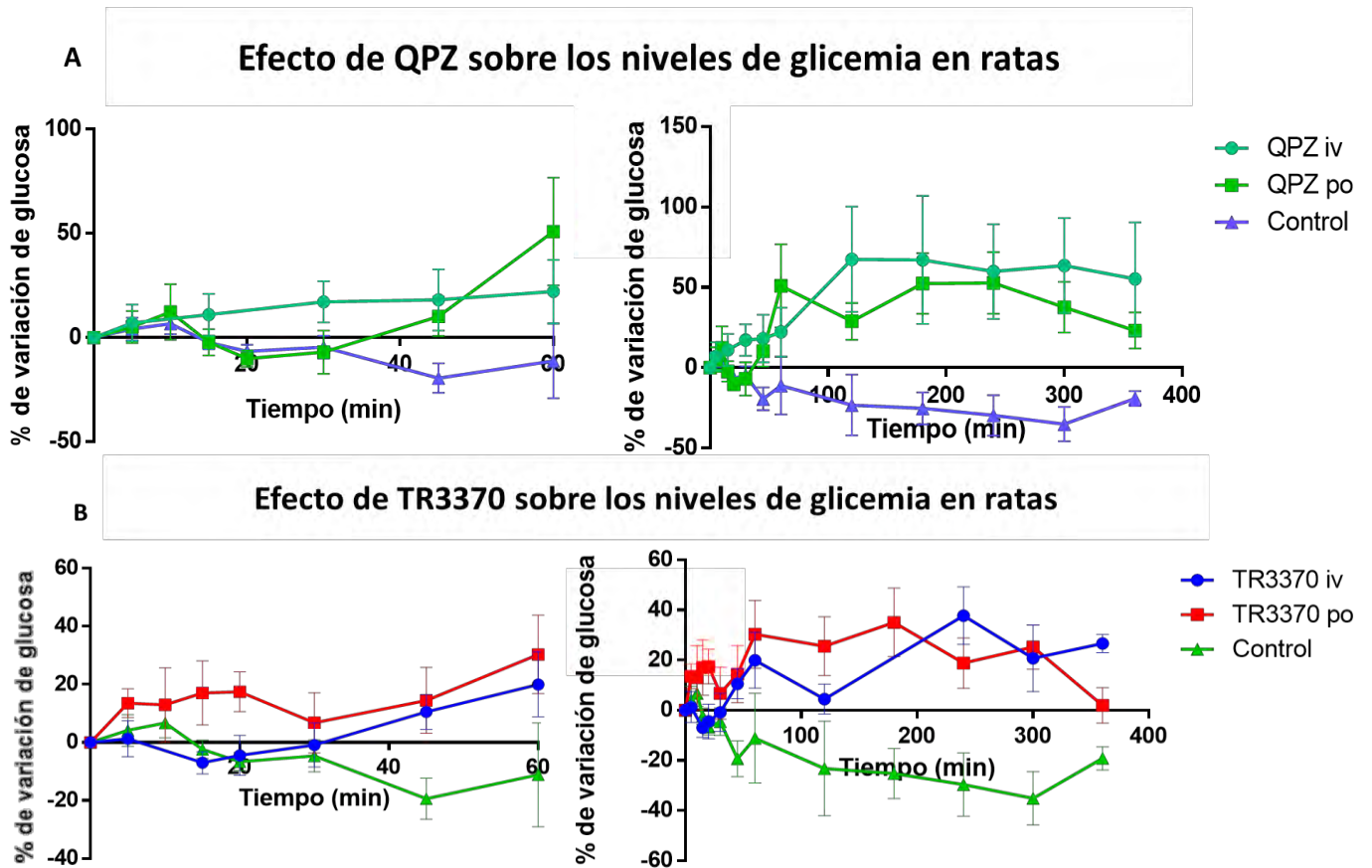


Figura 15. Curso temporales de los niveles de glicemia en los estudios farmacocinéticos. Se muestran los resultados como el valor promedio \pm EEM del porcentaje de variación de glucosa (n=6). Las gráficas de la izquierda muestran el cambio en los niveles de glucosa durante los primeros 60 minutos; las gráficas de la derecha el cambio en la glicemia a lo largo de todo el experimento (6 h).

Efecto de QPZ y TR3370 sobre los Niveles de Glucosa en Sangre

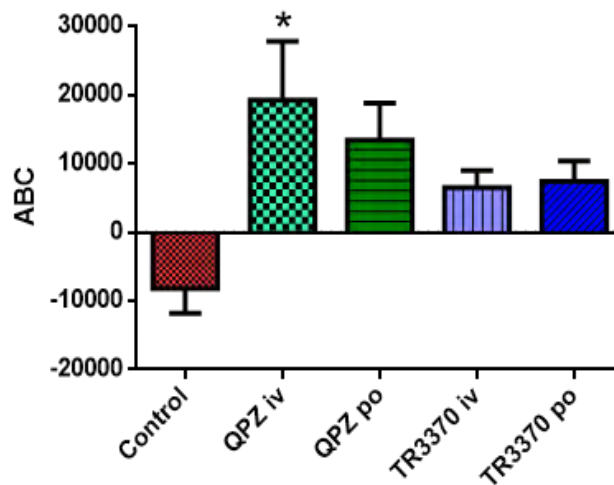


Figura 16. Área bajo la curva de cursos temporales de niveles de glicemia en ratas. Se muestra promedio \pm EEM (n=6). * diferencia Significativa vs Control (p<0.05, ANOVA, post-hoc Dunnet).

7.8 Estudios de relación Farmacocinética/Farmacodinamia

A partir de la correlación de los resultados de la monitorización de los niveles de glucosa y de las concentraciones plasmáticas de QPZ y TR3370 se construyeron las asas de histéresis que se muestran en la Figura 17. Los resultados indican que las asas de las administraciones intravasculares tienen una dirección a favor de las manecillas del reloj, mientras que las administraciones orales muestran un comportamiento opuesto, con asas en sentido contrario a las manecillas del reloj. Las asas de histéresis individuales se encuentran en el anexo VI.

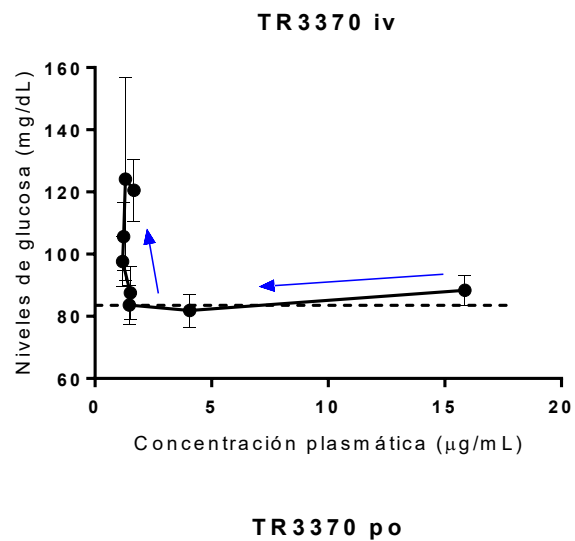


Figura 17. Asas de histéresis entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ y TR3370 después de una administración intravenosa y oral. La línea punteada indica los niveles basales de glicemia.

7.9 Perfil neurofarmacológico

Los resultados obtenidos del perfil neurofarmacológico indican que ninguna de las dosis evaluadas de QPZ produjo efecto sobre la coordinación motora de los animales. Por el contrario, la dosis de TR3370 de 3 mg/kg mostró una diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo control. La prueba de cilindro de exploración presentó un aumento en el número de levantamientos en todas las dosis de QPZ y en la dosis de 10 mg/kg de TR3370, mientras que en la prueba de tablero de hoyos se mostró un aumento en el número de exploraciones en la dosis de 10 mg/kg de QPZ; estos resultados se relacionan directamente con la actividad ansiogénica de las moléculas. En la evaluación de la actividad motora se observó una disminución en la cantidad de movimientos rápidos estereotipados para ambos compuestos. Por último, los niveles entre los animales tratados no mostró diferencia significativa con respecto al grupo control, sin embargo, tampoco presentó un aumento como en el caso de las muestras de los perfiles farmacocinéticos.

Los datos obtenidos de las diferentes evaluaciones realizadas se muestran en la Figura 18. La Figura 18A representa el área bajo la curva del curso temporal de permanencia en el vástago de los ratones sobre el Rotarod. La Figura 18B indica el número de levantamientos que presenaron los ratones en el interior del cilindro de exploración. La Figura 18C muestra el número de agujeros por los cuales el ratón introdujo la cabeza. La Figura 18D representa la variación de los niveles de glicemia que tenían los ratones al terminar las evaluaciones del perfil neurofarmacológico.

Por otra parte, la Figura 19 representa los datos obtenidos en la evaluación de la actividad motora en el actímetro, de forma que se pudieron construir cuatro gráficas que representan los movimientos rápidos y lentos tanto estereoripados como no estereotipados para QPZ y TR3370.

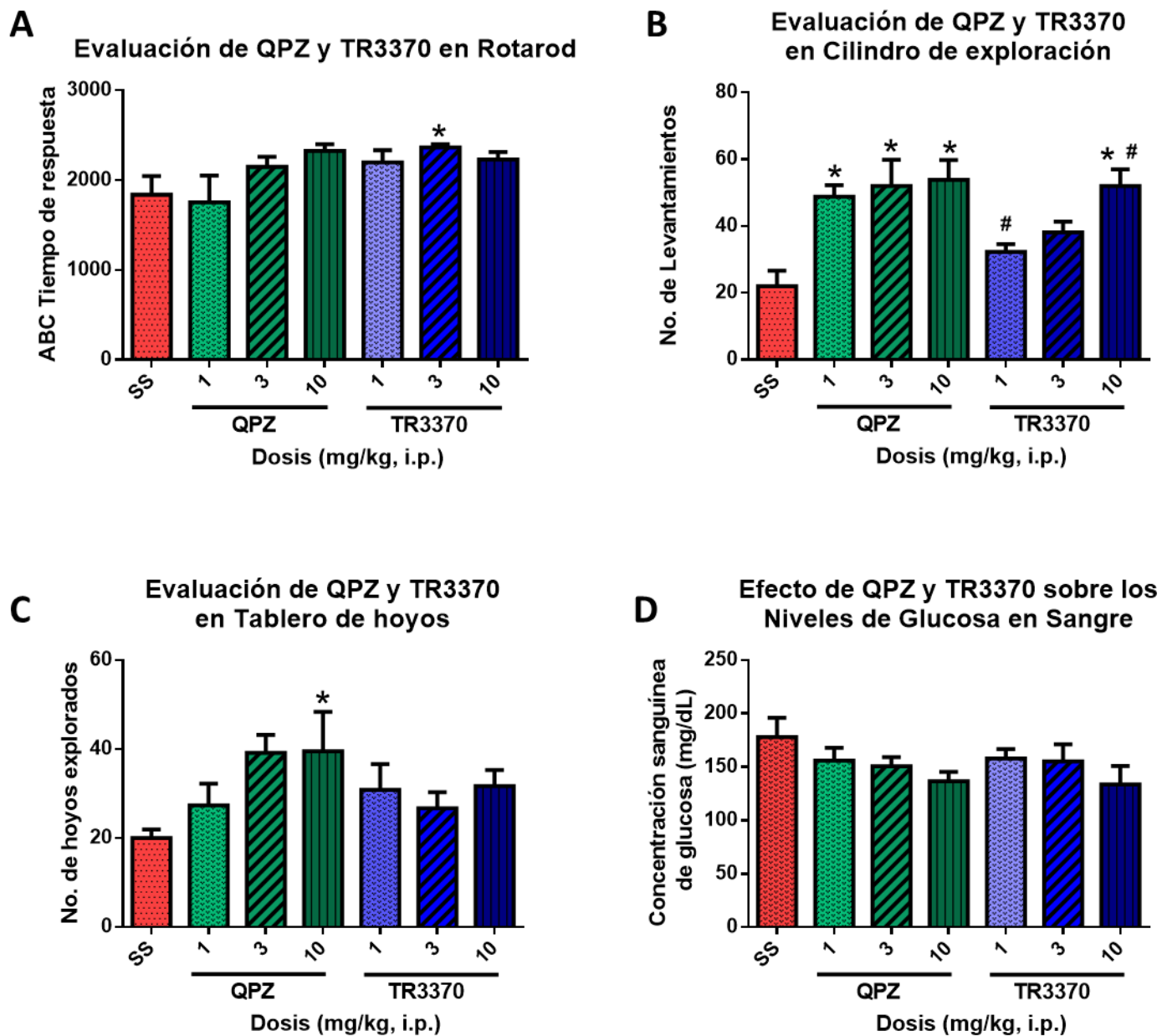


Figura 18. Resultados del perfil neurofarmacológico de QPZ y de TR3370, se muestran valores promedio \pm EEM (n = 6). A) Evaluación de coordinación motora en Rotarod (* $p < 0.05$ vs SS, ANOVA, post-hoc Tukey). B) Evaluación de la actividad exploratoria (* $p < 0.05$ vs SS; # $p < 0.05$ vs TR 1 mg/kg, ANOVA, post-hoc Tukey). C) Evaluación de la actividad ansiogénica en tablero de hoyos (* $p < 0.05$ vs SS, ANOVA, post-hoc Tukey). D) Efecto del tratamiento sobre los niveles de glucosa.

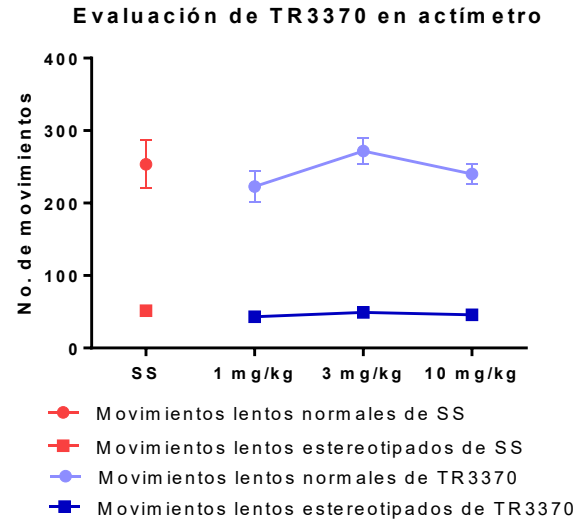


Figura 19. Resultados de la evaluación de QPZ y de TR3370 sobre la actividad motora, se muestran valores promedio \pm EEM ($n = 6$), * $p < 0.05$ vs SS, ANOVA, post-hoc Tukey para movimientos rápidos estereotipados, # $p < 0.05$ vs SS, ANOVA, post-hoc Tukey para movimientos rápidos normales.

8. Discusión

Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron establecer algunos aspectos farmacológicos de QPZ y TR3370. Los perfiles farmacocinéticos de ambas sustancias, los cuales se desconocían hasta este momento, mostraron una gran similitud en algunos parámetros. A pesar de que TR3370 demostró tener una permeabilidad aproximadamente tres veces mayor en los estudios *in vitro*, los parámetros farmacocinéticos relacionados con la absorción ($C_{m\acute{a}x}$, $t_{m\acute{a}x}$ y F) no reflejaron del todo esta propiedad del compuesto, situación que se puede atribuir al efecto de primer paso que presenta esta molécula. La evidencia obtenida de la biotransformación de la QPZ y el TR3370 indica que las moléculas presentan una biotransformación similar y que el compuesto TR3370 puede metabolizarse a QPZ aunque no en cantidades considerables. Los niveles de glicemia determinados a lo largo de los ensayos farmacocinéticos muestran un aumento en los niveles de glucosa, efecto que no puede ser explicado únicamente tomando como referencia la capacidad de inducción de la secreción de insulina de estas moléculas. La correlación de estos resultados con los niveles plasmáticos de los tratamientos permitió la formación de asas de histéresis a favor de las manecillas del reloj para las administraciones intravasculares de ambas sustancias, por otra parte, las administraciones orales de éstas presentaron asas en dirección contraria a las manecillas del reloj, lo que indica que existen diferencias en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos cuando se modifica la vía de administración de estas sustancias. La evaluación neurofarmacológica de estas quinolinas mostró una escasa actividad en la coordinación motora, un notorio efecto ansiogénico y de manera interesante, una reducción de los movimientos rápidos estereotipados en los animales de experimentación, indicando que los efectos ansiogénicos de estos compuestos se presentan de manera simultánea con los efectos hipoglucemiantes. Por último, se desarrollaron y validaron las metodologías analíticas por CLAE/UV que permitieron la cuantificación de QPZ y de TR3370 en las diferentes muestras generadas en los diferentes experimentos del proyecto.

8.1 Procesamiento de las muestras

Los recobros absolutos que fueron obtenidos para los analitos con la metodología implementada pueden considerarse adecuados. Por otra parte esta metodología reveló la presencia de una menor cantidad de interferencias provenientes de las muestras a comparación de otras, lo que llevó a la selección de la misma para el procesamiento de muestras.

8.2 Condiciones cromatográficas de análisis

La selección de la fase estacionaria se sustentó en que las columnas RESTEK Ultra Aqueous presentan grupos polares embebidos entre las cadenas de octadecilo. Lo anterior permite la retención por parte de las cadenas alifáticas por medio de interacciones hidrofóbicas y la interacción de tipo ion-dipolo entre los grupos polares de la fase estacionaria con los analitos cargados en la muestra. Para favorecer este segundo tipo de interacciones se sometió a la QPZ a un medio ácido, (pH 4.5), lo que permitió su ionización. La detección se realizó a 340 nm debido a que a esta longitud de onda, se encuentra uno de los máximos de absorción de la QPZ correspondientes a la porción estructural de la quinolina; si bien el otro máximo de absorción se encuentra a 244 nm y se obtiene una mayor respuesta de los analitos, es a 340 nm donde se minimizan las señales correspondientes a los componentes endógenos de la matriz y se obtiene también una respuesta adecuada y específica del analito.

Las condiciones cromatográficas para el TR3370 fueron muy similares a las de la QPZ. En lo que respecta a la fase móvil en el método de TR3370, ésta no contiene un modificador de pH como lo es el ácido fórmico, siendo esta la diferencia con respecto al método de QPZ. Durante el desarrollo del método se observó que, a pesar de la presencia de una cadena alifática de dos carbonos hidroxilada en TR3370, la separación de este compuesto y de la QPZ no era eficiente en la gran mayoría de las condiciones evaluadas. Dado que una de las principales hipótesis del proyecto es la generación de QPZ a partir de TR3370, resultó de gran importancia la separación de estos dos analitos, misma que sólo se consiguió cuando la fase móvil no contenía ácido fórmico, es decir, mantenía un valor de pH aproximado de 6.0 debido únicamente a la contribución del agua y de la sal del

buffer. La razón de que se lograra la separación puede deberse a la diferencia en los valores de log D (coeficiente de reparto a un valor de pH determinado)⁴⁰ de ambas moléculas cuando se someten a un medio con pH de valor cercano a 6, donde el de la QPZ es mayor al de TR3370, indicando una mayor retención en la fase estacionaria de la QPZ, situación que se refleja con un aumento en el tiempo de retención de la misma y la consiguiente separación de ambos analitos.

8.3 Validación del método analítico

De acuerdo con los resultados obtenidos de los diversos parámetros evaluados (Tablas 4 y 5) se puede decir que el método desarrollado para la cuantificación de QPZ es adecuado y confiable, ya que el desempeño mostrado en los diversos parámetros se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), la cual resalta en sus guías para la validación de métodos fisicoquímicos (Claves CCAYAC-p-58 y CCAYAC-CR-03/0) que los métodos no normalizados, es decir, métodos que no son publicados en instancias como la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), Normas Oficiales Mexicanas (NOM) o Normas Mexicanas (NMX), deben de presentar una adecuada sensibilidad y selectividad puesto que en primera instancia no tienen la misma robustez que un método normalizado.⁴¹

Con respecto a la evaluación de la selectividad, los cromatogramas mostrados en la Figura 7, muestran la ausencia de señales correspondientes a la matriz que interfieran en los tiempos de retención de QPZ, lo que permite considerar al método de análisis selectivo para QPZ en los ensayos de permeabilidad, biotransformación y farmacocinética. En el caso particular de los últimos dos fue importante descartar que posibles metabolitos presentes en las muestras y que pudieran tener un tiempo de retención similar al de los analitos de interés y esto dificultase la cuantificación de los mismos.

Por otra parte en las Tablas 6 y 7 se encuentran los resultados de las pruebas realizadas para la validación del método cromatográfico para la cuantificación de TR3370 en muestras de ensayos de permeabilidad, y en muestras de ensayos de biotransformación y farmacocinéticos, respectivamente. Se observa que en ambos

casos, la concentración más baja evaluada (0.007 mM para el ensayo de permeabilidad y 0.5 µg/mL para los ensayos de biotransformación y farmacocinética) no presenta un rango adecuado de recuperación, por lo que en caso de que las muestras presentaran concentraciones aproximadas a éstos valores, no serían consideradas para análisis posteriores. El resto de los parámetros evaluados para este método indican un adecuado desempeño del método en los demás niveles de concentraciones.

Los resultados de selectividad de los métodos para la cuantificación del TR3370 en las diferentes muestras (Figura 8) revelan la ausencia de interferencias provenientes de la matriz que pudieran interferir con la cuantificación de TR3370.

Para la evaluación de la robustez de los métodos se modificaron las variables de concentración del amortiguador y pH en la fase móvil, así como la temperatura de la columna. Tres concentraciones de formiato de amonio fueron evaluadas en la fase móvil las cuales fueron 5, 10 y 25 mM, después de realizar inyecciones por duplicado de las muestras se determinó de manera visual que no había diferencias importantes al analizar muestras con alguna de las concentraciones. Con respecto a la temperatura de la columna, se realizaron corridas con temperaturas de 25, 35 y 45 °C de las cuales fue notorio que ninguna de las mismas modificó el desempeño del método, por lo que se puede decir que la temperatura de la columna no es un factor relevante para el análisis cromatográfico. Por último, las variaciones de pH realizadas fueron de 3.5, 4.5, 5.0, 6.0 y 7.0, donde sólo para valores iguales o superiores a 6.0 fue posible obtener la separación de las señales correspondientes al TR3370 y a la QPZ; debido a lo anterior, para las muestras que potencialmente pudiesen contener ambas moléculas, el valor de óptimo pH se definió como 6.0, mientras que para aquellas que solo contuviesen una de las dos, el valor de pH se definió como 4.5 puesto que en los análisis donde se probaron las fases móviles con pH de 3.5, 4.5 y 5.0, las señales de los analitos no se modificaron de manera importante, y presentaban una elución más rápida.

Los resultados obtenidos de la validación de los métodos indican que para la QPZ, los métodos desarrollados pueden generar resultados confiables para la cuantificación de la misma en todos los niveles de concentración. Caso contrario

para el TR3370, donde los resultados muestran que en los niveles de concentración más bajos, el método no presenta niveles adecuados de recuperación, situación que debe ser tomada en cuenta en el procesamiento de los datos. La selectividad de los métodos fue adecuada para ambos analitos, ya que no se detectaron señales que interfiriesen en los tiempos de retención de los mismos. La evaluación de la robustez indica que el método tolera de manera adecuada cambios en la concentración del amortiguador y en la temperatura de la columna, pero los cambios en la acidez de la fase móvil interfieren con la separación de compuestos de interés en la muestra.

8.4 Ensayos de permeabilidad intestinal *in vitro*

Los resultados obtenidos indican que el TR3370 presenta una mayor permeabilidad intestinal que la QPZ. Esta diferencia podría ser atribuible a los valores del coeficiente de partición (Log P) de las moléculas, (QPZ 1.68, TR3370 1.65)⁴², sin embargo y debido a su similitud, los cambios en la permeabilidad pueden deberse a la participación de otros factores en este proceso. Dos factores importantes en los procesos de transporte de fármacos son la temperatura y el pH,⁴³ los cuales se comentarán a continuación.

Históricamente la difusión pasiva a través de una membrana de fosfolípidos fue sugerida como una ruta dominante. Sin embargo, en décadas pasadas, muchas proteínas acarreadoras (transportadores) han sido descubiertas como transportadores de varios fármacos. Existen más de 400 transportadores de membrana, y éstos pertenecen a dos superfamilias de transportadores: *ATP-binding cassette* (ABC) y *solute carrier* (SLC). Si el proceso de transporte consume energía (ATP) de manera directa o indirecta, se dice que es un transporte activo y no requiere de un gradiente de concentración del fármaco. La superfamilia ABC requiere de la unión e hidrólisis de ATP para funcionar, siendo este el transporte activo primario. Varios transportadores de la superfamilia SLC se conducen por medio de gradientes iónicos creados por transportadores primarios dependientes de ATP como la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa. Estos cotransportadores se dice que regulan el transporte activo secundario.⁴³ Se ha descrito que a temperaturas bajas (0-4°C) el consumo de energía es mínimo, lo que implica que también lo sean los

procesos de transporte activo, suponiéndose principalmente la participación del transporte pasivo. Sin embargo, el transporte pasivo también es altamente dependiente de la temperatura debido a que los coeficientes de partición/distribución y la permeabilidad transcelular pueden ser altamente influenciados por la temperatura.⁴⁴ Razón por la cual, durante el experimento fue requerido un control estricto de la temperatura en todo momento, minimizando así las fluctuaciones en los procesos de permeabilidad.

Con respecto a la influencia del pH, se ha visto que cambios en los valores del mismo pueden modificar la lipofilia de las moléculas (característica íntimamente ligada con la permeabilidad por medio de difusión pasiva). En este caso, el valor del pH en el medio (7.4) fue de gran impacto para el grado de ionización de las moléculas. Para la QPZ, el valor teórico de pK_a del átomo de hidrógeno unido al nitrógeno secundario de la molécula es de 8.8,⁴⁰ mientras que para el TR3370, esta posición se encuentra sustituida por la cadena de hidroxietilo, lo que ocasiona que el valor teórico de pK_a para esta posición sea de 7.5.⁴⁰ Si ambas moléculas son sometidas a un medio con un valor de pH de 7.4, la proporción ionizada de la QPZ es mucho mayor que la de TR3370 (96.17% de la QPZ ionizada contra 55.73% del TR3370 ionizado a pH de 7.4). Lo anterior indicaría que la difusión pasiva se encuentra favorecida para TR3370 bajo las condiciones mencionadas, explicando así la mayor permeabilidad de éste, siendo casi el triple con respecto a QPZ.

El proceso de difusión pasiva está condicionado principalmente por la liposolubilidad y el tamaño de las sustancias. Mientras mayor sea la liposolubilidad de una molécula, aumentará la velocidad de difusión. La liposolubilidad de una molécula está expresada por su coeficiente de partición (o distribución) lípido/agua. Todas estas características fisicoquímicas de las moléculas están indicadas en la ley de Fick, que describe la velocidad de difusión (ds/dt) de una molécula al cruzar una bicapa lipídica y se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{ds}{dt} = (A * D * \beta * [C_e - C_i]) \frac{1}{\Delta X}$$

Donde A es el área de la bicapa sobre la cual ocurrirá la difusión, ΔX es la distancia que debe recorrer a través de la bicapa la molécula que difunde, D es el

coeficiente de difusión de la molécula, β es el coeficiente de participación lípido/agua y $[C_e - C_i]$ es el gradiente de concentración.⁴⁵

Por otra parte, es necesario mencionar que los resultados obtenidos reflejan el valor de la constante de permeabilidad global, la cual, al tratarse de un tejido viable involucra tanto los procesos de difusión pasiva, como los mediados por transportadores. Como se observa en la Figura 20, el grado total de masa que atraviesa la membrana celular (dM/dt) es la suma del transporte pasivo (TP) y el transporte mediado por acarreadores (TMA) y puede ser descrito usando la ecuación de Michaelis-Menten. El transporte pasivo transcelular se encuentra en función del gradiente de concentración entre la membrana asumiendo que la concentración en el lado receptor es cero:

$$\frac{dM}{dt} = A * (P_{TP} + P_{TMA}) * C = A * P_{TP} * C + \frac{V_{max} * C}{K_m + C}$$

Donde A es el área superficial de la membrana; P es la permeabilidad; C es la concentración del fármaco; K_m es la constante de Michaelis y V_{max} es la velocidad máxima de transporte obtenida por acarreadores.⁴³

Se puede decir entonces que el método empleado permitió conocer de manera global el proceso de permeabilidad que presentan ambas moléculas mediante la determinación de la constante global de permeabilidad. Empleando otros modelos como PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay), partición en liposomas o BLM (Black Lipid Membrane) es posible determinar la contribución de la difusión pasiva al transporte neto de fármacos, los cuales, en conjunto con los ensayos de permeabilidad realizados en este proyecto o con otro tipo de ensayos de permeabilidad como los ensayos en líneas celulares CACO2, permitirían una mejor comprensión del proceso de permeabilidad intestinal de estos compuestos.

Es importante mencionar que esta metodología aun se encuentra en proceso de desarrollo en el grupo de trabajo, han sido evaluadas previamente algunas moléculas como cafeína o glucosa obteniéndose resultados de permeabilidad adecuados, sin embargo, aun es necesario evaluar el comportamiento de

marcadores de alta y de baja permeabilidad para tener completamente caracterizado el desempeño de este modelo *in vitro* en la evaluación de la permeabilidad de fármacos.

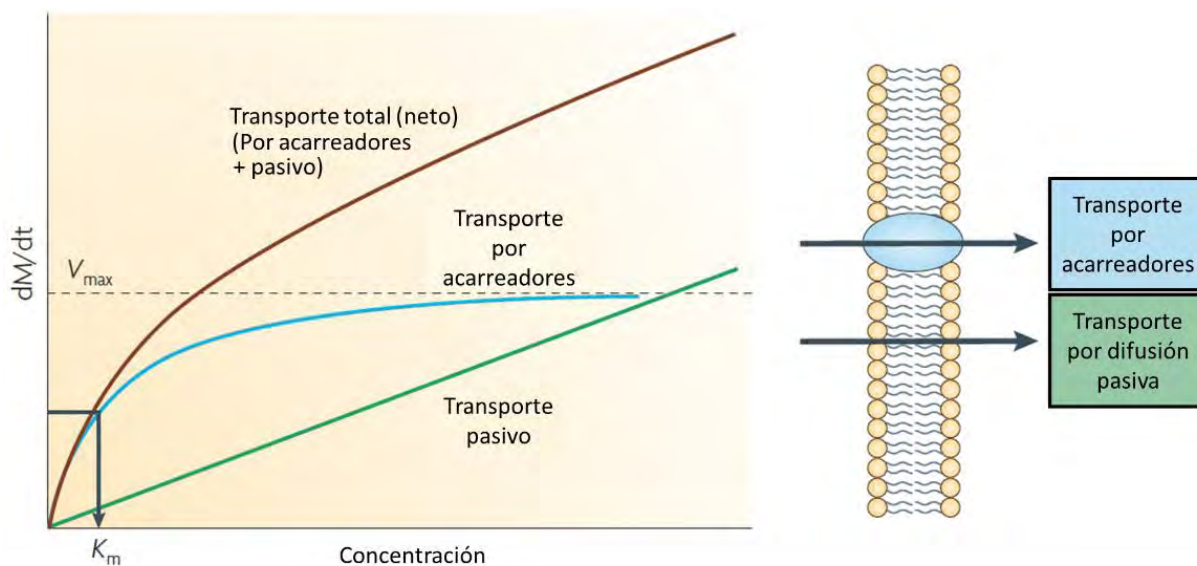


Figura 20. Procesos de transporte de fármacos a través de membranas biológicas. Se ha descrito que coexisten los procesos de transporte por acarreadores y la difusión pasiva de fármacos, presentando un comportamiento que puede ser descrito por la ecuación de Michaelis-Menten. (Adaptado de Sugano, K., 2010)

8.5 Ensayo de biotransformación de QPZ y TR3370 en fracción S9 de hígado de rata.

8.5.1 Ensayos cuantitativos de biotransformación

En la Figura 10 se presentaron los resultados obtenidos en los ensayos de biotransformación de las dos moléculas de interés. La gráfica 10A indica el porcentaje remanente de la QPZ y del TR3370 después de 2 h de inicio de la reacción, el análisis estadístico correspondiente indicó que a partir de este tiempo era notoria una diferencia significativa entre las concentraciones iniciales y las concentraciones remanentes. A partir de los resultados anteriores se decidió realizar ensayos monitorizando la desaparición del compuesto de origen cada hora hasta completar 4 h, obteniendo así la cinética de biotransformación para cada compuesto. En la gráfica 10B se encuentra la cinética de consumo de QPZ, mientras que en la 10C se observa la cinética de TR3370. Resulta interesante que las cinéticas de desaparición sean similares entre ambas moléculas, obteniéndose a

las cuatro horas un porcentaje similar, cercano al 60% de compuesto remanente en los ensayos.

Existen diversas condiciones experimentales en el uso de la fracción S9 que pueden impactar en los resultados obtenidos. Uno de ellos es el sistema de regeneración de NADPH, el cual se encuentra esquematizado en la Figura 21. Si bien este sistema provee de NADPH a la mezcla de reacción, cuando el cofactor glucosa-6-fosfato se termina por completo, no se pueden llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción implicadas para la regeneración de NADPH, la subsecuente reducción de la enzima NADPH-citocromo P450 reductasa y su posterior actividad en los procesos de oxidación de fármacos. Debido a esto, se puede decir que en las gráficas que muestran las cinéticas de desaparición de la QPZ y del TR3370 no solo se ven reflejados los procesos de biotransformación de estas moléculas, también indirectamente los procesos enzimáticos inherentes a la metodología de la fracción S9.

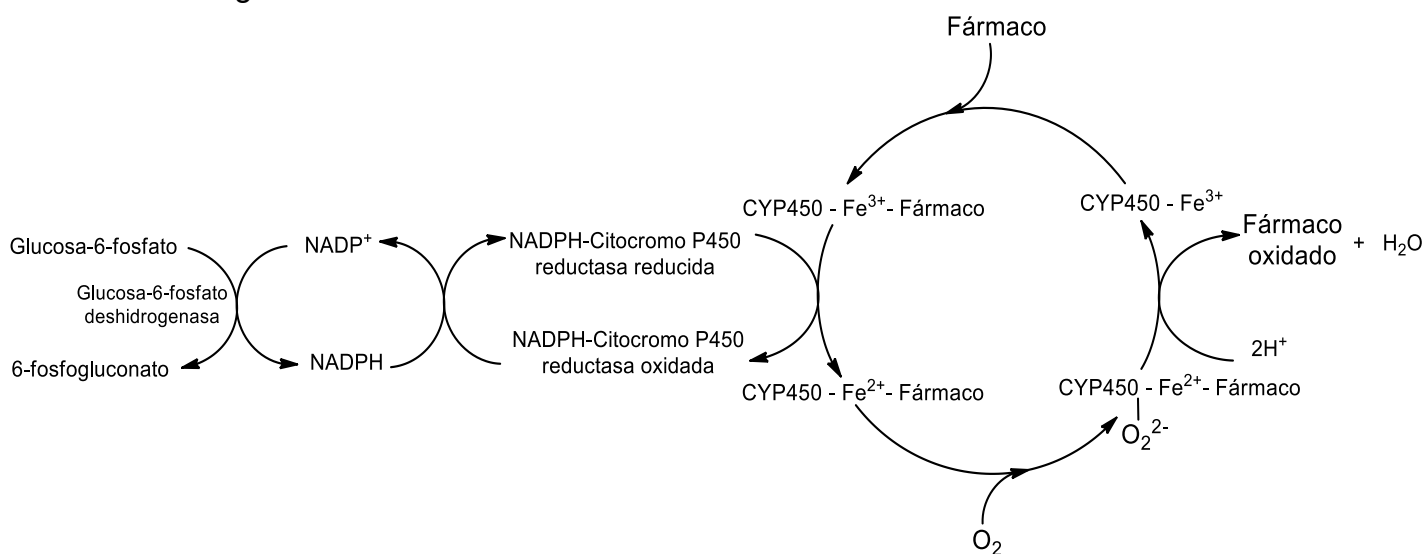


Figura 21. Reacciones bioquímicas implicadas en la biotransformación de fármacos en la fracción S9 de hígado de rata. El proceso de oxidación de fármacos comienza con la formación de un complejo entre el fármaco y el ion Fe^{3+} del grupo hemo del citocromo. Posteriormente, el ion Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} por la acción de la enzima NADPH-Citocromo P450 reductasa, la cual pasa de su forma reducida a la forma oxidada. Después, la formación de un complejo con oxígeno molecular y la posterior adición de dos protones se libera el fármaco en su forma oxidada y agua al medio. Para regresar a la NADPH-Citocromo P450 reductasa a su forma oxidada es necesaria la oxidación de NADPH a NADP^+ , la regeneración del NADPH se da por la acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual proporciona constantemente NADPH al medio de reacción, denominándose sistema de regeneración de NADPH.

Por otra parte, la información obtenida de los ensayos cualitativos, los cuales se discutirán mas adelante, permite observar que ambas moléculas presentan las mismas modificaciones estructurales en tiempos relativamente similares. Lo cual puede explicar que presenten comportamientos similares en las cinéticas de los procesos de biotransformación suponiendo que en estos procesos se encuentran implicadas las mismas enzimas.

8.5.2 Ensayos cualitativos de transformación

De los resultados mostrados en la Figura 12, correspondiente a la posible ruta metabólica de QPZ, se observa principalmente la actividad oxidativa marcada como la adición de grupos hidroxilo sobre la porción quinolínica de la QPZ debido probablemente a la actividad de la isoforma 3A4 de los citocromos, principales responsables de las reacciones de oxidación en la biotransformación de xenobióticos. Se hace notar en los resultados que estas reacciones ocurren dentro de las primeras tres horas de experimento, lo cual resulta congruente debido a que al ser las oxidaciones reacciones de fase I son las primeras que se presentan en la biotransformación.²² Otro metabolito detectado desde la primer hora del experimento es la etilendiamina que resulta de la N-desalquilación de la porción de piperazina de la molécula, esta reacción ocurre por la actividad de diversas isoformas de los citocromos como lo son 1A2, 3A4, 2C19 y 2D6,⁴⁶ dentro de los primeros tiempos de reacción, se observaron también procesos de hidroxilación en otras porciones de la molécula una vez que se ha perdido parte de la piperazina. Lo anterior indica que una vez que la piperazina es desalquilada, los compuestos estudiados probablemente se vuelven mucho más susceptibles a procesos de biotransformación por los citocromos hepáticos.

En las muestras correspondientes a cuatro horas se observa principalmente la aparición de metabolitos resultantes de reacciones de conjugación (metabolitos de fase II). Todos los metabolitos de esta fase que fueron detectados corresponden a la conjugación con acetato, reacciones catalizadas por acción de las enzimas acetiltransferasas que actúan a través de la conjugación de grupos funcionales nucleofílicos como aminas, alcoholes o tioles con la porción acetilo de la acetil coenzima A.²²

Cabe mencionar que en los ensayos cuantitativos fue posible detectar algunos metabolitos de la QPZ como se observa en la Figura 7, sin embargo, debido al tipo de detección empleado (UV/DAD) no fue posible determinar de manera precisa la estructura química de los mismos, por lo que solo se pudo inferir que estos metabolitos mantenían la estructura quinolínica de la QPZ, como se ejemplifica en la Figura 12.

Con respecto a la posible ruta metabólica propuesta para TR3370, misma que se encuentra en la Figura 13, se pudo determinar desde la primera hora de muestreo, la formación de QPZ a partir de TR3370 debido al proceso de desalquilación sobre el nitrógeno terciario de la piperazina. Lo anterior indica que TR3370 puede ser un precursor de la QPZ y que eventualmente, los efectos farmacológicos observables pueden ser debidos a una combinación de ambos. Dada la presencia de la QPZ desde las primeras etapas del experimento, se puede suponer que también se lleva a cabo la subsecuente ruta de biotransformación de la QPZ como parte de la ruta de biotransformación del TR3370, aunque no en cantidades que pudiesen ser detectadas por CLAE/DAD.

En los resultados de biotransformación de TR3370, se identificó desde la primera hora de experimentación la presencia del metabolito correspondiente a la formación de la etilindiamina proveniente de la apertura del anillo de piperazina sin la pérdida de la cadena hidroxialquilada. Tomando como referencia éste último metabolito, se observó la presencia de modificaciones estructurales similares a las de QPZ, correspondientes a la hidroxilación en las posiciones 6 y 7 de la quinolina, con la diferencia de que se presentaron en tiempos mayores (2 h) que para QPZ (1 h). Lo anterior sugiere que la presencia de la cadena en esta posición le confiere un poco más de resistencia a TR3370 frente a los citocromos responsables de la oxidación de la quinolina.

Además, el metabolito desalquilado del TR3370 posteriormente es oxidado de la parte correspondiente al hidroxilo a aldehído desde etapas iniciales del experimento, mismo que después es oxidado hasta la forma de ácido carboxílico. Metabolitos con las características anteriores no fueron detectados cuando la porción de piperazina se encontraba intacta en la molécula.

De igual manera que para la QPZ, los estudios cuantitativos mostraron la presencia de algunos de los metabolitos como se muestra en la Figura 8, de los cuales sólo es posible suponer que poseen la porción quinolínica del compuesto original. De los metabolitos detectados ninguno presentó un tiempo de retención similar a la QPZ, indicando así que si bien el TR3370 puede dar lugar a la QPZ por procesos de biotransformación como demostraron los estudios cualitativos, la proporción generada no es tan grande como para poder ser detectada por la técnica analítica empleada (CLAE/UV).

8.6 Estudios farmacocinéticos *in vivo* en ratas Wistar

Si bien en un inicio se observó que las concentraciones plasmáticas tras las administraciones intravasculares de la QPZ y el TR3370 mostraron un comportamiento y un ajuste adecuado al modelo abierto de dos compartimentos (MADC), mientras que los perfiles determinados para las administraciones orales mostraron un adecuado ajuste al modelo abierto de un compartimento (MAUC), se determinó realizar un análisis siguiendo una farmacocinética con modelo no compartimental. La razón es que la farmacocinética no compartimental presenta algunas ventajas sobre los modelos compartimentales mismas que se mencionan a continuación:

1. No es preciso discriminar un modelo cinético concreto para explicar los resultados experimentales.
2. Es posible determinar parámetros farmacocinéticos que permiten explicar los datos experimentales.
3. El tratamiento cinético compartimental implica un tratamiento matemático complejo.
4. El modelo compartimental presenta una dificultad en la elección de un único modelo para todos los individuos del ensayo.
5. Los modelos compartimentales tienen dificultad en la selección de un único modelo para las diversas formas de dosificación ensayadas.⁴⁷

A partir de los parámetros farmacocinéticos determinados, se puede decir que la adición de una porción de hidroxietilo a la QPZ no le confiere a TR3370 ventajas en las propiedades farmacocinéticas, contrario a lo que podría esperarse debido a la mayor permeabilidad intestinal mostrada por TR3370 en los ensayos *in vitro*. De manera general se observó en los estudios *in vivo* que TR3370 presenta eliminación mayor a la QPZ, se determinó que tiene una menor absorción, así como una menor biodisponibilidad que la QPZ.

Los resultados obtenidos correspondientes a la constante de eliminación (k_{el}) indican que no existen diferencias evidentes para este proceso entre TR3370 y QPZ. Por otra parte, los datos obtenidos en el cálculo del tiempo medio de residencia (TMR), definido como el tiempo promedio en el que tarda en eliminarse el 63.2% de las moléculas de fármaco del organismo, indican que la eliminación del TR3370 es más rápida que la de la QPZ.⁴⁷

Los valores obtenidos de ABC_0^∞ indican que las administraciones orales presentan una menor biodisponibilidad que las intravasculares, lo cual resulta congruente ya que en estas últimas, la totalidad del fármaco llega a la circulación sistémica, por lo que se considera como el 100% de biodisponibilidad. De igual forma, estos resultados indican que la QPZ presenta una mayor biodisponibilidad, prácticamente el doble que TR3370.

Para los procesos de absorción se determinó que la QPZ presenta una absorción intestinal muy similar al TR3370, como lo indican los valores de k_a , mientras que, la C_{max} alcanzada por la QPZ es notoriamente mayor que la del TR3370. Con respecto a los resultados obtenidos en la determinación de t_{max} , éste es menor para el TR3370 que para la QPZ, lo cual resulta congruente puesto que las velocidades de absorción son muy similares, sin embargo la QPZ alcanza concentraciones mayores que el otro compuesto, por lo que es lógico que requiera más tiempo para alcanzar dichas concentraciones. Cabe mencionar que estudios de toxicinética realizados a benzilpiperazina (BZP) indican un valor de $t_{máx}$ de 75 min (1.25 h), en humanos⁴³ el cual es muy similar al determinado para la QPZ (1.12 h) a pesar de ser un dato experimental determinado en ratas, mientras que el TR3370 presentó un tiempo menor (0.69 h). En lo correspondiente a los valores de

la fracción de dosis absorbida (F), la QPZ presenta una mayor proporción que el TR3370. De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de permeabilidad, se esperaría que el TR3370 presentara una mayor velocidad de absorción, así como una mayor cantidad absorbida, debido a que tiene una constante de permeabilidad mayor. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que la absorción intestinal requiere una diversa serie de procesos en los que se presenta una considerable pérdida en la cantidad de compuesto que permea a través del intestino y llega hasta la circulación sistémica, siendo uno de estos el metabolismo a nivel intestinal, así como el hepático o efecto del primer paso,⁴⁹ como se ejemplifica en la Figura 22.

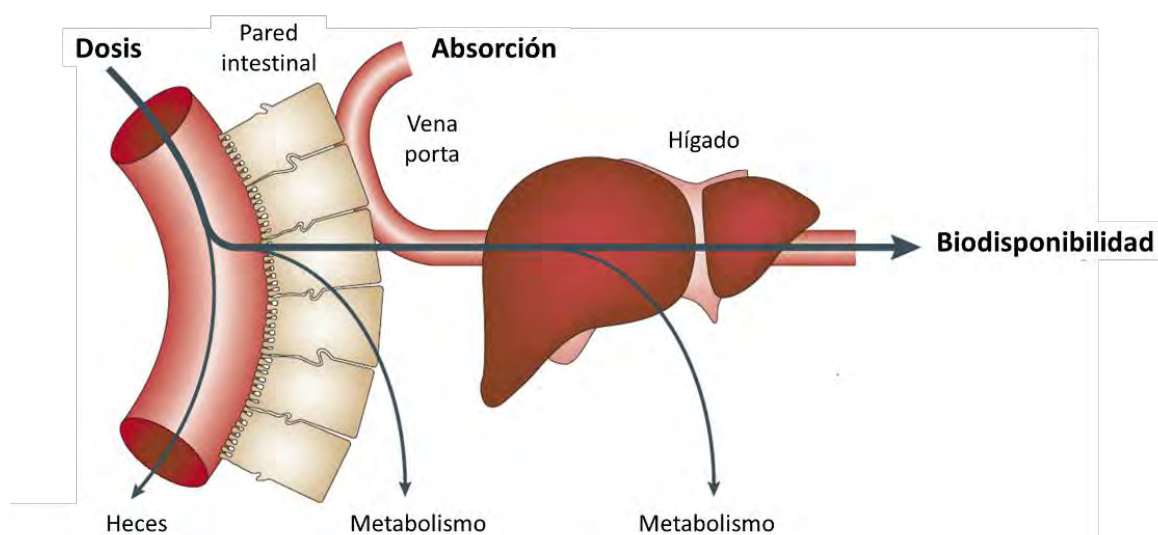


Figura 22. Procesos fisiológicos en la absorción intestinal de xenobióticos. Se observa la presencia de metabolismo intestinal y del efecto del primer paso, los cuales generan una disminución de la cantidad absorbida y generan impacto en la biodisponibilidad. (Adaptado de van de Waterbeemd, 2003)

Los resultados obtenidos de los parámetros farmacocinéticos indican que, la porción hidroxialquílica del TR3370 no le confiere ventajas farmacocinéticas relevantes sobre la QPZ, ya que basándonos en los valores de TMR y k_{el} , el TR3370 se elimina de una manera más rápida que la QPZ. Además, la biodisponibilidad alcanzada por el TR3370 es mucho menor que la de la QPZ. En lo correspondiente a los procesos de absorción, la QPZ se absorbe en mayor cantidad y de una manera más rápida que el TR3370.

Los tiempos de muestreo que se evaluaron muestran que en la mayoría de los tratamientos (exceptuando la administración oral de TR3370) las concentraciones plasmáticas determinadas llegaron hasta un valor igual o inferior al 10% de las concentraciones máximas encontradas en el experimento. En el caso de TR3370 por vía oral, se determinó hasta una concentración de aproximadamente el 12% del valor de la $C_{m\acute{a}x}$. Dicho esto, se puede decir que los tiempos de muestreo planteados para las evaluaciones farmacocinéticas fueron adecuados, de acuerdo a los criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013, la cual indica que los tiempos de muestreo en estudios de farmacocinética deben ser frecuentes alrededor del $t_{m\acute{a}x}$ para proporcionar un estimado confiable de $C_{m\acute{a}x}$, adicionalmente, los tiempos de muestreo deben comprender 4 tiempos de vida media ($t_{1/2}$) (valor correspondiente a 5.1 h para la QPZ y 3.9 h para el TR3370) y se deben de contar con al menos 4 puntos en la fase log terminal.⁵⁰

8.7 Monitorización de los niveles de glucosa

Los resultados obtenidos muestran que durante los primeros 30 min del experimento se observa una ligera disminución de los niveles de glicemia solo en algunos de los tratamientos (QPZ p.o. y TR3370 i.v.), mismo que en tiempos posteriores se ve completamente minimizado por una elevación en estos niveles. Esta elevación se mantiene hasta los últimos tiempos de muestreo, donde resalta que estos niveles vuelven a sus valores basales únicamente en el caso de la administración del TR3370 por vía oral.

En la Figura 16 se mostraron los valores de ABC de los curso temporales de los niveles de glicemia en los estudios farmacocinéticos, así como los valores de ABC de los mismos. De estos resultados, destaca el valor de ABC negativo para el grupo control, mismo que puede explicarse como el proceso normal de hipoglucemia que presentaron los animales debido al proceso de ayuno al que fueron sometidos, ya que para el término del experimento, los animales presentaban en total 14 horas de ayuno. El análisis estadístico realizado mostró que únicamente la administración de la QPZ por vía intravascular presentó un aumento significativo en los niveles de glicemia, mientras que la administración oral de la QPZ y ambas

administraciones del TR3370, si bien mostraron un aumento en los niveles de glicemia, no fue significativo ($\alpha = 0.05$) al compararse con las variaciones del grupo control.

Los resultados anteriores pueden explicarse tomando en cuenta los parámetros farmacocinéticos determinados, ya que la QPZ presenta una mayor absorción, menor eliminación y mayor biodisponibilidad que el TR3370; tomando en cuenta que el efecto farmacológico se correlaciona con las concentraciones plasmáticas de fármaco, resulta lógico pensar que la administración intravascular de la QPZ presente la mayor variación en los niveles de glicemia debido a las mayores concentraciones plasmáticas generadas.

Evaluaciones previas realizadas a la QPZ y al TR3370 mostraron su adecuada capacidad como secretagogo de insulina, lo que posteriormente se ve reflejado en una disminución de la glicemia.¹⁹ Sin embargo, resultados similares a los obtenidos en este trabajo también han sido reportados, en los cuales se menciona que si se determina el efecto de derivados de QPZ sobre los niveles de glucosa en sangre arterial, como se realizó en el presente trabajo, no se observa una disminución de estos valores, sino el efecto contrario, es decir hiperglucemia; mismo que no se detecta cuando se determinan los niveles de glucosa en sangre periférica, como la que se obtiene por punción en la parte distal de la cola de los animales, donde se observa el efecto hipoglucemiante.¹⁹

Para poder explicar estos resultados es necesario tomar en cuenta las diferentes acciones que pueden presentar la serotonina y sus agonistas sintéticos en otras partes del cuerpo además del páncreas, principalmente sobre hígado y músculo esquelético. El mecanismo por el cual la serotonina promueve la secreción de insulina a través de las células β -pancreáticas ha sido de interés en los últimos años y ha sido ampliamente descrito.⁹

Por otra parte se sabe que la acción de la serotonina sobre tejido hepático genera efectos que promueven la gluconeogénesis a través de la expresión de proteínas implicadas en este proceso bioquímico⁵¹ y la liberación de glucosa hacia el torrente sanguíneo, la cual ha sido atribuida principalmente a la acción de adrenalina proveniente de glándulas suprarrenales, acción que es mediada por

serotonina a través de sus receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₇.⁵² Además, otros estudios realizados reportan que la administración intraperitoneal de serotonina a ratones en condiciones de ayuno mostraron una considerable elevación en los niveles de glicemia.⁵³ Cabe mencionar que en las referencias descritas la toma de muestras se realizó en sangre arterial proveniente de la arteria caudal de la cola⁵² o de la carótida de los animales de experimentación.⁵³

Con respecto a la acción de la serotonina sobre el músculo esquelético, desde hace tiempo se detectó la presencia del receptor 5-HT_{2A} en músculo de rata.⁵⁴ Los mecanismos específicos por los que la serotonina ejerce su acción sobre el músculo esquelético aún no se encuentran del todo elucidados, sin embargo, se ha descrito que la serotonina mejora la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina por mecanismos asociados principalmente con la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular,⁵⁵ además de que promueve el metabolismo de la glucosa en este tejido, actividad que se ha correlacionado con una estimulación de las enzimas implicadas, en el proceso de glucólisis, específicamente la 6-fosfofructo-1-cinasa.⁵⁶

En su conjunto, estas tres actividades relacionadas con serotonina pueden explicar el porqué de la elevación en los niveles de glucosa cuando se toma la sangre de una arteria, mientras que cuando la muestra se recolecta por medio de una punción en la cola se observa un efecto hipoglucemiante.¹⁹ La acción sobre hígado y páncreas promueve la liberación de glucosa y de insulina respectivamente, mismas que viajan por el torrente sanguíneo hacia los demás órganos y tejidos por medio de las arterias, lo que explica que la canulación en estos vasos muestre una elevación en los niveles de glucosa. Al llegar a músculo esquelético, la insulina actúa sobre este, lo que eventualmente llevará a un consumo de la glucosa en sangre; por otra parte, la serotonina o sus agonistas favorecen la glicólisis en el tejido, de forma que una vez que las arterias aportaron tanto insulina como glucosa, la sangre que pasa de la arteria a los capilares y posteriormente a las venas se encuentra carente de glucosa, lo que explica el efecto hipoglucemiante de la serotonina y sus agonistas observado en muestras sanguíneas de la parte distal de la cola de las ratas. Este mecanismo propuesto se ilustra en la Figura 23.

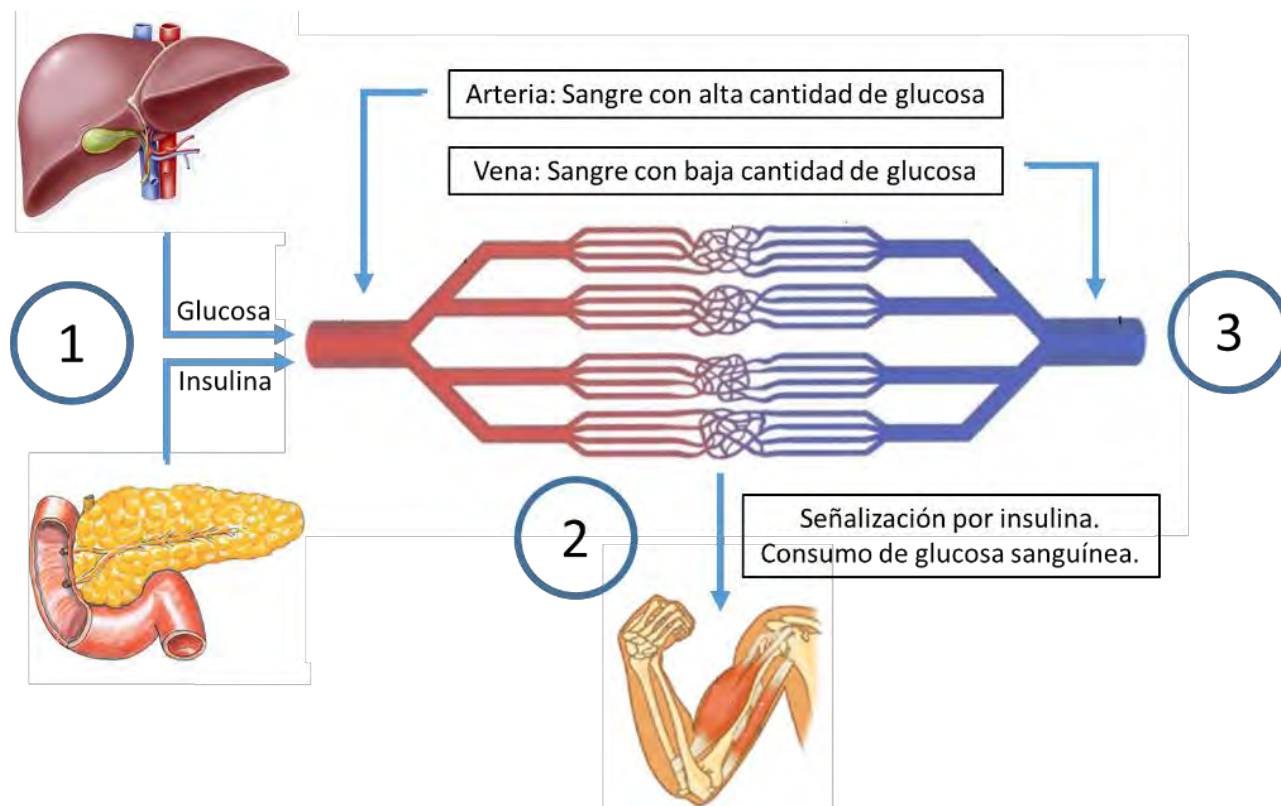


Figura 23. Efecto de la serotonina sobre algunos órganos y su repercusión en los niveles de glicemia. 1) Estimulación de hígado y páncreas para la liberación de glucosa e insulina al torrente sanguíneo. 2) Las arterias llevan a la glucosa y a la insulina a músculo esquelético, la serotonina promueve el consumo de glucosa. 3) Después de la irrigación en músculo, la sangre que pasa a las venas se encuentra en deficiencia de glucosa comparada con la sangre arterial.

De manera general se puede observar una tendencia en la mayoría de los casos, donde existe una relación directa entre los niveles de glicemia y las concentraciones plasmáticas de la QPZ y el TR3370 en ambas vías de administración, en donde las concentraciones plasmáticas altas de estos compuestos promueven un ligero descenso en los niveles de glicemia. Sin embargo, conforme la cantidad de tratamiento en plasma disminuye, los niveles de glucosa presentan un aumento que se mantiene hasta los últimos tiempos de muestreo, de forma que la glicemia pocas veces regresa a sus niveles basales a pesar de que las concentraciones de los compuestos disminuyan. Este comportamiento puede explicarse si se toma como referencia la biotransformación de las moléculas en los que se determinó que tanto para la QPZ como para el TR3370 se presenta la formación de etilendiamina a partir de la porción de piperazina de las moléculas

desde la primera hora de experimentación. Estudios recientes en el grupo de trabajo en donde se evaluó la capacidad hipoglucemiante de un metabolito del TR3370, mismo que se muestra en la Figura 24, mostraron que sin la porción de piperazina intacta en la molécula, el efecto hipoglucemiante desaparece, además de que los niveles de glicemia presentan un comportamiento similar al observado con antagonistas serotoninérgicos, específicamente ketanserina.⁵⁷ La actividad hiperglicémica de los antagonistas de serotonina ha sido descrita previamente a través de la evaluación de antagonistas selectivos de los receptores serotoninérgicos 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃.⁵⁸ La información obtenida en este estudio puede sugerir que los procesos metabólicos de la QPZ y del TR3370 generan productos que presentan actividad antagonista sobre los receptores de 5-HT₂ implicados en el control de glicemia y por el cual ejercen su acción QPZ y TR3370.

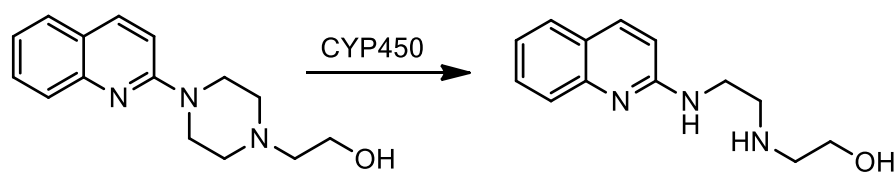


Figura 24. Metabolito desalquilado de TR3370, el cual carece de actividad hipoglucemiante, probablemente por la pérdida de la porción de piperazina.

8.8 Estudios de relación Farmacocinética/Farmacodinamia

De manera general, en la Figura 17 se observa la tendencia de un asa de histéresis en dirección de las manecillas del reloj para la administración intravenosa de la QPZ y del TR3370, mientras que para las administraciones orales de ambos tratamientos se observa la presencia de asas en sentido contrario a las manecillas del reloj. Las dos posibles direcciones que pueden presentar las asas de histéresis se encuentran relacionadas con diferentes procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos en las dos moléculas.

En el caso de las administraciones intravasculares que presentaron asas en sentido de las manecillas del reloj, se pueden deber a un aumento del efecto farmacológico con el descenso de las concentraciones plasmáticas tanto para QPZ

como para TR3370. En este caso, la presencia de asas de histéresis en esta dirección se ha correlacionado con un procesos de tolerancia o “down regulation” de los receptores sobre los cuales el fármaco interactúa y ejerce su actividad biológica.³² Este fenómeno puede originarse debido a una sobre estimulación de los receptores que se da a concentraciones altas de agonistas, mismas que se consiguen en la sangre tras una administración intravascular.

Por otra parte, en el caso de las administraciones orales, la dirección de las asas de histéresis en contra del sentido de las manecillas del reloj muestra que, de manera general, durante la fase de absorción los niveles de glicemia no se modifican de manera considerable en el caso de la QPZ, sin embargo, para el TR3370 desde las concentraciones correspondientes a la fase de absorción, el aumento en la glicemia es mayor que para la QPZ a pesar de que la $C_{máx}$ de la QPZ ($28.30 \pm 12.79 \mu\text{g/mL}$) sea mayor que la de TR3370 ($8.40 \pm 2.81 \mu\text{g/mL}$). Lo anterior indica que desde bajas concentraciones del TR3370 se observa un mayor efecto farmacológico que con la QPZ. Es probable que esta condición se presente en parte como resultado del efecto del primer paso, en el cual el TR3370 es metabolizado por el hígado formándose así un metabolito activo del mismo, el cual como se determinó experimentalmente, es la QPZ. La formación de metabolitos de naturaleza agonista competitivo se ha correlacionado con la presencia de asas de histéresis en dirección a favor de las manecillas del reloj;³² sin embargo, después de alcanzada la $C_{máx}$, se continua observando un aumento de los niveles de glicemia para ambos tratamientos, lo anterior puede deberse a la formación de metabolitos que actúen como agonistas parciales competitivos o como antagonistas competitivos sobre los mismos receptores en los que actúan la QPZ y el TR3370; como se mencionó antes, la formación de los metabolitos desalquilados (formación de etilendiamina) de estas moléculas ocasionan la pérdida de actividad su hipogluceminate de las mismas con un comportamiento similar a antagonistas serotoninérgicos como la ketanserina;⁵⁷ de esta forma, en conjunto con los estudios previos del grupo de trabajo, se puede sugerir que los metabolitos desalquilados de estas moléculas presentan un efecto contrario al de las moléculas de las que se derivan. Por último, hacia los tiempos finales del experimento se observa, en gran parte de las asas, una disminución de los niveles de glucosa, en la mayoría de los

casos muy cercano a los niveles basales de glicemia al inicio de la experimentación, lo cual puede correlacionarse no sólo con la eliminación de la QPZ y el TR3370, si no también con la disminución de los metabolitos mencionados, responsables del aumento de los niveles de glicemia.

8.9 Perfil neurofarmacológico

El conjunto de evaluaciones que conformaron el perfil neurofarmacológico de la QPZ y del TR3370 permitieron determinar la actividad de estos compuestos sobre el sistema nervioso central, ya que es conocido que los agonistas serotoninérgicos, de estructura similar a las moléculas de interés del presente trabajo son empleados como sustancias de abuso debido a sus efectos psicoactivos, principalmente la 1-benzilpiperazina y algunos de sus derivados.¹³

Las pruebas realizadas permitieron evaluar el efecto de la QPZ y del TR3370 sobre la coordinación motora de los animales (Prueba de Rotarod), los efectos sobre la actividad exploratoria de los animales (Cilindro de exploración), misma que se correlaciona con la actividad ansiogénica (Tablero de hoyos); el efecto sobre la actividad motora se determinó mediante la prueba del actímetro. Los datos obtenidos de estas evaluaciones se representaron en las Figuras 18 y 19.

Los resultados obtenidos en la prueba de Rotarod (Figura 18A) indican que la QPZ no presentó efectos significativos sobre la coordinación motora, únicamente la dosis de 3 mg/kg del TR3370 presentó efecto sobre la coordinación motora de los animales, incrementando el tiempo de permanencia en el vástago del Rotarod. El poco efecto observado en esta evaluación resulta congruente ya que dentro de las diversas funciones que presenta la serotonina en el SNC, no figura la actividad sobre la coordinación motora.⁵⁹ Por otra parte, dentro de los efectos adversos reportados en casos de consumo de derivados de BZP con fines recreativos, se han reportado algunas modificaciones en los patrones del movimiento como tirones mioclónicos, temblores y movimientos coreoatetoides (movimientos involuntarios, lentos y de contorsión),⁴⁸ los cuales podrían eventualmente modificar la

coordinación motora; por lo que se puede decir que ni la QPZ ni el TR3370 producen estos efectos a comparación de otros agonistas serotoninérgicos.

La evaluación de la actividad exploratoria permite estimar la actividad ansiogénica o ansiolítica de las sustancias que se evalúan bajo esta prueba. Mientras que una reducción en el número de levantamientos espontáneos de los animales en el interior del cilindro se considera como una actividad sedante⁶⁰ y/o ansiolítica, un aumento en el número de los mismos se asocia a una actividad ansiogénica. De manera complementaria a la prueba del cilindro de exploración, la prueba del tablero de hoyos también permite observar la generación o eliminación de ansiedad en los animales de experimentación, la cual se correlaciona de manera directamente proporcional con la cantidad de hoyos en los cuales el ratón introduce la cabeza.³⁹

Los resultados obtenidos en la prueba del tablero de hoyos (Figura 18C) indicaron que sólo a dosis de 10 mg/kg, la QPZ presenta un efecto ansiogénico, al ser comparado el número de exploraciones generadas por esta dosis y las exploraciones de los ratones control. Por otra parte, en la prueba del cilindro de exploración (Figura 18B) se determinó que existe un efecto ansiogénico en todas las dosis evaluadas de QPZ que fueron evaluadas. Con respecto al TR3370, se observó que únicamente a la dosis de 10 mg/kg, se presentó una diferencia significativa en el número de levantamientos en comparación con la del grupo control (Figura 18B). Como se había observado en otros estudios conductuales, la QPZ tiene actividad sobre el SNC y genera ansiedad sobre los sujetos de experimentación.¹⁷ En el caso del TR3370, estos efectos se presentan en menor medida a las mismas dosis de QPZ, y es hasta una dosis de 10 mg/kg que se presenta esta actividad. Dicho esto, se puede decir que la sustitución N-hidroxietilo del TR3370 le confiere una menor actividad ansiogénica que a la QPZ, siendo esto una ventaja del TR3370 sobre la QPZ.

Los resultados obtenidos de la determinación del efecto de los tratamientos sobre la actividad motora en el actímetro se mostraron en la Figura 19. En el caso de los movimientos lentos normales, lentos estereotipados y rápidos normales, no se presentaron modificaciones por ninguno de los tratamientos evaluados. Sin

embargo en el caso de los movimientos rápidos estereotipados, se presentó una disminución significativa de los mismos en el tratamiento con QPZ y con TR337. Los movimientos estereotipados son conductas repetitivas que no se encuentran relacionadas con estímulos externos y se encuentran asociados a una elevada actividad de dopamina, debido a esto, los movimientos estereotipados comúnmente se encuentran presentes en pacientes con esquizofrenia. Dentro de los tratamientos de este padecimiento se encuentran los derivados de tioxantinas como el flupentixol, clopentixol y zuclopentixol, los cuales bloquean los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos en el SNC, lo que disminuye varios de los síntomas de la esquizofrenia, entre ellos, los movimientos estereotipados⁵⁹. Cabe mencionar que este tipo de fármacos presentan una porción similar al TR3370, correspondiente al anillo de piperazina derivatizado con hidroxietilo, así como una porción aromática, lo que puede explicar esta actividad por parte de estas moléculas. Tomando en cuenta que una de las reacciones metabólicas del TR3370 da lugar a la formación de la QPZ, cabe la posibilidad de que los antipsicóticos mencionados presenten una biotransformación similar y que en dado caso, ese metabolito etilendiamínico también presente actividad farmacológica, basándose en el hecho de que la QPZ también redujo de manera significativa los movimientos rápidos estereotipados. Adicionalmente, estudios de biotransformación de fármacos neurolépticos con residuos de piperazina, muestran la formación de la etielendiamina a partir de la piperazina,²⁹ como se observó en los ensayos de biotransformación.

La determinación de los niveles de glucosa sanguínea (Figura 18D) en los ratones empleados en el perfil neurofarmacológico no mostró una diferencia significativa en los niveles de glucemia de los ratones tratados con respecto a los niveles de los ratones control, sin embargo, se observa una ligera tendencia a disminuir en los mismos conforme aumenta la dosis de tratamiento. A diferencia de las determinaciones de glicemia realizadas en las muestras de ratas de los ensayos farmacocinéticos, es posible observar una disminución en los niveles de glucosa en los ratones ya que la toma de muestra se realizó por medio de una punción en la parte distal de la cola, por lo que la sangre capilar recolectada en esa muestra no refleja los efectos hiperglucemiantes de QPZ y de TR3370 observados en las

muestras de los ensayos farmacocinéticos. Por otra parte, al comparar los niveles de glicemia con los resultados obtenidos en las evaluaciones de cilindro de exploración y de tablero de hoyos, se aprecia que, así como se presenta una respuesta dosis dependiente en el efecto ansiogénico, también se presenta esta relación para el efecto hipoglucemiante, lo que sugiere que estos dos efectos se presentan de manera simultánea para ambos compuestos.

9. Conclusiones

Los experimentos realizados de manera paralela para la QPZ y para el TR3370 permitieron determinar diferencias y similitudes entre sus procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos.

Los estudios de permeabilidad permitieron determinar que la constante de permeabilidad aparente en el intestino del TR3370 (24.8×10^{-4} cm/s) es mayor al de la QPZ (8.14×10^{-4} cm/s).

El experimento de biotransformación permitió establecer que la QPZ y el TR3370 se metabolizan aproximadamente en un 40% durante las primeras 4 horas. Además se pudo elucidar tentativamente la posible ruta de biotransformación de ambas moléculas, detectándose que el TR3370 da lugar a QPZ desde la primera hora de experimentación.

Los estudios farmacocinéticos permitieron determinar que existen diferencias significativas en los procesos de absorción, ya que el TR3370 se absorbe en menor cantidad que la QPZ. En cuanto a los procesos de eliminación, no se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en los valores de TMR entre ambas sustancias, sin embargo los valores de k_{el} de QPZ fueron menores que los de TR3370. Basándose en los valores de ABC_0^∞ , TR3370 mostró una menor biodisponibilidad que QPZ.

Los estudios de correlación farmacocinética/farmacodinamia de ambos compuestos mostraron la presencia de asas de histéresis en sentido de las manecillas del reloj en el caso de las administraciones intravasculares, mientras que las asas en sentido contrario de las manecillas del reloj se presentaron en las administraciones orales.

El perfil neurofarmacológico de ambas sustancias mostró que la QPZ no presenta actividad sobre la coordinación motora, mientras que el TR3370 modificó esa característica a una dosis de 3 mg/kg, que la QPZ presenta una mayor actividad ansiogénica que el TR3370 y que ambos compuestos presentaron una disminución de movimientos rápidos estereotipados.

Se desarrolló y validó un método para la cuantificación de muestras de QPZ y TR3370 para ensayos de permeabilidad y biotransformación por fracción S9 *in vitro*, así como para ensayos farmacocinéticos en plasma de rata.

10. Referencias

- [1] WHO, World Health Organization, página web consultada el 8 Mayo de 2017 en <http://www.who.int>
- [2] Kahn, S. E., Cooper, M. E. & Del Prato, S., Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future, *Lancet*, **2014**, *383*, 1068-1083.
- [3] Yan, Z. & Caldwell, G. "Optimization in Drug Discovery. In Vitro Methods", Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development Spring House, **2004**, 10-13.
- [4] IDF, International Diabetes Federation, Atlas de la Diabetes de la FID, Séptima ed., International Diabetes Federation, **2015**.
- [5] Keszthelyi, D., Troost, F. & Masclee, A., Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function, *Neurogastroenterology & Motility*, **2009**, *21*, 1239-1249.
- [6] Berger, M., Gray, J. & Roth, B., The expanded biology of serotonin., *Annual Review of Medicine*, **2009**, *60*, 355-366.
- [7] Martson, O., Garfield, A. & Heisler, L. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance, *European Journal of Pharmacology*, **2011**, *660*, 70-79.
- [8] El-Merahbi, R., Löffler, M., Mayer, A. & Sumara, G., The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis, *FEBS Letters*, **2015**, *589*, 1728-1734.
- [9] Paulman, N., et. al, Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation, *PLOS Biology*, **2009**, *10*(7), e1000229.
- [10] Nogogaki, K., Strack, A., Dallman, M. & Tecott, L., Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene. *Nature Medicine*, **1998**, *4*, 1152-1156.
- [11] Zhang, Q., Zhu, Y., Zhou, W., Gao, L., Yuan, L. & Han, X. Serotonin receptor 2C and insulin secretion *PLOS ONE*, **2013**, *8*(1), e54250.
- [12] Uvnas-Moberg, K., Ahlenius, S., Alster, P. & Hillegaard, V., Effects of selective serotonin and dopamine agonists on plasma levels of glucose, insulin and glucagon in the rat. *Neuroendocrinology*, **1996**, *63*, 269-274,.
- [13] Gee, P., Jerram, T. & Bowie, D., Multiorgan failure from 1-benzylpiperazine ingestion – legal high or lethal high?, *Clinical Toxicology*, **2010**, *48*, 230-233.
- [14] Hong, E. & Pardo, E., On the pharmacology of 2-(1-piperazinyl)-quinoline, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1966**, *153*, 259.
- [15] Hong, E., Sancilio, L. F., Vargas, R. & Pardo, E., Similarities between the pharmacological actions of quipazine and serotonin, *European Journal of Pharmacology*, **1969**, *6*, 274-280.

- [16] Salas, M., Cervantes, M. & Guzmán, C., Mechanism of action of quipazine maleate on the central nervous system, *Boletín del Instituto de Estudios Médicos y Biológicos*, **1966**, *24*, 191.
- [17] Trulson, M., Brandstetter, J., Crisp, T. & Jacobs, B., Behavioral effects of quipazine in the cat, *European Journal of Pharmacology*, **1982**, *78*, 295-305.
- [18] Terron, J., Hong, E. & Villalon, C., Pharmacological screening of ome quinoline derivates in canine vascular smooth muscle, *Archives of Medical Research*, **1994**, *25(4)* 435-440.
- [19] De la Rosa, I., Relación estructura-actividad sobre la sensibilidad a la insulina de una serie de análogos de la QPZ, Tesis de Maestría, CINVESTAV, México, **2014**.
- [20] Urso, R., Bardi, P. & Giorgi, G., A short introduction to pharmacokinetics, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **2002**, *6*, 33-44.
- [21] Artursson P., Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1990**, *79(6)*, 476-482.
- [22] Wu, W. & McKown, L., In vitro metabolite profiling using hepatic S9 and human liver microsomes, de *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*, Human Press Inc, **2004**, 163-184.
- [23] Ackley, D., Rockich, K. & Baker, T., Metabolic stability assessed by liver microsomes and hepatocytes, de *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*, Human Press Inc., **2004**, 151-162.
- [24] Duffus, J., Nordberg, M. & Templeton, D., Glossary of terms used in toxicology, Segunda ed., International Union of Pure and Applied Chemistry, **2007**, 1153-1344.
- [25] Greim, H. & Snyder, R., Toxicology and risk assessment: a comprehensive introduction, Wiley-Interscience, **2008**, 387.
- [26] Vogel, H., Drug discovery and evaluation; safety and pharmacokinetics assays, Springer, **2006**, 509.
- [27] Desrivot, J., et. al Metabolism of 2-substituted quinolines with antileishmanial activity studied in vitro with liver microsomes, hepatocytes and recombinantly expressed enzymes analyzed by LC/MS, *Toxicology*, **2007**, *235*, 27-38.
- [28] Staack, R., et. al, New designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP): gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry studies on its fase I and II metabolism and on its toxicological detection in rat urine, *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, *38*, 971-981.
- [29] Wójcikowski, J., et. al, The metabolism of piperazine-type phenotyazine neuroleptic perazine by the human cytochrome P-450 isoenzymes, *European Neuropsychopharmacology*, **2004**, *14*, 199-208.
- [30] Karl, T., Pabst, R. & Horsten, S., Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **2003**, *55*, 69-83.

- [31] Irwin, S., Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse, *Psychopharmacologia*, **1968**, *13*, 222-257.
- [32] Louizos, C., Yáñez, J. A., Forrest, M. L. & Davies, N. M., Understanding the hysteresis loop conundrum in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2014**, *17*(1), 34-91.
- [33] Dell, R., Holleran, S. & Ramakrishnan, R., Sample Size Determination, *ILAR Journal*, **2002**, *43*(4), 207-213
- [34] Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. En línea. Obtenida el día 26 de Febrero de **2017**.
- [35] Almeida, A., Branco, C. & Falcao, A., Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography*, **1979**, *774*, 215-222
- [36] Galicia, D., “Estudio de difusión transdérmica in vitro de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina aislado de *Heteroteca inuloides* Cass (*Árnica mexicana*) utilizando membranas sintéticas Strat-M®” Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **2015**.
- [37] Gornall, A., Bardawil, C. & David, M., Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction, *The Journal of Biological Chemistry*, **1949**, *177*, 751.
- [38] MetaPrint 2D, *Cambridge University*, Reino Unido, **2016**.
- [39] Pérez, J., “Perfil neurofarmacológico de *Crotolaria longirostrata* (*Chipilin*)”, Tesis de Maestría, UNAM, México, **2014**.
- [40] MarvinSketch (Versión 6.6.2), módulo de cálculo desarrollado por ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>, 2014.
- [41] COFEPRIS, Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos (Clave: CCAYAC-CR-03/0), CCAYAC, México, **2014**.
- [42] Base de datos Molinspiration, *Molinspiration*, Disponible: <http://www.molinspiration.com>, **2018**.
- [43] Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S., Di, L. & Senner, F., Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2010**, *9*, 597-614.
- [44] Lei, Y., Wania, F., Shiu, W. Y. & Boocock, D., HPLC-based method for estimating the temperature dependence of n-octanol-water partition coefficients., *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2000**, *45*, 738-742.
- [45] Ocampo, H., “Implementación y validación de un método in situ para determinar la permeabilidad de fármacos”, Tesis de Maestría, UNAM, México, **2014**.
- [46] Olesen, O. & Kristisan, L., Identification of the human citocrom P450 isoforms mediating in vitro N-dealkylation of perphenazine, *British Journal of Clinical Pharmacology*, **2000**, *50*, 563-571.

- [47] Domenech, J. & Lauroba, J., Farmacocinética no compartimental, de *Biofarmacia y Farmacocinética Volumen I: Farmacocinética*, Madrid, Síntesis, **2008**, 391-420.
- [48] Schep, L., Slaughter, R., Vale, J., Beasley, M. & Gee, P., The clinical toxicology of the designer “party pills” benzylpiperazine and trifluoromethylphenylpiperazine, *Clinical Toxicology*, **2011**, *49*, 131-141.
- [49] Waterbeemd van de, H. y Gifford, E., ADMET in silico modelling: towards prediction paradise, *Nature Reviews*, **2003**, *2*, 192-204.
- [50] Norma Oficial Mexicana, NOM-177-SSA1-2013 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. En línea. Obtenida el día 30 de Mayo de **2016**.
- [51] Zavala, M., Lorenzo, P., Álvarez, L., Berlanga, J. & García-Ruíz, J., Serotonin increases the cAMP concentration and phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat kidney, small intestine and liver., *Journal of Cell Physiology*, **1992**, *150*, 451-455.
- [52] Yamada, J., Sugimoto, Y., Yoshikawa, T., Kimura, I. & Horisaka, K., The involment of the peripheral 5-HT_{2A} receptor in peripherally administred serotonin-induced hyperglycemia in rats, *Life Sciences*, **1995**, *57*(8), 819-825.
- [53] Watanabe, H., Akasaka, D., et. al, Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover, *General Endocrinology*, **2010**, *151*, 4776-4786.
- [54] Hajduch, R., Dombrowski, L., Darakhshan, F., Rencurel, F., Murette, A. y Sundal, H., Biochemical Localisation of the 5-HT_{2A} (serotonin) Receptor in Rat Skeletal Muscle, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1999**, *257*, 369-372.
- [55] Al-Zoary, R., Pedrini, M., Khan, M., Niederwanger, A., et. al, Serotonin improves glucose metabolism by serotoninilation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells, *Diabetology & Metabolic Syndrome*, **2007**, *1*, 1-9.
- [56] Santos-Coelho, W., Costa, K. & Sola-Penna, M., Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization, *Molecular Genetics and Metabolism*, **2007**, *92*(4), 364-370.
- [57] Chávez, R., “Efecto de la ketanserina sobre la actividad de metformina, glibenclamida e insulina en rata”, Tesis de Licenciatura, UNAM, México, **2016**.
- [58] Wpzniak, K. & Linnoila, M., Hyperglycemic properties of serotonin rceptor antagonist, *Life Sciences*, **1991**, *49*, 101-109.
- [59] Rang, H., Ritter, J., Flower, R. & Henderson, G., Rang y Dale. Farmacología, Octava ed., Barcelona: Elsevier, **2016**.
- [60] Oliva, I., González-Trujano, E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R. & Navarrete, A., Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of valeriana edulis ssp. procera roots in mice, *Phytotherapy Research*, **2004**, *18*, 290-296.

Anexo I. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de QPZ en ensayos de permeabilidad.

1. Resultados

1.1 Adecuabilidad

Tabla 1. Resultados de adecuabilidad del sistema

	Área	Altura	Tiempo
	599810	35260	3.541
	581193	35146	3.518
	606441	32329	3.591
	617221	32326	3.551
	597004	34581	3.505
	594801	37160	3.526
Promedio	599412	34467	3.538
Desviación	12048	1871	0.03
% CV	2.01	5.4	0.85

1.2 Intervalo lineal

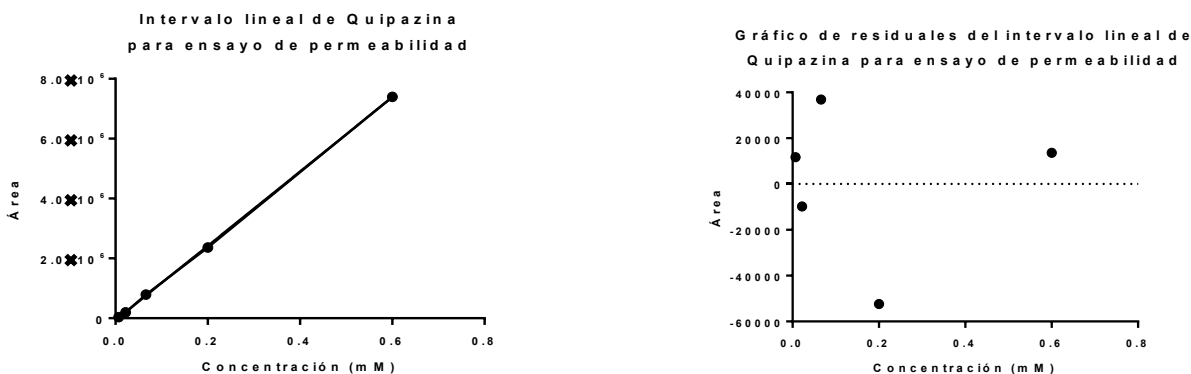


Figura 3. Gráfico de intervalo lineal de QPZ y gráfico de residuales de intervalo lineal de QPZ

1.3 Intervalo de trabajo

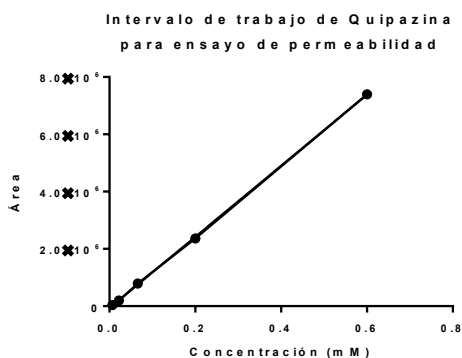


Tabla 2. Parámetros de la recta de intervalo de trabajo

Parámetro	Valor
m	$1.241 \times 10^7 \pm 62736$
b	-63623 ± 17853
Ecuación	$Y = 1.241 \times 10^7 (X) - 62736$
R ²	0.9997

Figura 4. Intervalo de trabajo de QPZ en ensayos de permeabilidad

Tabla 3. Valores de Recuperación y Repetibilidad para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Recuperación (%)	Repetibilidad (CV _r)
0.007	111.42 – 115.71 %	1.57 %
0.022	97.27 – 97.72 %	0.22 %
0.066	93.94 – 104.54 %	4.70 %
0.2	100.0 – 100.5 %	0.23 %
0.6	99.83 – 100.33 %	0.2 %

1.3.1 Evaluación de los factores de peso

Modelo	W _i	Ordenada al origen (a)	Pendiente (b)	r ²	Σ %RE
1	x ⁰	-60919.10	12429368.91	0.999948	0.000000000000000084
2	1/y ^{1/2}	-57780.07	12418859.74	0.999887	0.000000000000000025
3	1/y	-54580.43	12390003.21	0.999650	0.000000000000000047
4	1/y ²	-50084.54	12088951.42	0.997394	0.000000000000000114
5	1/x ^{1/2}	-58851.17	12422609.83	0.999892	0.000000000000000047
6	1/x	-56375.64	12403986.46	0.999707	0.000000000000000066
7	1/x ²	-51867.05	12214508.40	0.998064	0.000000000000000025

1.4 Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)

$$LD = \frac{3.3 \cdot sb_0}{m} = \frac{3.3 \cdot 17853}{1.241 \times 10^7} = 0.004 \text{ mM} \quad LC = \frac{10 \cdot sb_0}{m} = \frac{10 \cdot 17853}{1.241 \times 10^7} = 0.014 \text{ mM}$$

1.5 Recuperación y Sesgo

1.5.1 Recuperación

Tabla 4. Rangos de Recuperación para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Respuesta	Concentración (mM)	Recuperación (%)	Rango
0.007	36087	0.0081	115.71	111.42– 115.71 %
	33774	0.0078	111.42	
	34980	0.0079	112.85	
0.022	203056	0.0215	97.72	97.27– 97.72 %
	202052	0.0214	97.27	
	202973	0.0215	97.72	
0.066	706034	0.0620	93.94	93.94 – 104.54 %
	780263	0.0680	103.03	
	793218	0.0690	104.54	
0.2	2431522	0.201	100.5	100.0 – 100.5 %
	2424106	0.200	100.0	
	2420778	0.200	100.0	
0.6	7373029	0.599	99.83	99.83 – 100.33 %
	7413944	0.602	100.33	
	7403253	0.601	100.16	

1.5.1 Sesgo

Tabla 5. Rangos de Sesgo para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Respuesta	Concentración (mM)	Sesgo (mM)	Rango
0.007	36087	0.0081	0.0019	0.0002 – 0.0019 mM
	33774	0.0078	0.0002	
	34980	0.0079	0.0009	
0.022	203056	0.0215	0.0005	0.0005– 0.0006 mM
	202052	0.0214	0.0006	
	202973	0.0215	0.0005	
0.066	706034	0.0620	0.004	0.002 – 0.004 mM
	780263	0.0680	0.002	
	793218	0.0690	0.003	
0.2	2431522	0.201	0.001	0.0 – 0.001 mM
	2424106	0.200	0.00	
	2420778	0.200	0.00	
0.6	7373029	0.599	0.001	0.001 – 0.002 mM
	7413944	0.602	0.002	
	7403253	0.601	0.001	

1.6 Repetibilidad

Tabla 6. Resultados de Repetibilidad para los niveles alto, medio y bajo del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Respuesta	Concentración (mM)	Recuperación (%)	Resultados
0.6 (Alto)	7373029	0.599	99.83	$\tilde{x} = 100.11 \%$ $s_r = 0.21 \%$ $CV_r = 0.2 \%$
	7413944	0.602	100.33	
	7403253	0.601	100.16	
0.066 (Medio)	706034	0.0620	93.94	$\tilde{x} = 100.59 \%$ $s_r = 4.73 \%$ $CV_r = 4.7 \%$
	780263	0.0680	103.03	
	793218	0.0690	104.54	
0.007 (Bajo)	36087	0.0081	115.71	$\tilde{x} = 113.32 \%$ $s_r = 1.78 \%$ $CV_r = 1.57 \%$
	33774	0.0078	111.42	
	34980	0.0079	112.85	

1.7 Reproducibilidad

Tabla 7. Resultados de Reproducibilidad para el nivel medio del intervalo de trabajo en tres días diferentes.

Día	Respuesta	Concentración (mM)	Recuperación (%)	Resultados
1	706034	0.0620	93.94	$\tilde{x} = 101.06 \%$ $s_R = 4.34 \%$ $CV_R = 4.30 \%$
	780263	0.0680	103.03	
2	793218	0.0690	104.54	
	803661	0.0698	105.75	
3	778926	0.0678	102.72	
	725983	0.0636	96.40	

Anexo II. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de QPZ en ensayos de biotransformación y farmacocinética.

2. Resultados

2.1 Adecuabilidad

Tabla 1. Resultados de adecuabilidad del sistema

	Área	Altura	Tiempo
	599810	35260	3.541
	581193	35146	3.518
	606441	32329	3.591
	617221	32326	3.551
	597004	34581	3.505
	594801	37160	3.526
Promedio	599412	34467	3.538
Desviación	12048	1871	0.03
% CV	2.01	5.4	0.85

2.2 Intervalo lineal

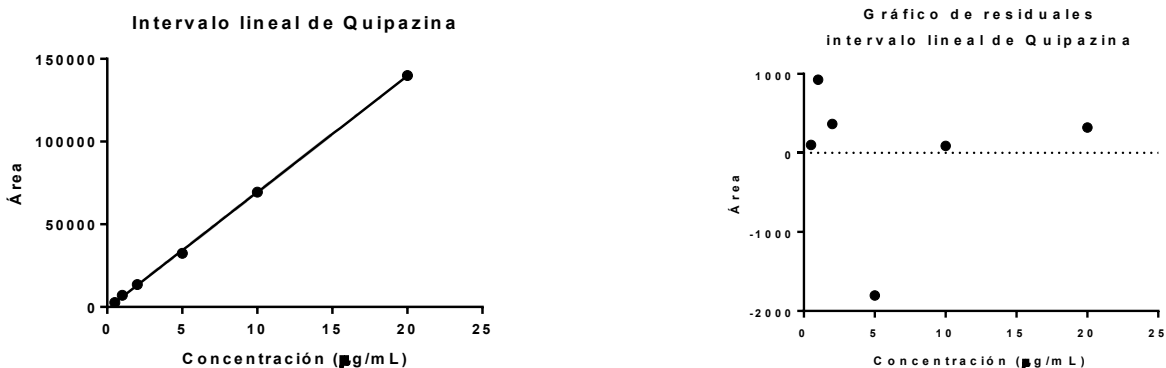


Figura 3. Gráfico de intervalo lineal de QPZ y gráfico de residuales de intervalo lineal de QPZ

2.3 Intervalo de trabajo

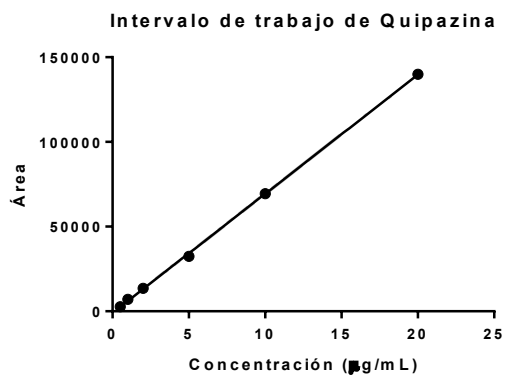


Tabla 2. Parámetros de la recta de intervalo de trabajo

Parámetro	Valor
m	7028 ± 133.6
b	-919.9 ± 1256
Ecuación	$Y = 7028(X) - 919.9$
R ²	0.9942

Figura 4. Intervalo de trabajo de QPZ en ensayos de biotransformación y farmacocinéticos.

Tabla 3. Valores de Recuperación y Repetibilidad para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperación (%)	Repetibilidad (CV_r)
20	92.20 – 101.09 %	3.81 %
10	87.65 – 97.29 %	4.68 %
5	85.37 – 100.39 %	8.15 %
2	78.83 – 89.70 %	6.18 %
1	97.03 – 101.78 %	5.16 %
0.5	95.81 – 116.36 %	9.18 %

2.3.1 Evaluación de los factores de peso

Modelo	W_i	Ordenada al origen (a)	Pendiente (b)	r^2	$\Sigma\%RE$
1	x^0	-2291.59	6822.94	0.995535	0.000000000000000028
2	$1/y^{1/2}$	-1814.46	6709.16	0.995112	0.0000000000000000410
3	$1/y$	-1262.93	6546.02	0.993529	0.0000000000000000056
4	$1/y^2$	-380.06	6044.27	0.986974	0.0000000000000000359
5	$1/x^{1/2}$	-1492.34	6729.13	0.995487	0.00000000000000000571
6	$1/x$	-1020.72	6624.88	0.994202	0.0000000000000000063
7	$1/x^2$	-530.34	6310.22	0.985244	0.0000000000000000036

2.4 Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)

$$LD = \frac{3.3 * sb_0}{m} = \frac{3.3 * 1256}{7028} = 0.58 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \qquad LC = \frac{10 * sb_0}{m} = \frac{10 * 1256}{7028} = 1.78 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

2.5 Recuperación y Sesgo

2.5.1 Recuperación

Tabla 4. Rangos de Recuperación para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (µg/mL)	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Recuperación (%)	Rango
20	141225	20.22	101.09	92.20 – 101.09 %
	137279	19.65	98.28	
	128728	18.44	92.20	
10	67475	9.72	97.29	87.65 – 97.29 %
	60699	8.76	87.65	
	61605	8.89	88.94	
5	29087	4.26	85.37	85.37 – 100.39 %
	34367	5.02	100.39	
	28724	4.22	84.34	
2	10159	1.58	78.83	78.83 – 89.70 %
	10176	1.58	78.95	
	11688	1.79	89.70	
1	5896	0.97	97.03	97.03 – 101.78 %
	5380	0.90	89.69	
	6230	1.02	101.78	
0.5	3169	0.58	116.36	95.38- 116.36%
	2467	0.48	96.38	
	2447	0.48	95.81	

2.5.2 Sesgo

Tabla 5. Rangos de Sesgo para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (µg/mL)	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Sesgo (µg/mL)	Rango
20	141225	20.22	0.22	0.22 – 1.56 µg/mL
	137279	19.65	0.35	
	128728	18.44	1.56	
10	67475	9.72	0.28	0.28 – 1.11µg/mL
	60699	8.76	1.24	
	61605	8.89	1.11	
5	29087	4.26	0.74	0.20 – 0.78 µg/mL
	34367	5.02	0.20	
	28724	4.22	0.78	
2	10159	1.58	0.42	0.21 – 0.42 µg/mL
	10176	1.58	0.42	
	11688	1.79	0.21	
1	5896	0.97	0.03	0.02 – 0.10 µg/mL
	5380	0.90	0.10	
	6230	1.02	0.02	
	3169	0.58	0.08	

0.5	2467	0.48	0.02	0.02 - 0.08 µg/mL
	2447	0.48	0.02	

2.6 Repetibilidad

Tabla 6. Resultados de Repetibilidad para los niveles alto, medio y bajo del intervalo de trabajo.

Nivel (µg/mL)	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Recuperación (%)	Resultados
20 (Alto)	141225	20.22	101.09	$\bar{x} = 97.19 \%$ $s_r = 3.71 \%$ $CV_r = 3.81 \%$
	137279	19.65	98.28	
	128728	18.44	92.20	
10 (Medio)	67475	9.72	97.29	$\bar{x} = 91.29 \%$ $s_r = 4.27 \%$ $CV_r = 4.68 \%$
	60699	8.76	87.65	
	61605	8.89	88.94	
1 (Bajo)	5896	0.97	97.03	$\bar{x} = 96.17 \%$ $s_r = 4.97 \%$ $CV_r = 5.16 \%$
	5380	0.90	89.69	
	6230	1.02	101.78	

2.7 Reproducibilidad

Tabla 7. Resultados de Reproducibilidad para el nivel medio del intervalo de trabajo en tres días diferentes.

Día	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Recuperación (%)	Resultados
1	56898	8.22	82.24	$\bar{x} = 82.5 \%$ $s_R = 4.25 \%$ $CV_R = 5.15 \%$
	57197	8.27	82.67	
2	53681	7.77	77.67	
	59781	8.63	86.34	
3	53301	7.71	77.13	
	61605	8.89	88.94	

Anexo III. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de TR3370 en ensayos de permeabilidad.

3. Resultados

3.1 Adecuabilidad

Tabla 1. Resultados de adecuabilidad del sistema

	Área	Altura	Tiempo
	548170	54152	3.818
	586041	60043	4.003
	585307	60103	3.898
	570583	62807	3.967
	549585	59118	3.881
	572809	59769	4.106
Promedio	568749	59332	3.945
Desviación	16636	2837	0.09
% CV	2.9	4.8	2.4

3.2 Intervalo lineal

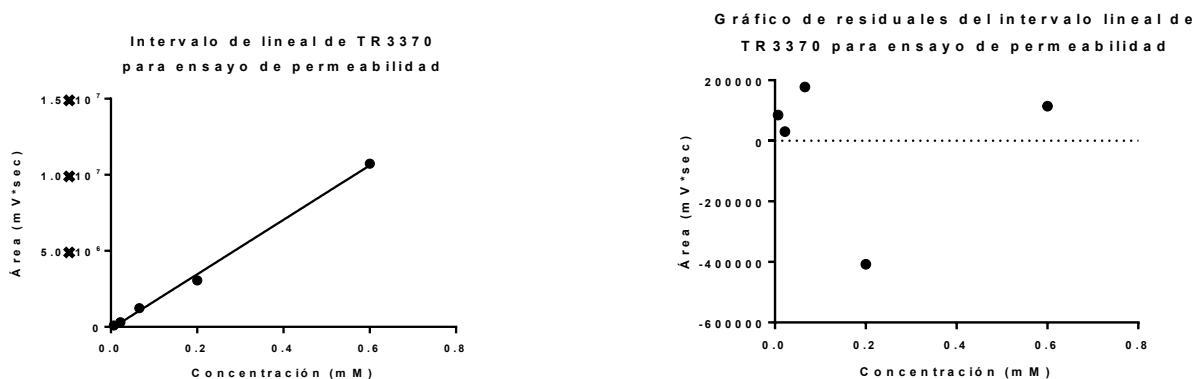


Figura 3. Gráfico de intervalo lineal de QPZ y gráfico de residuales de intervalo lineal de TR3370

3.3 Intervalo de trabajo

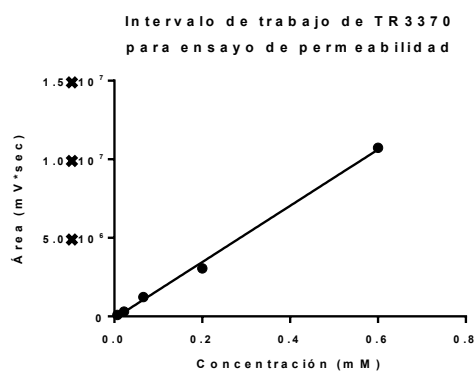


Tabla 2. Parámetros de la recta de intervalo de trabajo

Parámetro	Valor
m	$1.790 \times 10^7 \pm 263781$
b	-122079 ± 75063
Ecuación	$Y = 1.790 \times 10^7 (X) - 122079$
R ²	0.9972

Figura 4. Intervalo de trabajo de TR3370 en ensayos de permeabilidad

Tabla 3. Valores de Recuperación y Repetibilidad para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Recuperación (%)	Repetibilidad (CV _r)
0.007	164.77 – 169.14 %	1.22 %
0.022	109.09 – 104.54 %	1.99 %
0.066	110.61 – 112.12 %	0.64 %
0.2	88.15 – 89.4 %	0.63 %
0.6	100.41 – 100.48 %	0.03 %

3.3.1 Evaluación de los factores de peso

Modelo	W _i	Ordenada al origen (a)	Pendiente (b)	r ²	Σ%RE
1	x ⁰	-122081.96	17899457.48	0.997185	0.000000000000000017
2	1/y ^{1/2}	-62313.93	17629835.99	0.996204	0.000000000000000054
3	1/y	-42883.02	17368142.77	0.994252	0.000000000000000025
4	1/y ²	-30638.42	16637850.33	0.986210	0.000000000000000047
5	1/x ^{1/2}	-62251.58	17658010.24	0.996342	0.000000000000000068
6	1/x	-43242.98	17459016.29	0.994625	0.000000000000000000
7	1/x ²	-34128.67	17075978.58	0.986970	0.000000000000000000

3.4 Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)

$$LD = \frac{3.3 * sb_0}{m} = \frac{3.3 * 75063}{1.790 * 10^7} = 0.013 \text{ mM} \quad LC = \frac{10 * sb_0}{m} = \frac{10 * 75063}{1.790 * 10^7} = 0.041 \text{ mM}$$

3.5 Recuperación y Sesgo

3.5.1 Recuperación

Tabla 4. Rangos de Recuperación para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Respuesta	Concentración (mM)	Recuperación (%)	Rango
0.007	89862	0.012	169.14	164.77 – 169.14 %
	90012	0.012	169.14	
	84373	0.011	164.77	
0.022	301270	0.024	109.09	109.09 – 104.54 %
	300629	0.024	109.09	
	305179	0.023	104.54	
0.066	1247092	0.074	112.12	110.61 – 112.12 %
	1242180	0.074	112.12	
	1221992	0.073	110.61	
0.2	3033714	0.176	88.15	88.15 – 89.40 %
	3039160	0.177	88.30	
	3078110	0.179	89.40	
0.6	10769760	0.608	100.41	100.41 – 100.48 %
	10756115	0.608	100.41	
	10669366	0.603	100.48	

3.5.2 Sesgo

Tabla 5. Rangos de Sesgo para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Respuesta	Concentración (mM)	Sesgo (mM)	Rango
0.007	89862	0.012	0.005	0.004 – 0.005 mM
	90012	0.012	0.005	
	84373	0.011	0.004	
0.022	301270	0.024	0.002	0.001– 0.002 mM
	300629	0.024	0.002	
	305179	0.023	0.001	
0.066	1247092	0.074	0.008	0.007 – 0.008 mM
	1242180	0.074	0.008	
	1221992	0.073	0.007	
0.2	3033714	0.176	0.024	0.021 – 0.024 mM
	3039160	0.177	0.023	
	3078110	0.179	0.021	
0.6	10769760	0.608	0.008	0.003 – 0.008 mM
	10756115	0.608	0.008	
	10669366	0.603	0.003	

3.6 Repetibilidad

Tabla 6. Resultados de Repetibilidad para los niveles alto, medio y bajo del intervalo de trabajo.

Nivel (mM)	Respuesta	Concentración (mM)	Recuperación (%)	Resultados
0.6 (Alto)	10769760	0.608	100.41	$\tilde{x} = 100.43 \%$ $s_r = 0.03 \%$ $CV_r = 0.03 \%$
	10756115	0.608	100.41	
	10669366	0.603	100.48	
0.066 (Medio)	1247092	0.074	112.12	$\tilde{x} = 111.61 \%$ $s_r = 0.71 \%$ $CV_r = 0.64 \%$
	1242180	0.074	112.12	
	1221992	0.073	110.61	
0.022 (Bajo)	301270	0.024	109.09	$\tilde{x} = 107.57 \%$ $s_r = 2.14 \%$ $CV_r = 1.99 \%$
	300629	0.024	109.09	
	305179	0.023	104.54	

3.7 Reproducibilidad

Tabla 7. Resultados de Reproducibilidad para el nivel medio del intervalo de trabajo en tres días diferentes.

Día	Respuesta	Concentración (mM)	Recuperación (%)	Resultados
1	1247092	0.074	112.12	$\tilde{x} = 108.35 \%$ $s_R = 4.28 \%$ $CV_R = 3.96 \%$
	1242180	0.074	112.12	
2	1221992	0.073	110.61	
	1115280	0.069	104.73	
3	1176937	0.072	109.96	
	1123472	0.069	100.54	

Anexo IV. Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de TR3370 en ensayos de biotransformación y farmacocinética.

4 Resultados

4.1 Adecuabilidad

Tabla 1. Resultados de adecuabilidad del sistema

	Área	Altura	Tiempo
	548170	54152	3.818
	586041	60043	4.003
	585307	60103	3.898
	570583	62807	3.967
	549585	59118	3.881
	572809	59769	4.106
Promedio	568749	59332	3.945
Desviación	16636	2837	0.09
% CV	2.9	4.8	2.4

4.2 Intervalo lineal

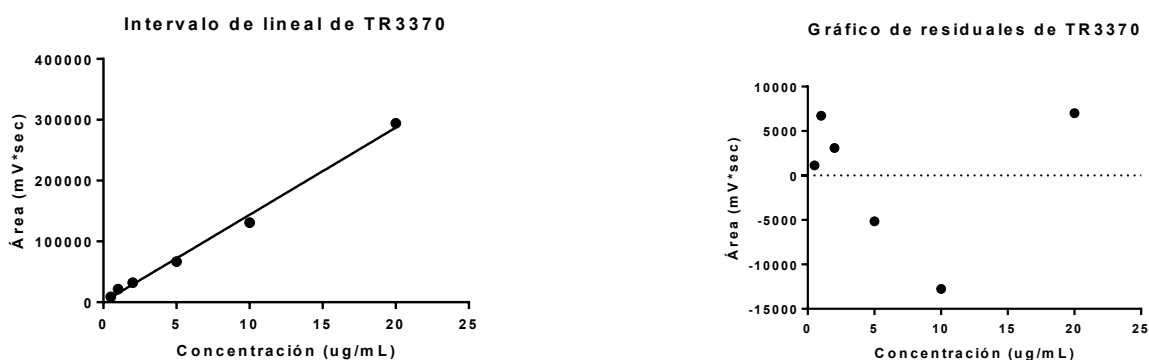
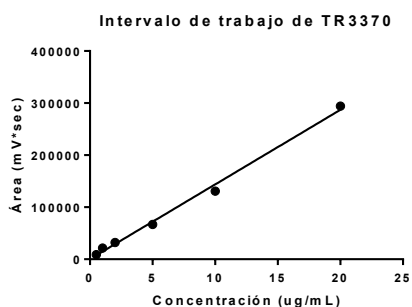


Figura 3. Gráfico de intervalo lineal de QPZ y gráfico de residuales de intervalo lineal de TR3370

4.3 Intervalo de trabajo



Parámetro	Valor
M	14325 ± 258.8
B	493 ± 2433
Ecuación	Y = 14325 (X) + 493
R ²	0.9948

Tabla 2. Parámetros de la recta de intervalo de trabajo

Figura 4. Intervalo de trabajo de TR3370 en ensayos de biotransformación y farmacocinéticos.

Tabla 3. Valores de Recuperación y Repetibilidad para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (µg/mL)	Recuperación (%)	Repetibilidad (CV _r)
20	93.35 – 101.60 %	4.05 %
10	92.10 – 101.90 %	4.06 %
5	88.20 – 93.20 %	2.37 %
2	103.50 – 112.0 %	3.25 %
1	110.0 – 114.0 %	1.53 %
0.5	105.3 – 122.0 %	6.02 %

3.3.1 Evaluación de los factores de peso

Modelo	W _i	Ordenada al origen (a)	Pendiente (b)	r ²	Σ%RE
1	x ⁰	-122081.96	17899457.48	0.997185	0.000000000000000014
2	1/y ^{1/2}	-62313.93	17629835.99	0.996204	0.0000000000000000135
3	1/y	-42883.02	17368142.77	0.994252	0.000000000000000025
4	1/y ²	-30638.42	16637850.33	0.986210	0.000000000000000047
5	1/x ^{1/2}	-62251.58	17658010.24	0.996342	0.000000000000000083
6	1/x	-43242.98	17459016.29	0.994625	0.0000000000000000439
7	1/x ²	-34128.67	17075978.58	0.986970	0.000000000000000073

4.4 Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)

$$LD = \frac{3.3 * sb_0}{m} = \frac{3.3 * 2433}{14325} = 0.56 \mu\text{g/mL} \quad LC = \frac{10 * sb_0}{m} = \frac{10 * 2433}{14325} = 1.69 \mu\text{g/mL}$$

4.5 Recuperación y Sesgo

4.5.1 Recuperación

Tabla 4. Rangos de Recuperación para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (µg/mL)	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Recuperación (%)	Rango
20	293227	20.42	102.1	93.35 – 101.60 %
	291875	20.32	101.6	
	296904	18.67	93.3	
10	146366	10.19	101.9	92.10 – 101.90 %
	141594	9.85	98.5	
	132325	9.21	92.1	
5	67018	4.66	93.2	88.20 – 93.20 %
	63340	4.41	88.2	
	66221	4.61	92.2	
2	31320	2.18	109.0	103.50 – 112.0 %
	32203	2.24	112.0	
	29869	2.07	103.5	
	16483	1.14	114.0	

1	15893	1.11	111.0	110.0 – 114.0 %
	15157	1.10	110.0	
0.5	8243	0.54	105.3	105.3 – 122.0 %
	9315	0.61	122.0	
	8792	0.58	115.8	

4.5.2 Sesgo

Tabla 5. Rangos de Sesgo para los niveles de concentración del intervalo de trabajo.

Nivel (µg/mL)	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Sesgo (µg/mL)	Rango
20	293227	20.42	0.42	0.32 – 1.33 µg/mL
	291875	20.32	0.32	
	296904	18.67	1.33	
10	146366	10.19	0.19	0.15 – 0.79 µg/mL
	141594	9.85	0.15	
	132325	9.21	0.79	
5	67018	4.66	0.34	0.34 – 0.59 µg/mL
	63340	4.41	0.59	
	66221	4.61	0.39	
2	31320	2.18	0.18	0.07 – 0.24 µg/mL
	32203	2.24	0.24	
	29869	2.07	0.07	
1	16483	1.14	0.14	0.10 – 0.14 µg/mL
	15893	1.11	0.11	
	15157	1.10	0.10	
0.5	8243	0.54	0.04	0.08 – 0.11 µg/mL
	9315	0.61	0.11	
	8792	0.58	0.08	

4.6 Repetibilidad

Tabla 6. Resultados de Repetibilidad para los niveles alto, medio y bajo del intervalo de trabajo.

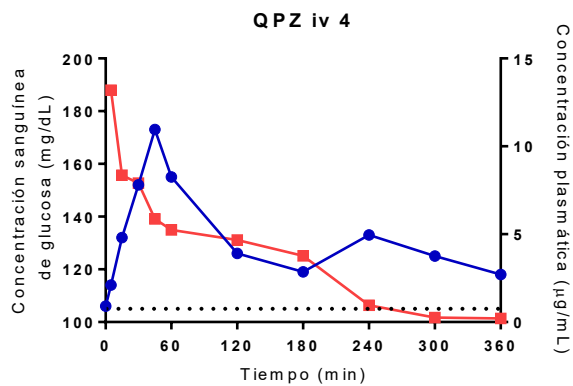
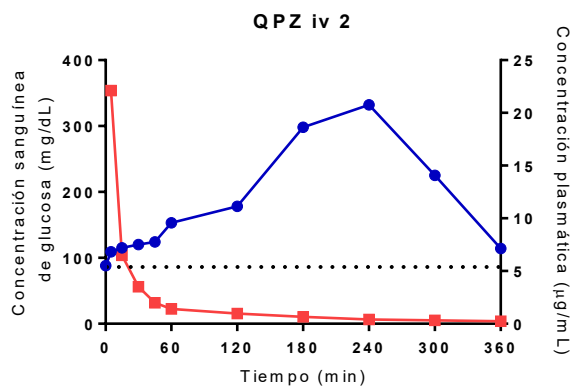
Nivel (µg/mL)	Respuesta	Concentración (µg/mL)	Recuperación (%)	Resultados
20 (Alto)	293227	20.42	102.10	$\bar{x} = 99.01 \%$ $s_r = 4.01 \%$ $CV_r = 4.05 \%$
	291875	20.32	101.60	
	296904	18.67	93.35	
10 (Medio)	146366	10.19	101.90	$\bar{x} = 97.5 \%$ $s_r = 4.06 \%$ $CV_r = 4.17 \%$
	141594	9.85	98.50	
	132325	9.21	92.10	
1 (Bajo)	16483	1.14	114.00	$\bar{x} = 111.16 \%$ $s_r = 1.70 \%$ $CV_r = 1.53 \%$
	15893	1.11	111.00	
	15157	1.10	110.00	

4.7 Reproducibilidad

Tabla 7. Resultados de Reproducibilidad para el nivel medio del intervalo de trabajo en tres días diferentes.

Día	Respuesta	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperación (%)	Resultados
1	118821	8.27	82.73	$\bar{x} = 92.81 \%$ $s_R = 6.21 \%$ $CV_R = 6.69 \%$
	146366	10.19	101.93	
2	128359	8.94	89.38	
	132325	9.21	92.14	
3	141594	9.85	98.60	
	132248	9.21	92.10	

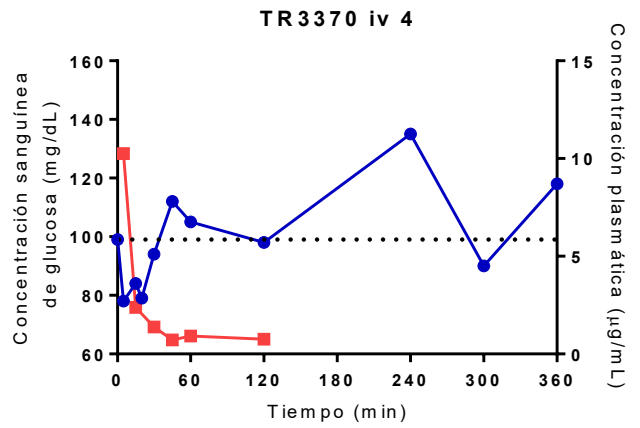
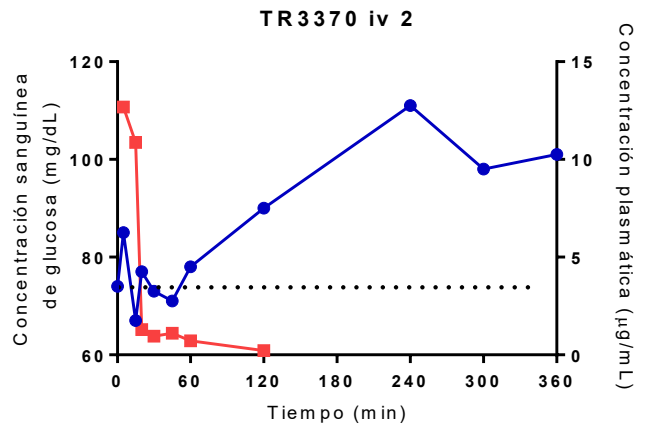
Anexo V. Relación de los niveles de glicemia con la concentración plasmática de QPZ y TR3370.



QPZ iv 6

C

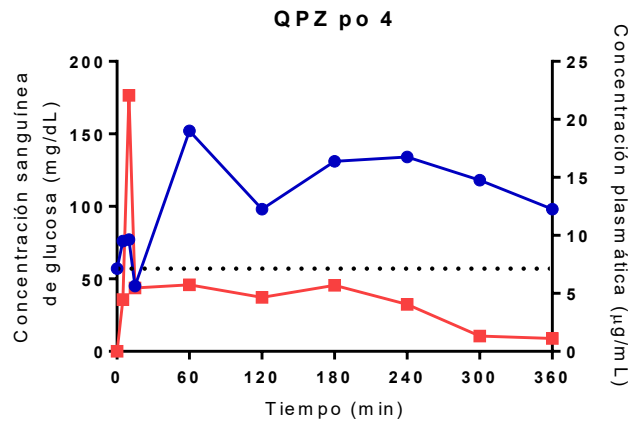
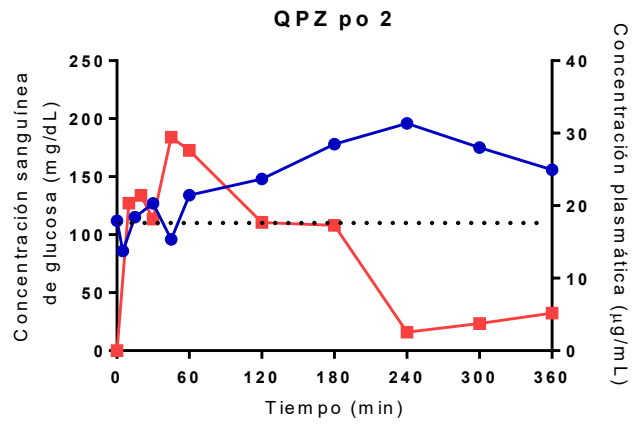
Figura 1. Relación entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ después de una administración intravenosa. (●) Niveles de glicemia (■) Concentración plasmática de QPZ.



TR3370 iv 6

C

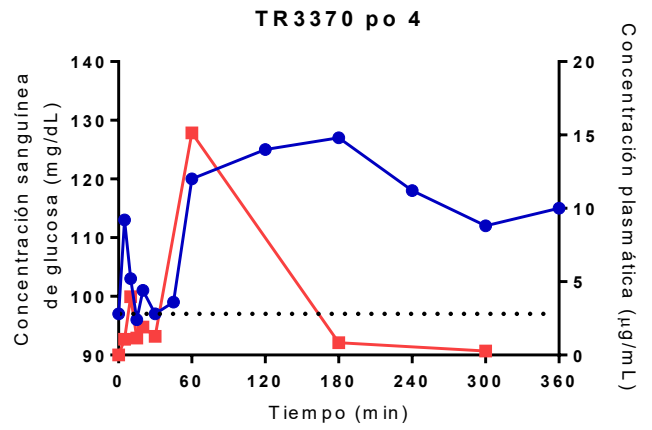
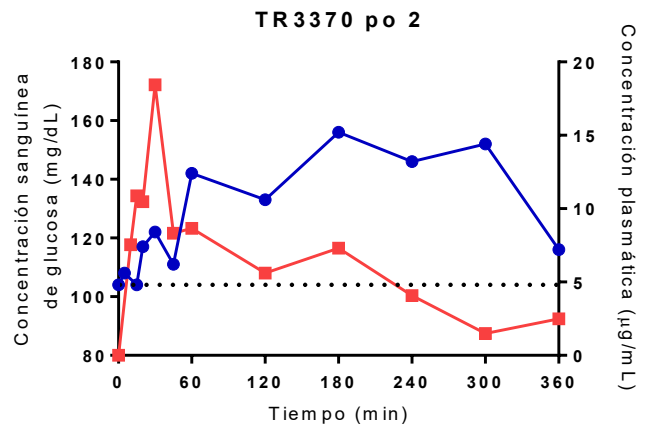
Figura 2. Relación entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de TR3370 después de una administración intravenosa. (●) Niveles de glicemia (■) Concentración plasmática de TR3370.



QPZ po 6

C

Figura 3. Relación entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ después de una administración oral. (●) Niveles de glicemia (■) Concentración plasmática de QPZ.

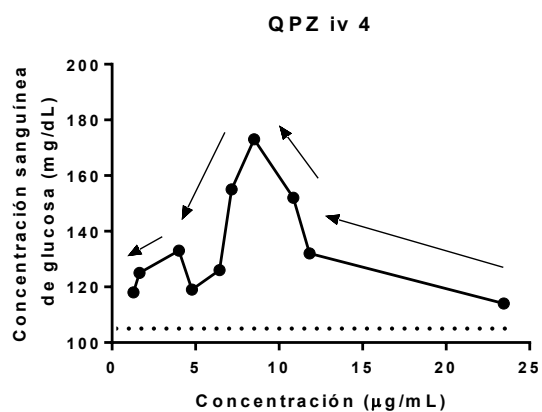
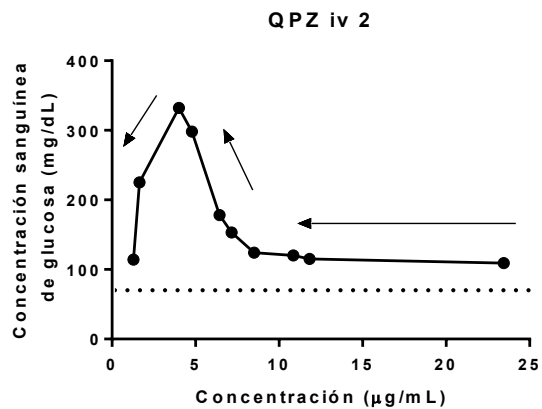


TR3370 po 6

C

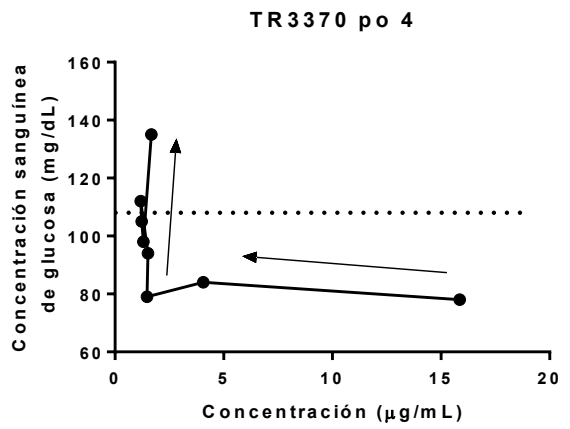
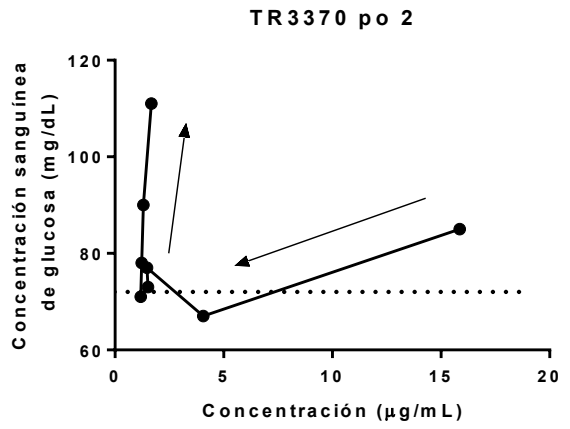
Figura 4. Relación entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de TR3370 después de una administración oral. (●) Niveles de glicemia (■) Concentración plasmática de TR3370.

Anexo VI. Asas de histéresis individuales de los niveles de glicemia con la concentración plasmática de QPZ y TR3370



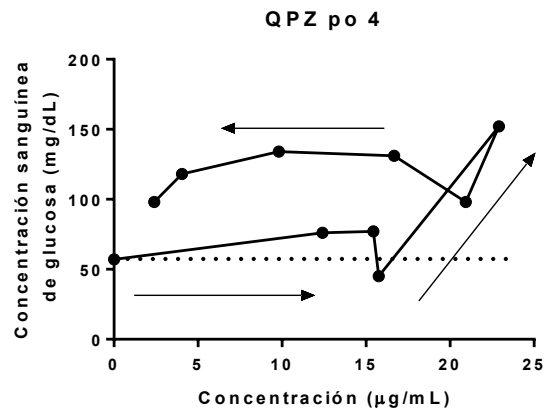
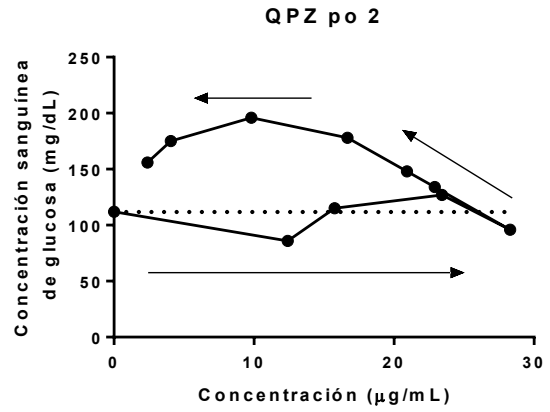
QPZ iv 6

Figura 1. Asas de histéresis entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ después de una administración intravenosa. La línea punteada indica los niveles basales de glicemia.



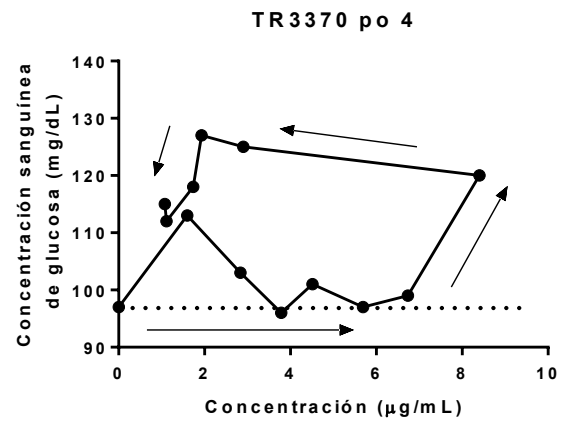
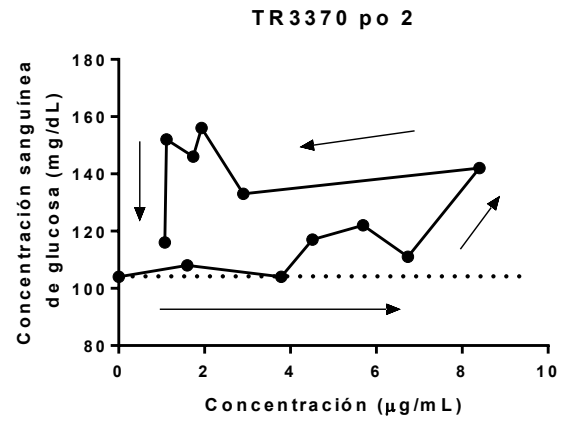
TR3370 po 6

Figura 2. Asas de histéresis entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de TR3370 después de una administración intravenosa. La línea punteada indica los niveles basales de glicemia.



QPZ po 6

Figura 3. Asas de histéresis entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de QPZ después de una administración oral. La línea punteada indica los niveles basales de glicemia.



TR3370 po 6

Figura 4. Asas de histéresis entre los niveles de glicemia y la concentración plasmática de TR3370 después de una administración oral. La línea punteada indica los niveles basales de glicemia.



**FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/243/17
ASUNTO: DICTA MEN**

**DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

Presente

Por éste medio 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 su protocolo:

“Perfil farmacocinético de la quipazina y un derivado en sangre de rata”

con las correcciones solicitadas.

Le reiteramos que la revisión de los protocolos no puede efectuarse sí no se entregan física y electrónicamente.

No. de animales empleados en el estudio: 96 Ratas Wistar machos

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, Ciudad de México a 7 de septiembre del 2017

At: Isabel Gracia Mora

**M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente**

c.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaría Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.



**FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/220-2/17
ASUNTO: DICTAMEN**

DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
Presente

Por éste medio 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 su protocolo:

“Determinación del perfil neurofarmacológico de la piperina ”

con las correcciones solicitadas.

Le reiteramos que la revisión de los protocolos no puede efectuarse sí no se entregan física y electrónicamente.

No. de animales empleados en el estudio: 42 Ratones ICR machos

Emitiendo el dictamen de: APROBADO

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 7 de septiembre del 2017

Ats. Isabel Gracia Mora

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente

c.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaría Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.