



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud
Investigación Clínica Experimental en Salud
Instituto Nacional de Pediatría
Farmacología Clínica

**EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN EN SOLUCIÓN ORAL DE
TEOFILINA PARA ENFERMEDADES RESPIRATORIAS EN EL ÁREA
PEDIÁTRICA**

TESIS

Que para optar por el grado de:
Maestra en Ciencias

PRESENTA

Q.F.B. Mónica Janette Cervantes Arellano

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Juan Luis Chávez Pacheco
Instituto Nacional de Pediatría

COMITÉ TUTOR

Dra. María Josefa Bernad Bernad
M. en I. Liliana Aguilar Contreras
Facultad de Química, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| OBJETIVOS | 12 |
| I. OBJETIVO GENERAL | 12 |
| II. OBJETIVOS PARTICULARES | 12 |
| CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO | 14 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1.2 ESTUDIO DE UTILIZACIÓN DE MEDICAMENTOS | 15 |
| 1.3 TEOFILINA | 17 |
| 1.3.1 BRONCODILADORES | 17 |
| 1.3.1.1 METILXANTINAS | 17 |
| 1.3.1.1.1 TEOFILINA | 17 |
| 1.3.1.1.1.1 USO DE TEOFILINA EN EL ÁREA PEDIÁTRICA | 18 |
| 1.3.1.1.1.1.1 APNEA DEL PREMATURO | 18 |
| 1.3.1.1.1.1.2 ASMA | 19 |
| 1.3.1.1.1.2 FARMACODINAMIA | 20 |
| 1.3.1.1.1.3 DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN | 21 |
| 1.3.1.1.1.4 FARMACOCINÉTICA | 21 |
| 1.3.1.1.1.5 CONTRAINDICACIONES | 22 |
| 1.3.1.1.1.6 REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS | 23 |
| 1.3.1.1.1.7 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS | 23 |
| 1.3.1.1.1.8 CARCINOGENESIS, MUTAGENESIS, TERATOGENESIS Y EFECTOS SOBRE LA FERTILIDAD | 23 |
| 1.3.1.1.1.9 FORMAS FARMACÉUTICAS EN EL MERCADO | 24 |
| 1.3.1.1.1.10 NUEVA FORMULACIÓN | 27 |
| 1.4 BIODISPONIBILIDAD | 29 |
| 1.5 VALIDACIÓN | 29 |
| 1.6 MODELO EXPERIMENTAL | 29 |
| 1.7 MODELOS ANIMALES DE ASMA ALÉRGICA | 30 |
| 1.7.1 MODELOS DE ASMA ALÉRGICA EN EL RATÓN | 31 |
| CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA | 33 |
| 2.1 GENERALIDADES | 33 |
| 2.2 MEDICAMENTO | 33 |
| 2.3 EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO | 33 |
| 2.3.1 CONDICIONES DEL EQUIPO CROMATOGRÁFICO Y DEL SISTEMA. | 34 |
| 2.3.2 ESTÁNDARES | 35 |
| 2.4 MODELO ANIMAL: CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA Y ALOJAMIENTO | 35 |
| 2.5 EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO: MODELO ANIMAL | 36 |
| 2.5.1 SENSIBILIZACIÓN DEL MODELO MURINO "ESTUDIO PILOTO" | 36 |

| | | |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.2 | SENSIBILIZACIÓN DEL MODELO MURINO “ESTUDIO COMPLETO” | 37 |
| 2.5.3 | MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN | 39 |
| 2.5.4 | MODELO FARMACODINÁMICO | 42 |
| 2.5.4.1 | SATURACIÓN DE OXÍGENO (SpO2) Y PULSACIONES POR MINUTO | 43 |
| 2.5.4.2 | MEDICIÓN DE INMUNOGLOBULINAS (IgE). MÉTODO ELISA | 43 |
| 2.5.4.3 | HEMATOCRITO | 44 |
| 2.5.4.4 | HEMOGLOBINA EN SANGRE | 44 |
| 2.5.4.5 | CORTES HISTOLÓGICOS. HISTOPATOLOGÍA | 44 |
| 2.5.4.6 | GLUCOSA | 44 |
| 2.5.5 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE DATOS | 45 |
| 2.5.6 | ÉTICA | 45 |
| CAPÍTULO 3. RESULTADOS | | 47 |
| 3.1 | ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO | 47 |
| 3.2 | VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO | 49 |
| 3.3 | MODELO ANIMAL “ESTUDIO PILOTO” | 51 |
| 3.3.1 | SENSIBILIZACIÓN DE RATONES BALB/C | 51 |
| 3.3.2 | ANESTESIA DE LOS RATONES BALB/C | 52 |
| 3.3.3 | CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES | 53 |
| 3.3.4 | MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN | 54 |
| 3.3.4.1 | CINÉTICA DEL ESTUDIO | 54 |
| 3.3.5 | MODELO FARMACODINÁMICO | 55 |
| 3.3.5.1 | OXIMETRÍA | 55 |
| 3.3.5.1.1 | SATURACIÓN DE OXÍGENO | 55 |
| 3.3.5.1.2 | PULSACIONES POR MINUTO | 56 |
| 3.3.5.2 | MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA) | 58 |
| 3.3.5.3 | ÍNDICE DE HEMATOCRITO | 58 |
| 3.3.5.4 | HEMOGLOBINA | 59 |
| 3.3.5.5 | CORTES HISTOPATOLÓGICOS | 60 |
| 3.3.5.6 | GLUCOSA | 61 |
| 3.3.6 | CAMBIOS HECHOS AL PILOTO: ENMIENDAS AL ESTUDIO | 62 |
| 3.4 | MODELO ANIMAL: ESTUDIO COMPLETO | 62 |
| 3.4.1 | CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES | 62 |
| 3.4.2 | MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN | 63 |
| 3.4.3 | MODELO FARMACODINÁMICO | 65 |
| 3.4.3.1 | OXIMETRÍA | 65 |
| 3.4.3.1.1 | SATURACIÓN DE OXÍGENO | 65 |
| 3.4.3.1.2 | PULSACIONES POR MINUTO | 66 |
| 3.4.3.2 | MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA) | 67 |
| 3.4.3.3 | ÍNDICE DE HEMATOCRITO | 68 |
| 3.4.3.4 | HEMOGLOBINA | 69 |
| 3.4.3.5 | CORTES HISTOPATOLÓGICOS: HISTOPATOLOGÍA | 69 |
| 3.4.3.6 | GLUCOSA | 70 |
| CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN | | 73 |
| 4.1 | ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO | 73 |
| 4.2 | VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO | 73 |

| | | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3 | MODELO ANIMAL “ESTUDIO PILOTO” | 73 |
| 4.3.1 | SENSIBILIZACIÓN DE RATONES BALB/C | 73 |
| 4.3.1.1 | ANESTESIA DE LOS RATONES BALB/C | 73 |
| 4.3.2 | CURVA DE CRECIMIENTO | 74 |
| 4.3.3 | MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN | 74 |
| 4.3.3.1 | TOMA Y RECOLECCIÓN DE MUESTRA | 74 |
| 4.3.4 | CINÉTICA DEL ESTUDIO | 75 |
| 4.3.5 | MODELO FARMACODINÁMICO | 75 |
| 4.3.5.1 | OXIMETRÍA | 75 |
| 4.3.5.1.1 | SATURACIÓN DE OXÍGENO | 75 |
| 4.3.5.1.2 | PULSACIONES POR MINUTO | 76 |
| 4.3.5.2 | MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA) | 76 |
| 4.3.5.3 | ÍNDICE DE HEMATOCRITO | 76 |
| 4.3.5.4 | HEMOGLOBINA | 77 |
| 4.3.5.5 | CORTES HISTOPATOLÓGICOS | 77 |
| 4.3.5.6 | GLUCOSA | 77 |
| 4.3.5.7 | CAMBIOS HECHOS AL PILOTO: ENMIENDAS AL ESTUDIO | 77 |
| 4.4 | MODELO ANIMAL: ESTUDIO COMPLETO | 78 |
| 4.4.1 | CURVA DE CRECIMIENTO | 78 |
| 4.4.2 | MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN | 78 |
| 4.4.3 | MODELO FARMACODINÁMICO | 79 |
| 4.4.3.1 | OXIMETRÍA | 79 |
| 4.4.3.1.1 | SATURACIÓN DE OXÍGENO | 79 |
| 4.4.3.1.2 | PULSACIONES POR MINUTO | 80 |
| 4.4.3.2 | MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA) | 80 |
| 4.4.3.3 | ÍNDICE DE HEMATOCRITO | 80 |
| 4.4.3.4 | HEMOGLOBINA | 81 |
| 4.4.3.5 | CORTES HISTOPATOLÓGICOS: HISTOPATOLOGÍA | 81 |
| 4.4.3.6 | GLUCOSA | 81 |
| CAPÍTULO 5. | CONCLUSIONES | 83 |
| 5.1 | ESTUDIO PILOTO | 83 |
| 5.2 | ESTUDIO COMPLETO | 84 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 86 |
| ANEXOS | | 89 |
| ANEXO 1. | Parámetros de validación | 89 |
| ANEXO 2. | Metodología de extracción y procesamiento de muestras en UPLC-MS/MS | 90 |
| ANEXO 3. | Toma de muestra y determinación de inmunoglobulina E (IgE) | 91 |
| ANEXO 4. | Medición de hematocrito | 92 |
| ANEXO 5. | Cuantificación de hemoglobina | 93 |
| ANEXO 6. | Metodología para la tinción de pulmón de ratón Balb/c | 94 |

RESUMEN

Evaluación de una formulación en solución oral de teofilina para enfermedades respiratorias en el área pediátrica.

Introducción.

La farmacia hospitalaria en México presenta una deficiencia en el tratamiento para pacientes pediátricos, debido a la falta de medicamentos diseñados especialmente para esta población es común utilizar formulas extemporáneas o fraccionar las presentaciones para adultos reajustando la dosis, volviéndose un problema por la falta de información sobre compatibilidad y estabilidad del producto al modificar su forma farmacéutica y su uso en la población pediátrica. Se realizó un análisis retrospectivo de la recopilación de datos de dosificación en un Hospital de Tercer Nivel de Atención en el área pediátrica, correspondientes a un periodo de abril del 2002 a noviembre del 2012, donde se observó que teofilina es el tercer fármaco mayormente prescrito con 5807 dosis de 54834 dosis analizadas. Por ello, se desarrolló una forma farmacéutica en solución oral con teofilina para el uso pediátrico, sin embargo, es necesario realizar estudios preclínicos que demuestren la seguridad, eficacia y calidad del nuevo medicamento antes de su comercialización.

Objetivos.

Comparar la concentración plasmática y el efecto terapéutico de una nueva solución oral de teofilina contra una solución intravenosa con teofilina, para determinar la biodisponibilidad absoluta y la efectividad.

Metodología.

El método se realizó mediante un estudio *in vivo*, usando cinco grupos de ratones Balb/c (Grupo 1. Sanos, Grupo 2. Enfermos, Grupos 3. Enfermos en tratamiento con solución oral, Grupo 4. Enfermos en tratamiento con sólido oral, Grupo 5. Sano con administración del tratamiento para observar tratamiento), integrados por 20 animales cada uno. Los grupos 2 al 4 se sensibilizaron con dos inyecciones de ovoalbúmina (OVA), vía intraperitoneal de 100µg sin presencia de coadyuvante y se expuso a cada ratón a nueve dosis intranasales de OVA de 500 µg en los días 14, 27, 28, 29, 47, 61, 73, 74 y 75, sin anestesia con el fin de generar un modelo de insuficiencia respiratoria. Para el grupo 1 y 5 (control sano) solo se administró solución salina isotónica intraperitoneal o intranasal según sea el caso. Se midieron los niveles de saturación de oxígeno (SpO2) y pulsaciones por minuto (), presión arterial, nivel de hematocrito, hemoglobina para evaluar la oxigenación; glucosa para monitorear los eventos adversos; inmunoglobulina E y evaluación de cortes histopatológicos para demostrar que el modelo ha sido sensibilizado; cuantificación de teofilina a diferentes tiempos en sangre de ratón para el monitoreo de la farmacocinética.

El análisis de los datos se realizó mediante estadística descriptiva con el fin de establecer las características de los grupos. Se evaluó cada uno de los grupos, comparándolos entre sí, mediante pruebas estadísticas paramétricas. En el caso de la farmacocinética se analizaron los resultados mediante el programa Winnonlin versión 2.1.

Resultados.

Posterior a las enmiendas del estudio piloto, en el estudio completo se evaluaron ratones Balb/c de 22.9 semanas de edad, con un peso promedio de 25 g, obteniéndose una respuesta normal en variables como saturación de oxígeno, pulsaciones por minuto, hemoglobina e índice de hematocrito. En la medición de inmunoglobulina E se obtuvieron las medianas de absorbancia

para cada uno, grupo SN absorbancia pre=0.3437 nm post=0.3881 nm; grupo EM absorbancia pre=0.2986 nm, post=0.7519 nm; grupo ER absorbancia pre=0.2821 nm, post=0.4516 nm; grupo EP absorbancia pre=0.3285 nm, post=0.5033 nm y grupo ST absorbancia pre=0.2889 nm, post=0.3875 nm. En los cortes histológicos se observaron respuestas normales para los grupos sanos e infiltrados celulares para los grupos sensibilizados. Los niveles de glucosa tienen los siguientes rangos grupo SN 135.00 (133.00-151.00), grupo EM 142.00 (125.50-148.00), grupo ER 152.00 (136.00-162.50), grupo EP 129.00 (121.75-158.75), grupo ST 111.00 (95.00-127.50). La farmacocinética presentó problemas técnicos, por lo que, solo se evaluaron dos ratones de los grupos tratados, los cuales presentaron los siguientes parámetros farmacocinéticos $T_{\text{máx}}= 819 \pm 301.04$ ng/mL, $C_{\text{máx}}= 819.86 \pm 301.04$, área bajo la curva= 1436.54 ± 444.35 , tiempo de ida media de eliminación= 0.9139 ± 1.510 para la solución oral; $T_{\text{máx}}= 50 \pm 2.8$ ng/mL, $C_{\text{máx}}= 4842.42 \pm 4714.43$, área bajo la curva= 5650.78 ± 5785.34 , tiempo de ida media de eliminación= 0.4921 ± 0.6952 para la solución IV.

Discusión.

Las variables destinadas a la medición de niveles de oxígeno se mantuvieron normales debido a que la respuesta hipóxica no se mantiene latente a lo largo del tiempo, está presente al contacto con alérgeno. Los niveles de inmunoglobulina E y cortes histopatológicos demuestran que existe una respuesta alérgica, por lo que el modelo está sensibilizado, el control positivo es el que muestra mayor cantidad de infiltrados con respecto a los grupos enfermos tratados con teofilina. Es necesario evaluar por qué la glucosa disminuye en el caso del grupo sano tratado, la literatura marca un aumento. La farmacocinética de la nueva formulación presenta una concentración máxima de 819.86 ± 301.04 aproximadamente a la media hora, sin embargo, los resultados son muy variables, por ello, es necesario terminar de procesar a todos los animales.

Conclusión.

Los niveles de hipoxia son visibles solo en presencia del alérgeno, en este caso no se pudo observar esa disminución. Se demostró que el modelo fue sensibilizado y que la respuesta de infiltración celular se redujo al administrar el medicamento. Los parámetros farmacocinéticos en el modelo animal tienen una amplia variación, por lo que, es necesario terminar la cuantificación de los demás sujetos de investigación, presuntivamente se puede observar que la concentración máxima de teofilina oscila entre la media hora y los 45 min. Por lo cual tiene una absorción alta.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En el mercado mexicano y en los hospitales se presentan limitantes al tratar y prescribir a pacientes pediátricos, debido a la deficiencia de medicamentos para esta población; las razones varían tanto en costos como por la no existencia de éstos en una presentación infantil, por ello, es común utilizar fórmulas extemporáneas o fraccionar las presentaciones diseñadas para adulto, reajustando la dosis.

El fraccionamiento de medicamentos diseñados para adultos es un problema por la falta de información y datos sobre compatibilidad y estabilidad del producto cuando se modifica su forma farmacéutica, así mismo, por la carencia de estudios de estos medicamentos, en la población pediátrica. Se sabe que, cualquier manipulación del producto tiene el potencial de introducir errores en la dosificación, cambiar la disponibilidad del fármaco o administrar al infante excipientes no seguros y/o concentraciones excesivas de éstos, aumentando la probabilidad de presentar reacciones adversas, ausencia de efectividad en el tratamiento, cambios farmacocinéticos como la absorción del fármaco, entre otras⁽¹⁻⁴⁾.

Los niños son más susceptibles a la aparición de errores en la administración de medicamentos, por tanto, es necesario extremar la vigilancia para conseguir los mejores resultados terapéuticos con menor riesgo. Del mismo modo, los estudios señalan que aproximadamente el 50% de los fármacos empleados en niños se utilizan en condiciones diferentes a las autorizadas, aumentando el riesgo para el paciente⁽⁵⁾. A lo anterior, empresas farmacéuticas y laboratorios de investigación se encuentran en la búsqueda de nuevas formulaciones para el suministro de fármacos en el área pediátrica, tomando en cuenta factores tales como: dosis, vías de administración y aspecto socioeconómico.

Un análisis retrospectivo de la recopilación de datos de dosificación en el área pediátrica, de un Hospital de Tercer Nivel de Atención, en el periodo comprendido de abril de 2002 a noviembre de 2012, arrojó la siguiente información. De las 54834 dosis evaluadas, se encontraron entre los fármacos mayormente prescritos: omeprazol, furosemida, teofilina, espironolactona y sildenafil. En la clasificación por grupos terapéuticos con mayor dosificación estuvieron: diuréticos, antiulcerosos, antihipertensivos, broncodilatadores, deficiencias de folato, antiácidos, estimulante del Sistema Nervioso Central (SNC), antivirales y antiepilépticos⁽⁶⁾.

Posterior a este estudio, se mostró especial interés en la teofilina, fármaco usado como tratamiento para las sibilancias, falta de aire y opresión en el pecho, causada por asma, bronquitis crónica, enfisema y otras enfermedades pulmonares. De acuerdo con UpToDate⁽⁷⁾, principalmente se prescribe para el tratamiento pediátrico de apnea y bradicardia en recién nacidos prematuros y asma persistente.

La apnea del recién nacido es el cese de la respiración por más de 20 segundos o bien, un cese de la respiración menor a 20 segundos si es acompañado de bradicardia o desaturación de oxígeno en niños nacidos antes de las 37 semanas de gestación. Esta patología generalmente mantiene a los niños prematuros en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales por periodos prolongados, esta incidencia aumenta a medida que la edad gestacional disminuye. La mortalidad por apnea en el prematuro según reportes llega a ser hasta 60% y de los sobrevivientes cerca del 20% pueden presentar secuelas neurológicas. En presencia de apnea del prematuro se recomienda iniciar el esquema de administración de aminofilina o teofilina, según la Guía de Referencia Rápida, Manejo del Recién Nacido Prematuro Sano en la sala de prematuros^(8,9).

Con respecto al asma; es un trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias, éste ocasiona inflamación y ensanchamiento, hace que se presenten sibilancias, dificultad respiratoria, opresión en el pecho y tos. Es causada por la hinchazón (inflamación) de las vías respiratorias. Durante un ataque de asma, los músculos que rodean las vías respiratorias se vuelven rígidos. El revestimiento de los conductos aéreos se hincha, en consecuencia, puede pasar menos aire⁽¹⁰⁾. La importancia de esta patología radica en el carácter de enfermedad crónica que afecta la calidad de vida, al ausentismo escolar y en los elevados costos sanitarios que genera. Se estima que un alto porcentaje del costo que origina el asma está ocasionado por un control inadecuado. La trascendencia de esta patología se destaca en su elevada prevalencia (8 y 20%) y su gran variabilidad. La aminofilina es útil en crisis de asma grave cuando existe mala respuesta a los B2-agonistas y esteroides⁽⁹⁾.

Cabe señalar que entre las metilxantinas que se prescriben para apnea del prematuro se encuentra la cafeína que en estudios de revisiones publicadas en Cochrane no se encontró una diferencia significativa en la tasa de fracaso (<50% de reducción en la apnea/ bradicardia) entre el tratamiento con teofilina o cafeína a tres días de tratamiento (dos estudios RR=1.35, IC_{95%}=0.41, 4.52) y de 5 a 7 días (un estudio RR=1.50, IC_{95%}=0.32, 7.14), sin embargo, la calidad de la evidencia es baja, los resultados de dicha revisión deben ser interpretados con precaución, debido a que el tamaño de la muestra en cada estudio es pequeño, existe cierta variabilidad en las características de los participantes en términos de edad y estado clínico⁽¹¹⁾.

Algunos medicamentos para enfermedades respiratorias como la apnea del prematuro y/o asma persistente, no cuentan con una presentación oral para el área pediátrica en México, tal es el ejemplo de la teofilina, si bien, existen alternativas farmacéuticas en otros países estas no son accesibles para la población mexicana en cuanto a costos o han sido retirados del mercado por presentar un riesgo a la población (ej. elixires de teofilina).

Debido a que no existen opciones farmacológicas diseñadas para pacientes pediátricos, el apego al tratamiento se vuelve difícil, generalmente, la dosificación se realiza utilizando medicamentos diseñados para adultos, fraccionando las tabletas que un infante no siempre puede deglutir, o bien, usando los polvos de las cápsulas, pulverizando tabletas y re-suspendiéndolos en agua, sin considerar la solubilidad del fármaco y sus excipientes en este vehículo, ocasionando en ambos casos un error en la medicación por sobredosificación (intoxicación) o sub-dosificación (ineficacia terapéutica).

De acuerdo con las regulaciones farmacéuticas, es preciso hacer diversos estudios (preclínicos y clínicos) antes de sacar un medicamento a la venta o para el uso en pacientes con el padecimiento a tratar.

La finalidad del presente proyecto, es obtener la información necesaria para que la solución oral pediátrica de teofilina se pueda utilizar como una alternativa terapéutica, considerando las situaciones de la formulación como la presencia de un polímero que podría interferir en la biodisponibilidad y en consecuencia en la eficacia del principio activo, llevándose a cabo la biodisponibilidad absoluta del nuevo medicamento, siendo comparada con una formulación intravenosa, esperando una biodisponibilidad mayor a 70% y evaluando el efecto clínico en un modelo murino de ratones Balb/c.

OBJETIVO

OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL

- Comparar la concentración plasmática y el efecto terapéutico de una nueva solución oral de teofilina contra una solución intravenosa con teofilina, para determinar la biodisponibilidad absoluta y la efectividad.

II. OBJETIVOS PARTICULARES

- Sensibilizar a los ratones Balb/c con ovoalbúmina durante 75 días en el INP, para inducir una respuesta vasoconstrictora.
- Evaluar la respuesta broncodilatadora en 50 ratones Balb/c de la teofilina en solución oral y solución intravenosa, con la finalidad de evaluar la efectividad de la nueva formulación.
- Determinar los parámetros farmacocinéticos de $C_{máx}$, $T_{máx}$, ABC, k_e , $t_{1/2}$ para la nueva formulación en solución oral de teofilina (1mg/mL) en un modelo murino.
- Monitorear la concentración en sangre de teofilina en la nueva formulación oral y la solución intravenosa, con la finalidad de compararlos y obtener una biodisponibilidad absoluta de este nuevo medicamento.
- Evaluar los efectos adversos de teofilina en solución oral en ratones sanos con administración de tratamiento, para el seguimiento de la seguridad de fármaco.
- Desarrollar y validar un método analítico para la identificación y cuantificación del fármaco en la forma farmacéutica y en plasma.

CAPÍTULO 1.

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTRODUCCIÓN

Una de las áreas farmacéuticas encargada de los procedimientos básicos para satisfacer las necesidades de la población, con el objetivo de beneficiar a los pacientes atendidos en hospitales es la Farmacia Hospitalaria⁽¹²⁾. Sin embargo, en México existen limitantes en cuanto a pacientes pediátricos se refiere, actualmente hay una enorme deficiencia de medicamentos pediátricos en los hospitales, en ocasiones por su costo elevado o por la inexistencia de presentaciones infantiles.

En la práctica común se tiende a utilizar fórmulas extemporáneas o fraccionar las presentaciones diseñadas para adulto, reajustando la dosis. Cualquier manipulación del producto tiene el potencial de introducir errores en la dosificación, cambiar la disponibilidad del fármaco o administrar al infante excipientes no seguros y/o concentraciones excesivas de éstos, aumentando la probabilidad de la presencia de reacciones adversas, ausencia de efectividad en el tratamiento, cambios farmacocinéticos como la absorción del fármaco, entre otras⁽¹⁻⁵⁾.

La falta de información y datos sobre compatibilidad y estabilidad del producto al modificar una forma farmacéutica, aunado a la carencia de estudios en la población pediátrica de los medicamentos comercializados para adultos, genera un alto riesgo al conocer que los niños son más susceptibles a la aparición de errores. Esto exige extremar la vigilancia para conseguir los mejores resultados terapéuticos. Del mismo modo, los estudios señalan que aproximadamente el 50% de los fármacos empleados en niños se utilizan en condiciones diferentes a las autorizadas, aumentando el riesgo para el paciente⁽⁵⁾.

Debido a lo anterior, muchas empresas farmacéuticas y laboratorios de investigación se encuentran en la búsqueda de nuevas formulaciones para el suministro de fármacos en el área pediátrica, tomando en cuenta factores tales como: dosis, vías de administración y aspecto socioeconómico.

De acuerdo con la información descrita por el Censo de Población y Vivienda de 2015 (INEGI), existen cerca de 119 millones 983 mil 473 habitantes de los cuales el 36.4% se encuentran entre los 0-19 años de edad⁽¹³⁾ (rango que comprende la edad pediátrica, Ilustración 1). Parte de esta población necesita o necesitará algún medicamento que no se encuentra en condiciones de dosificación adecuada para ellos.

Las estadísticas de salud en niños y adolescentes dadas por la Dirección General de Información en Salud de la Secretaría de Salud publicada en 2004, muestra que en el 2002 las principales causas de muerte entre los menores de un año de edad son: asfixia y trauma al nacimiento (con 30.4% de las defunciones), infecciones respiratorias agudas bajas (8.6%), sepsis bacteriana en el recién nacido (8.5%), malformaciones congénitas del corazón (7.2%), enfermedades infecciosas intestinales (4.1%), sofocación (3.7%), bajo peso al nacer y prematuridad (3.6%), entre otros padecimientos. Las principales causas de muerte entre 1 y 4 años se encuentran las enfermedades infecciosas intestinales (9.7%), infecciones respiratorias agudas bajas (9.7%), malformaciones congénitas del corazón (6.3%), ahogamiento y sumersión accidentales (5.4%), desnutrición calórico-proteica (5.4%), sofocación (3.4%), asma (1.4%). Para el 2011, las causas

de muerte para niños menores de 1 año están las afecciones originadas en el bajo peso al nacimiento y prematuridad, asfixia y trauma al nacimiento, entre otros⁽¹⁴⁾.

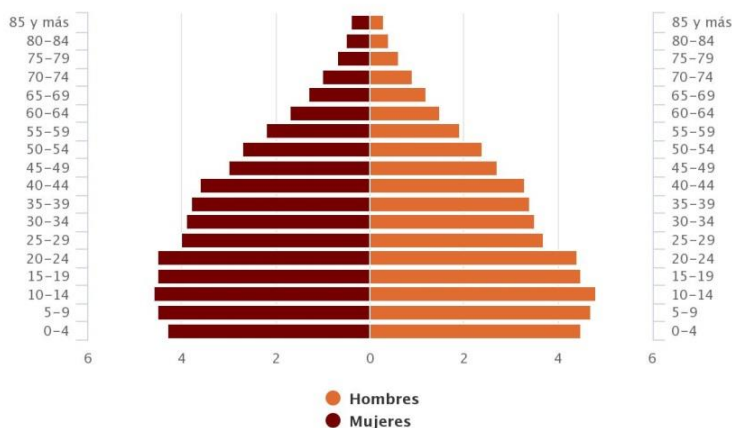


Ilustración 1. Población por edad y sexo, de acuerdo con INEGI Encuesta intercensal 2015.

1.2 ESTUDIO DE UTILIZACIÓN DE MEDICAMENTOS

Previamente se realizó un estudio retrospectivo de utilización de medicamentos, en el que se recopilaron los datos de dosificación de un Hospital de Tercer Nivel de Atención, para el área pediátrica. Las bases de datos analizadas comprendieron un periodo entre abril del 2002 a noviembre del 2012.

En la ilustración 2 se muestran las frecuencias de los medicamentos agrupados de acuerdo con el fármaco y grupo terapéutico prescritos. Entre los fármacos mayormente prescritos se observaron: omeprazol (7410 dosis), furosemida (6288 dosis), teofilina (5807 dosis), espironolactona (5555 dosis), sildenafil (3825 dosis), hidroclorotiazida (3347 dosis), cafeína (2695 dosis), ácido fólico (2451 dosis), captopril (2164 dosis), oseltamivir (1072 dosis) y fenobarbital (627 dosis)⁽⁶⁾.

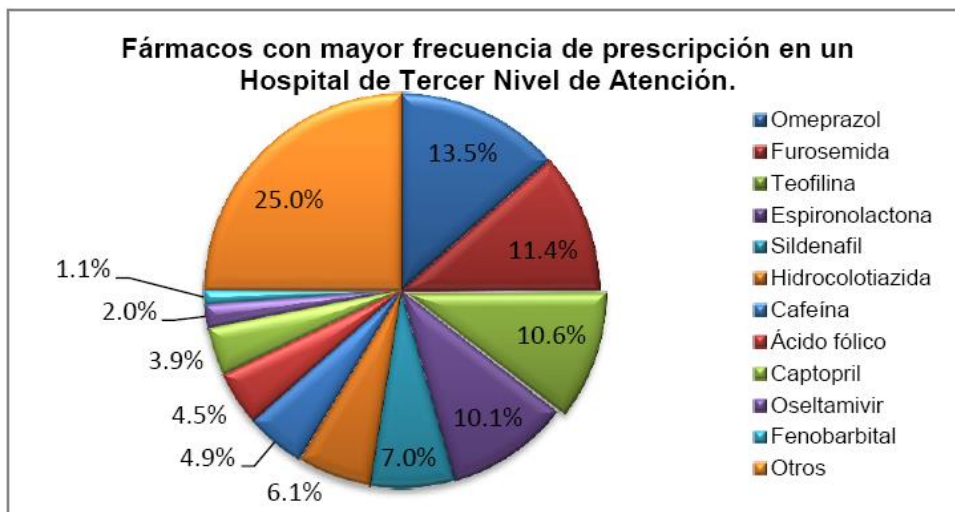


Ilustración 2. Frecuencias obtenidas de los fármacos mayormente prescritos, obtenidos en el Estudio de Utilización de Medicamentos en un Hospital de Tercer Nivel de Atención (abril 2002- diciembre 2012).

En la ilustración 3 se muestran los grupos terapéuticos con mayor presencia de dosis prescritas, los cuales fueron: diuréticos (15424 dosis), antiulcerosos (7909 dosis), antihipertensivos (7160 dosis), broncodilatadores (5809 dosis), deficiencias de folatos (4038 dosis), antiácidos (2627), estimulantes del SNC (2700 dosis), antivirales (1313 dosis), antiepilépticos (1159 dosis) y otros⁽⁶⁾. De acuerdo con estos datos se indica la necesidad de desarrollar medicamentos para el área pediátrica.

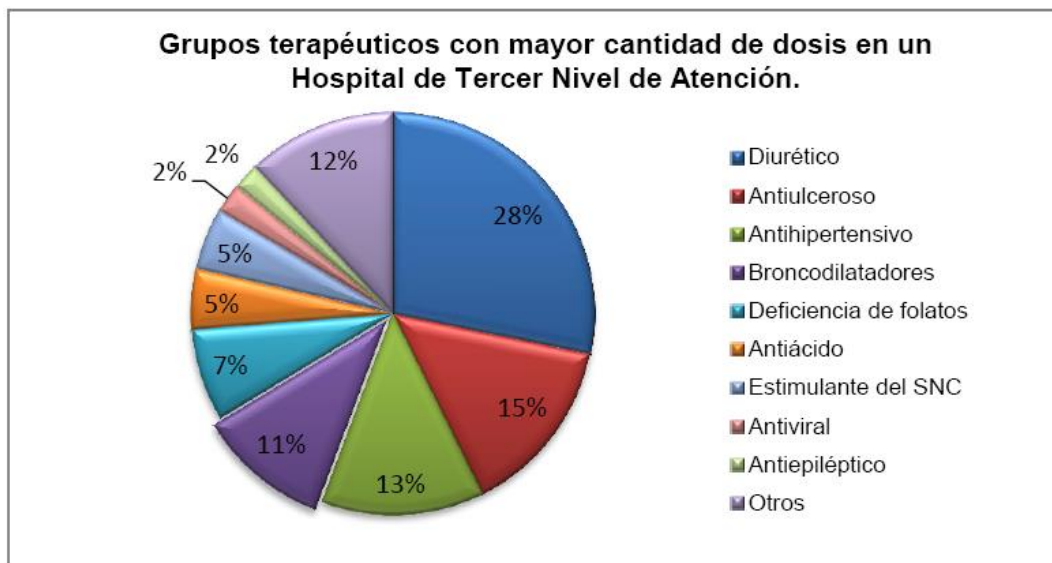


Ilustración 3. Frecuencias obtenidas por grupo terapéuticos, obtenidos en el Estudio de Utilización de Medicamentos en un Hospital de Tercer Nivel de Atención (abril 2002- diciembre 2012).

Como se puede observar en la ilustración 3, el grupo terapéutico de los broncodilatadores está dentro de los diez primeros con mayor frecuencia; entre los fármacos que pertenecen a los broncodilatadores esta la teofilina, la cual está entre los 11 fármacos mayormente prescritos (Ilustración 2). Se le dio importancia a la teofilina, debido a que se usa en el alivio de broncoespasmos y dilata las vías respiratorias.

La teofilina es un fármaco usado para el tratamiento de las sibilancias, falta de aire y opresión en el pecho, causada por asma, bronquitis crónica, enfisema y otras enfermedades pulmonares⁽¹⁵⁾, de segunda línea en crisis asmáticas, en neonatos es usado para el tratamiento de la apnea del prematuro estimulando la ventilación y mejorando la contractilidad diafragmática, es un medicamento de estrecho margen terapéutico y requiere una monitorización del fármaco, por lo que, la dosificación es de extrema importancia. Este fármaco no cuenta con una presentación pediátrica que satisfaga las dosis necesarias para niños. Por tanto, se determinó la necesidad del desarrollo de una formulación de teofilina para el área pediátrica, cuyas dosis sean capaces de satisfacer las necesidades del amplio grupo pediátrico. De acuerdo con UpToDate⁽⁷⁾, principalmente se prescribe para el tratamiento pediátrico de apnea y bradicardia en recién nacidos prematuros y asma persistente.

1.3 TEOFILINA

1.3.1 BRONCODILADORES

En los últimos años se ha estimado que las enfermedades respiratorias se encuentran entre las más comunes en los niños de México. Entre éstas se encuentran la neumonía, influenza e infecciones respiratorias agudas, causantes de gripe, bronconeumonías y bronquiolitis⁽¹⁵⁾.

El tratamiento para estas enfermedades consiste en eliminar o disminuir los síntomas de la enfermedad, tales como la constricción de tracto respiratorio, además, evitar efectos adversos del tratamiento farmacológico.

La prescripción farmacológica para dichas enfermedades lo encabezan los broncodilatadores, que son medicamentos que producen la relajación de la musculatura de los bronquiolos, dilatando la luz y permitiendo el paso del aire. Son utilizados en el asma bronquial y broncoespasmos originados por diferentes causas. Existen tres clases de broncodilatadores como se puede observar en la Tabla 1: los β -adrenérgicos (simpaticomiméticos), metilxantinas (broncodilatadores musculotrópicos) y anticolinérgicos (parasimpaticomiméticos).

Tabla 1. Clasificación de broncodilatadores.

| <i>Clase broncodilatador</i> | <i>Ejemplo</i> |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>B-adrenérgicos (simpaticomiméticos)</i> | <i>Epinefrina, isoproterenol, salbutamol</i> |
| <i>Metilxantinas (broncodilatadores musculotrópicos)</i> | <i>Teofilina, cafeína, teobromina</i> |
| <i>Anticolinérgicos (parasimpaticomiméticos)</i> | <i>Atropina y sus derivados</i> |

1.3.1.1 METILXANTINAS

Las metilxantinas provienen de vegetales como el café, té, cacao, mate, cola y guaraná, y de manera sintética por la unión heterocíclica de piridina e imidazol, resultando en una purina de la forma 2,6 dioxipurina.

Las moléculas más importantes de este grupo de broncodilatadores son la teofilina, teobromina y cafeína. Los tres derivados xantínicos ejercen la misma acción farmacológica, diferenciados por la intensidad sobre los sistemas orgánicos. Estos compuestos producen la estimulación respiratoria, aumenta la frecuencia, amplitud y volumen respiratorio, relajan la musculatura bronquial; además, inhiben la respuesta por la inhalación de un alérgeno y cuando se usan en dosis bajas, tienen efecto antiinflamatorio⁽¹⁵⁾.

1.3.1.1.1 TEOFILINA

La teofilina es una metilxantina derivada de purina, compuesto orgánico heterocíclico de la clase de imidazopirimidinas. Conformada por un grupo cetona conjugado en los carbonos 2 y 6 de la fracción de purina como se puede observar en la ilustración 4. La teofilina es químicamente similar a la cafeína y teobromina.

Los nombres químicos de teofilina o teofilina anhidra son: 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona, 1-3-dimetilxantina, de acuerdo con la IUPAC 1,3-dimetil-2,3,6,7-tetrahidro-1H-purina-2,6-diona.

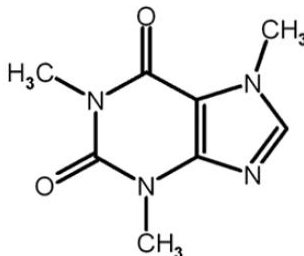


Ilustración 4. Estructura química de teofilina. Fórmula condensada C₇H₈N₄O₂, número de registro CAS 58-55-9.

1.3.1.1.1 USO DE TEOFILINA EN EL ÁREA PEDIÁTRICA

La teofilina es un fármaco broncodilatador que alivia el broncoespasmo y dilata las vías respiratorias, tiene efectos a nivel del Sistema Nervioso Central estimulando el centro respiratorio y aumentando la fuerza contráctil a nivel muscular, disminuye la fatiga del diafragma, reduce la necesidad de ventilación asistida, reduce la frecuencia de los eventos de apnea, aumenta el volumen-minuto y disminuye la displasia broncopulmonar.^(10,16)

Es usada para el tratamiento de la obstrucción reversible del flujo aéreo asociados con el asma crónica y otras enfermedades pulmonares crónicas como enfisema y bronquitis crónica. Es un fármaco de segunda línea en el tratamiento actual de crisis asmáticas.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Se emplea como tratamiento idiopático para la apnea de prematuro en neonatos, como coadyuvante en las apneas sintomáticas y en el broncoespasmo de enfermedades pulmonares neonatales, estimula la ventilación y mejora la contractilidad diafragmática.^(18,19)

1.3.1.1.1.1 APNEA DEL PREMATURO

La apnea del recién nacido se clasifica en dos grupos^(15,20):

- A) Apnea primaria, idiopática o de la prematuridad debida a la inmadurez de los mecanismos de regulación de la respiración (inmadurez de los centros respiratorios).
- B) Apnea secundaria o sintomática, ocasionada por alguna patología secundaria como: sepsis precoz, etc.

La apnea del prematuro es el cese de la respiración por más de 20 segundos o bien, un cese de la respiración menor a 20 segundos si es acompañado de bradicardia o des-saturación de oxígeno en niños nacidos antes de las 37 semanas de gestación, en la ilustración 5 se puede observar la diferencia entre la respiración normal y la apnea en donde existe la interrupción de la inspiración-expiración.

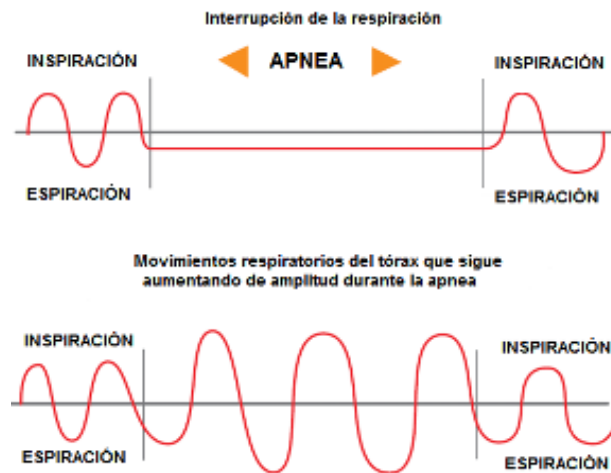


Ilustración 5. Presencia de apnea (imagen superior) y respiración normal (imagen inferior).

Esta patología generalmente mantiene a los niños prematuros en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales por periodos prolongados, esta incidencia aumenta a medida que la edad gestacional disminuye. Se considera que la inestabilidad e inmadurez de los centros respiratorios del prematuro son la causa del cese del esfuerzo respiratorio.^(8,9)

De acuerdo con la Guía de Práctica Clínica (GPC), Diagnóstico y Tratamiento de Apnea del Prematuro, Evidencias y Recomendaciones, la apnea se presenta en el 25% de los recién nacidos pretérmino con peso mayor a 2.5 kg y entre 84-100% en los que pesan menos de 1 kg, en los más inmaduros persiste frecuentemente después de las 34 semanas y en ocasiones hasta después de las 40 semanas de edad postconcepcional.^(8,9)

La mortalidad por apnea en el prematuro según reportes llega a ser hasta 60% y de los sobrevivientes cerca del 20% pueden presentar secuelas neurológicas. En presencia de apnea del prematuro se recomienda iniciar el esquema de administración de aminofilina o teofilina, según la Guía de Referencia Rápida, Manejo del Recién Nacido Prematuro Sano en la sala de prematuros.^(8,9)

El tratamiento de la apnea primaria y en algunas ocasiones en la secundaria, incluye la administración de fármacos (metilxantinas), ventilación mecánica, entre otras alternativas o en conjunto.

Cabe señalar que entre las metilxantinas que se prescriben para apnea del prematuro se encuentran la cafeína y la teofilina. Se logró encontrar en metaanálisis publicados en Cochrane la comparación de cafeína y teofilina como tratamiento de apnea, en los cuales no se encontró diferencia en la tasa de fracaso, texto mencionado en el apartado de introducción.⁽¹¹⁾

1.3.1.1.1.2 ASMA

Enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias:

- ▶ Obstrucción reversible o parcialmente reversible.
- ▶ Mayor reactividad traqueobronquial (hiperreactividad de las vías aéreas).

Provoca en forma recurrente tos, sibilancias, disnea y aumento del trabajo respiratorio, principalmente en la noche o en la madrugada.

El asma ocasiona inflamación y ensanchamiento de las vías respiratorias. Ésta hace que se presenten sibilancias, dificultad respiratoria, opresión en el pecho y tos. Es causada por la hinchazón (inflamación) de las vías respiratorias. Durante un ataque de asma, los músculos que rodean las vías respiratorias se vuelven rígidos. El revestimiento de los conductos aéreos se hincha. En consecuencia, puede pasar menos aire.^(15,20)

El asma es la enfermedad crónica más frecuente en la infancia y adolescencia. La importancia de esta patología radica en el carácter de enfermedad crónica que afecta a la calidad de vida, al ausentismo escolar y en los elevados costos sanitarios que genera. Se estima que un elevado porcentaje del costo que origina el asma está ocasionado por un control inadecuado.⁽²⁰⁾

La trascendencia de esta patología se destaca en su elevada prevalencia (entre el 8 y 20%) y su gran variabilidad. La aminofilina es útil en crisis de asma grave cuando existe mala respuesta a los B2-agonistas y esteroides.⁽²⁰⁾

1.3.1.1.2 FARMACODINAMIA

El mecanismo de acción mediante el cual la teofilina realiza su efecto es por la inhibición eficaz de la fosfodiesterasa (PDE) tipo III y IV y de las prostaglandinas que actúan sobre los músculos, aumentando la concentración intracelular de 3,5 monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y bloqueando la liberación de histamina de los mastocitos. Relaja el músculo liso de las vías aéreas bronquiales y los vasos sanguíneos pulmonares y reduce la capacidad de respuesta de la vía aérea a la histamina, metacolina, adenosina, y alérgenos. También se une al receptor A2b de adenosina que media la broncoconstricción, en la ilustración 6 se encuentran representados mediante diagramas los mecanismos de acción antes descritos. En los estados inflamatorios, la teofilina activa la histona-desacetilasa para prevenir la transcripción de genes inflamatorios que requieren la acetilación de las histonas para iniciar la transcripción.^(7,18,19)

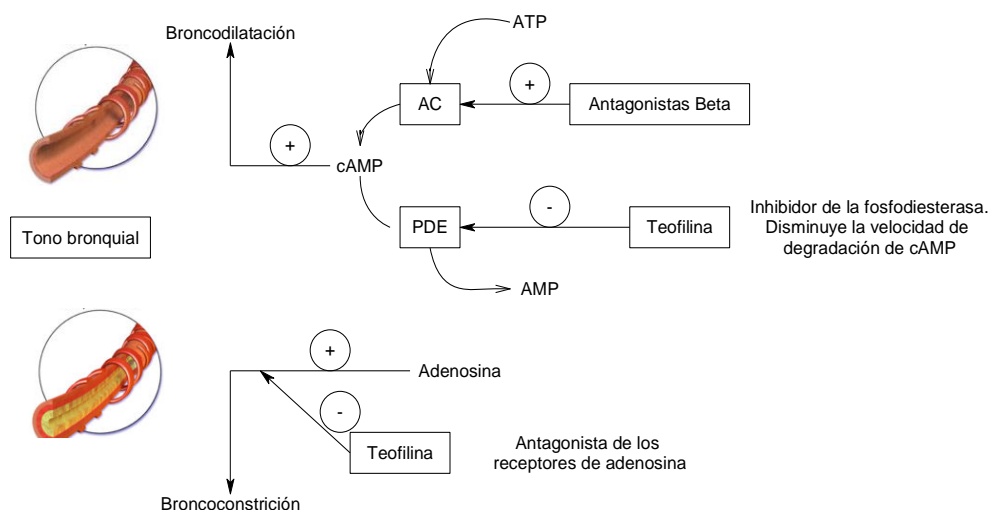


Ilustración 6. Mecanismo de acción de la teofilina y efectos en el tono bronquial. Imagen tomada y modificada de Bertram G. Katzung, Anthony J. Trevor: Farmacología básica y clínica, 13e: www.accessmedicina.com

1.3.1.1.1.3 DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

La dosificación debe ser individualizada con respecto al peso y masa corporal, condición, patología a tratar y patologías concomitantes del paciente. En la Tabla 2, se muestran las dosis comúnmente prescritas dependiendo la edad y la patología.

Tabla 2. Dosis comúnmente prescritas dependiendo la edad y la patología. ^(18,19)

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Margen terapéutico: Neonatos: 5-12 µg/mL Niños: 10-15 µg/mL Asma: 10-15 µg/mL Apnea del prematuro: 6-14 µg/mL |
| Neonatología: <ul style="list-style-type: none">• Apnea del prematuro: Dosis de descarga: 5-6 mg/kg/dosis Dosis de mantenimiento: 2-6 mg/kg/día, dividido cada 8-12 horas• Broncoespasmo: Dosis de carga: 4-6 mg/kg/dosis Dosis de mantenimiento: Prematuro de menos de 24 días: 1mg/kg/dosis cada 12 horas. Prematuro de más de 24 días: 1.5mg/kg/dosis cada 12 horas. Recién nacidos a término: dosis total diaria (mg): ((0.2 x edad en semanas) + 5) x (peso kg); dosis dividida entre 8 horas. |

La fórmula utilizada por el Handbook pediátrico⁽¹⁹⁾, para obtener la dosificación correcta en pacientes pediátricos menores de un año, mediante el peso es:

Ecuación 1. Ecuación para la obtención de la dosis correcta en paciente pediátricos mediante el peso (menores de un año).

$$\text{Dosis total diaria} = [(0.2) * (\text{edad}_{\text{en semanas}}) + 5] * \text{peso}_{(kg)}$$

Indicaciones:

- Edad postnatal 4-6 semanas: Dosis total diaria se divide para su dosificación cada 8 horas.^(16,21)
- Edad postnatal mayor a 26 semanas: Dosis total diaria se divide para su dosificación cada 6 horas.^(16,21)
- Cabe mencionar que los niveles plasmáticos de teofilina se presentan después de 48-72 horas de la administración, en neonatos suele ser 72 horas. Si la función renal decrece, se debe considerar la reducción de la dosis y una monitorización adicional.^(16,21)
- En el mercado nacional se encuentra distribuida teofilina sólido oral en cápsulas de liberación inmediata de 100 y 200 mg y de liberación retardada de 100, 200 mg. Solución inyectable (SSI), suspensión 80mg/15mL, frasco 250 mL (extemporánea) y una solución oral 80mg/15mL.^(16,21)

1.3.1.1.1.4 FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética se ocupa del estudio y conocimiento de los procesos cinéticos que le ocurren al fármaco al entrar al cuerpo (absorción, distribución, metabolismo, eliminación), cada fármaco presenta una cinética diferente y en general, solo existen estudios farmacocinéticos en adultos,

por tanto, la comprensión de estas implicaciones farmacológicas en niños se vuelve una tarea difícil y necesaria.^(7,18,21)

Absorción: La teofilina se absorbe de manera rápida y completa tras la administración oral en solución o bien, en sólidos orales de liberación inmediata.^(7,18,21)

Distribución: El volumen de distribución es de 0.5 L/kg, incrementa en neonatos prematuros. Se une en un 40% a las proteínas de la sangre, principalmente a la albúmina y este valor decrece en neonatos. Se distribuye libremente en los tejidos sin presencia de grasa.^(7,18,21)

Metabolismo: Presenta metabolismo hepático, la biotransformación se lleva a cabo a través de las enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450, generando diferentes metabolitos, las cuales son: la enzima CYP A1-2 y CYP 2E1, obteniéndose a la 1-metilxantina, 3-metilxantina y la hidroxilación de ácido 1,3-dimetilúrico. La 1-metilxantina es hidroxilada, por la xantina oxidasa, al ácido 1-metilúrico. Alrededor del 6% de la dosis de teofilina es N-metilado a la cafeína. La cafeína y el 3-metilxantina son los únicos metabolitos de teofilina con actividad farmacológica.^(7,18,21)

Eliminación: La excreción renal de la teofilina en recién nacidos asciende alrededor de 50% de la dosis, en comparación con el 10% excretado por niños mayores de tres meses y en adultos. Tiempo de vida media se encuentra entre 3 a 13 horas en sujetos normales, decrece en fumadores y niños e incrementa en neonatos prematuros. La vida media se ve afectada por la ingesta de metilxantinas en la dieta diaria, en la Tabla 3 se pueden observar los tiempos de aclaración por grupos etarios.^(7,18,21)

Tabla 3. Tiempo de aclaración media de teofilina en pacientes pediátricos y adultos.

| Aclaramiento medio (mL/kg/min) | Edad |
|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| 0.29 | Neonatos prematuros, edad postnatal 3-15 días. |
| 0.64 | Neonatos prematuros, edad postnatal 25-57 días. |
| 1.70 | Niños de 1-4 años. |
| 1.60 | Niños de 4-12 años. |
| 0.90 | Niños de 13-15 años. |
| 1.40 | Niños de 16-17 años. |
| 0.65 | Adultos (16-60 años). |

1.3.1.1.1.5 CONTRAINDICACIONES

- Hipersensibilidad a teofilina o algunos de sus excipientes.^(15,18)
- Hipersensibilidad a la sustancia activa o a cualquiera de los ingredientes inactivos (derivados de xantinas).^(15,18)
- Infarto al miocardio reciente.^(15,18)
- Taquiarritmia aguda.^(15,18)
- Niños menores de 6 meses de edad.^(15,18)
- Enfermedad de la arteria coronaria (donde la estimulación podría resultar dañina).^(15,18)
- Úlcera péptica.^(15,18)
- Coadministración con efedrina en niños.^(15,18)

1.3.1.1.6 REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS

Se han observado los siguientes efectos adversos^(15,18):

- Cardiovascular: aleteo auricular (ritmo cardíaco anormal que ocurre en la aurícula cardíaca) y taquicardia.
- SNC: cefalea, hiperactividad, insomnio, inquietud, convulsiones, estatus epiléptico.
- Endocrino-Metabólico: Hipercalcemia (con hipertiroidismo concomitante), hiperglicemia, hiperuricemia.
- Gastrointestinales: náuseas, vómitos, diarrea, aumento en la secreción de ácido gástrico.
- Neuromuscular-Esquelético: temblor.
- Renal: aumento en la diuresis (transitoria).

1.3.1.1.7 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

- Algunos fármacos aumentan los niveles plasmáticos de teofilina como: inhibidores de la CYP1A2, aciclovir, alopurinol, antihelmínticos (albendazol, mebendazol), cafeína, cefaclor, cimetidina, hormonas anticonceptivas, josamina (antibiótico) y claritromicina (puede alcanzar niveles tóxicos), eritromicina, hormonas tiroideas, quinolonas.^(15,18)
- Los fármacos que ocasionan el descenso de niveles plasmáticos de la teofilina son: inductores de la CYP1A2, aminoglucetina, fenobarbital, pentobarbital, carbamazepina, loperamida (disminuye la absorción), lansoprazol, omeprazol y rifampicina.^(15,18)
- Propanolol reduce el aclaramiento de la teofilina.^(15,18)
- Se han registrado casos de taquicardia, al administrarse junto con dobutamina y epinefrina.^(15,18)
- Furosemida puede causar hipocalcemia al administrarse en conjunto.^(15,18)
- Vacuna antigripal: en algunos casos se ha observado el aumento en niveles de teofilina al aplicarse la vacuna conjuntamente a la administración del fármaco.^(15,18)
- Alimentos: Existe interacción negativa con alimentos proteicos disminuyendo su vida media, contrastando con los alimentos altos en carbohidratos que aumentan su vida media.^(15,18)

1.3.1.1.8 CARCINOGENESIS, MUTAGENESIS, TERATOGENESIS Y EFECTOS SOBRE LA FERTILIDAD

Se han observado efectos teratogénicos en estudios con animales. La teofilina cruza la placenta y los efectos adversos son observados en el recién nacido. Generalmente es seguro su uso en el embarazo, sin embargo, los efectos adversos pueden aumentar y la eficacia probablemente disminuirá. Las recomendaciones del uso de teofilina en el embarazo a madres con asma son similares al uso en adultos no gestantes.^(15,18)

La concentración de este fármaco en la leche materna es similar a la concentración en el suero de la madre, observándose irritabilidad en el infante, no es probable llegar a un efecto adverso serio en el niño a menos que la concentración sanguínea de la madre llegue a concentraciones tóxicas. La concentración tóxica de teofilina es mayor a 20 µg/mL.^(15,18)

1.3.1.1.9 FORMAS FARMACÉUTICAS EN EL MERCADO

La teofilina es un medicamento que ha estado en el mercado por muchos años, sin embargo, actualmente no se encuentra en una presentación pediátrica adecuada. La información de las Tablas 4, 5, 6 y 7 muestran algunas de las formas farmacéuticas de teofilina que han estado y algunas que aún siguen en el mercado, de acuerdo con la Food and Drugs Administration (FDA)⁽²²⁾:

Tabla 4. Diferentes presentaciones farmacéuticas de teofilina que han estado presentes en el mercado y fueron retiradas de la venta, clasificadas por forma farmacéutica, concentración, vía de administración y tipo de liberación del fármaco, (Estado de venta: Descontinuados).

| Nombre del medicamento | Concentración | Forma de dosificación/ vía de administración | Compañía |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|--------------------|
| THEO-DUR | 50, 75, 125, 200 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | SCHERING |
| THEOBID | 130, 260 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | WHITBY |
| THEOCLEAR L.A.-260 | 260 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | SCHWARZ PHARMA |
| THEOCLEAR L.A.-130 | 130 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | SCHWARZ PHARMA |
| THEOPHYL-SR | 125, 250 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | ORTHO MCNEIL PHARM |
| THEOPHYLLINE | 300 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | HOSPIRA |
| THEOPHYLLINE | 125, 250 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | CENT PHARMS |
| THEOPHYLLINE | 100, 200 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | HOSPIRA |
| THEOPHYLLINE | 260 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | SANDOZ |
| THEOPHYLLINE | 100, 125, 200, 300 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | INWOOD LABS |
| THEOPHYLLINE-SR | 300 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | SCHERER RP |
| THEOVENT | 125, 250 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | SCHERING |
| THEOPHYLLINE | 100, 200, 250 mg | Cápsula; oral | SCHERER RP |
| THEOPHYLLINE | 100, 200 mg | Cápsula; oral | KV PHARM |
| THEOLIXIR | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | PANRAY |
| THEOPHYL-225 | 112.5 mg/15 mL | Elixir, oral | ORTHO MCNEIL PHARM |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | PHARM ASSOC |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | WOCKHARDT |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | PERRIGO |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | PRECISION DOSE |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | ROXANE |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | HALSEY |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | ALPHARMA US PHARMS |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | TARO |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Elixir, oral | CENCI |
| THEOPHYLLINE 0.4% AND DEXTROSE 5% IN PLASTIC CONTAINER | 400 mg/100 mL | Inyectable; inyección | B BRAUN |
| THEOPHYLLINE 0.2% AND DEXTROSE 5% IN PLASTIC CONTAINER | 200 mg/100 mL | Inyectable; inyección | B BRAUN |
| THEOLAIR | 80 mg/15 mL | Solución; oral | 3M |
| THEOCLEAR-80 | 80 mg/15 mL | Jarabe; oral | CENT PHARMS |
| THEOPHYLLINE | 150 mg/15 mL | Jarabe; oral | ALPHARMA US PHARMS |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Jarabe; oral | ALPHARMA US PHARMS |
| THEOPHYL | 100 mg | Tableta; masticable oral | ORTHO MCNEIL PHARM |
| THEO-DUR | 100, 200, 300, 450 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | SCHERING |
| THEOCHRON | 300 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | NOSTRUM LABS INC |
| THEOLAIR-SR | 200, 250, 300, 500 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | 3M |

Tabla 5. Diferentes presentaciones farmacéuticas de teofilina que han estado presentes en el mercado y fueron retiradas de la venta, clasificadas por forma farmacéutica, concentración, vía de administración y tipo de liberación del fármaco. (Estado de venta: Descontinuados). Continuación.

| Nombre del medicamento | Concentración | Forma de dosificación/ vía de administración | Compañía |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|--------------------|
| THEOPHYLLINE | 450 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | TEVA PHARMS |
| THEOPHYLLINE | 450 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | INWOOD LABS |
| THEOPHYLLINE | 300, 400, 450, 600 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | ABLE |
| THEOCLEAR-200 | 200 mg | Tableta; oral | CENT PHARMS |
| THEOCLEAR-100 | 100 mg | Tableta; oral | CENT PHARMS |
| THEOLAIR | 125, 25 mg | Tableta; oral | MEDICIS |
| THEOPHYL-225 | 225 mg | Tableta; oral | ORTHO MCNEIL PHARM |

Tabla 6. Diferentes presentaciones farmacéuticas de teofilina que están presentes en el mercado, clasificadas por forma farmacéutica, concentración, vía de administración y tipo de liberación del fármaco.

| Nombre del medicamento | Concentración | Forma de dosificación/ vía de administración | Compañía | Nombre del medicamento |
|------------------------|---------------|----------------------------------------------|--------------|------------------------|
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Solución; elixir, oral | Prescripción | PHARM ASSOC |
| ELIXOPHYLLIN | 80 mg/15 mL | Solución; elixir, oral | Prescripción | NOSTRUM LABS INC |
| THEO-24 | 400 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | Prescripción | AUXILIUM PHARMS INC |
| THEO-24 | 100 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | Prescripción | ACTIENT PHARMS |
| THEO-24 | 200 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | Prescripción | AUXILIUM PHARMS LLC |
| THEO-24 | 300 mg | Cápsula de liberación prolongada; oral | Prescripción | AUXILIUM PHARMS LLC |
| THEOCHRON | 100 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | NOSTRUM LABS INC |
| THEOCHRON | 200 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | NOSTRUM LABS INC |
| THEOPHYLLINE | 300 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | PLIVA |
| THEOPHYLLINE | 100 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | PLIVA |
| THEOPHYLLINE | 200 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | PLIVA |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Solución; oral | Prescripción | SILARX |
| THEOPHYLLINE | 300 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | ALEMBIC LTD |
| THEOPHYLLINE | 450 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | ALEMBIC LTD |
| THEOPHYLLINE | 400 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | GLENMARK GENERICS |
| THEOPHYLLINE | 600 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | GLENMARK GENERICS |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Solución; oral | Prescripción | SILARX |
| THEOPHYLLINE | 300 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | ALEMBIC LTD |
| THEOPHYLLINE | 450 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | ALEMBIC LTD |
| THEOPHYLLINE | 400 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | GLENMARK GENERICS |
| THEOPHYLLINE | 600 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | GLENMARK GENERICS |
| THEOPHYLLINE | 400 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | RHODES PHARMS |

Tabla 7. Diferentes presentaciones farmacéuticas de teofilina que están presentes en el mercado, clasificadas por forma farmacéutica, concentración, vía de administración y tipo de liberación del fármaco. Continuación

| Nombre del medicamento | Concentración | Forma de dosificación/ vía de administración | Compañía | Nombre del medicamento |
|---------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------|--------------|------------------------|
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Solución: elixir, oral | Prescripción | PHARM ASSOC |
| THEOPHYLLINE | 80 mg/15 mL | Solución, oral | Prescripción | TRIS PHARMA INC |
| THEOPHYLLINE | 600 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | MYLAN IRELAND LTD |
| THEOPHYLLINE | 400 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | MYLAN IRELAND LTD |
| THEOPHYLLINE | 600 mg | Tableta de liberación prolongada; oral | Prescripción | RHODES PHARMS |
| THEOPHYLLINE 0.32% AND DEXTROSE 5% IN PLASTIC CONTAINER | 320 mg/100 mL | Inyectable; inyección | Prescripción | B BRAUN |
| THEOPHYLLINE 0.16% AND DEXTROSE 5% IN PLASTIC CONTAINER | 160 mg/100 mL | Inyectable; inyección | Prescripción | B BRAUN |
| THEOPHYLLINE 0.08% AND DEXTROSE 5% IN PLASTIC CONTAINER | 80 mg/100 mL | Inyectable; inyección | Prescripción | B BRAUN |
| THEOPHYLLINE 0.04% AND DEXTROSE 5% IN PLASTIC CONTAINER | 40 mg/100 mL | Inyectable; inyección | Prescripción | B BRAUN |

Existe aminoefedrison NF 150 mL jarabe de Siegfried Rhein con 0.7 g teofilina con 0.15 g ambroxol y fluidasa 240 o 120 mL solución de teofarma con teofilina y mepiramina (0.172 g/0.237 g/100 mL), que no siempre es posible prescribirse en combinación. Las formulaciones orales sólidas como lo son las cápsulas y tabletas de teofilina presentan concentraciones que van de los 100 a los 450mg, que para emplear la dosis pediátrica indicada (1-2 mg/kg¹²), es necesario fraccionar el medicamento lo que podría ocasionar errores de sobre o subdosificación, además de que las formulaciones con acción prolongada o retardada tienen un recubrimiento diferente que permite la disolución del fármaco en espacios de tiempo prolongados y no es recomendable el fraccionar este tipo de medicamentos.

Hay una formulación en elixir de teofilina, elixophyllin/elixofilina contiene 20% de alcohol como excipiente⁽²³⁾, en este caso, los recién nacidos y los niños no metabolizan el etanol tan eficazmente como los adultos, por lo que, pueden presentar un mayor riesgo de toxicidad tanto aguda como crónica relacionada con el alcohol. Así mismo, se dispone de poca información sobre las concentraciones seguras de etanol en las formulaciones pediátricas de uso crónico. El etanol supone una agresión al desarrollo del cerebro, ya afectado por el hipotiroidismo congénito.⁽²⁴⁾ La solución oral de teofilina tiene por cada 0.5 mL (1 gota aproximadamente) cerca de 2.67 mg de teofilina que resulta ser una dosis alta para neonatos que pesan menos de un kilogramo, además esta solución contiene en su formulación: parabenos, sacarosa, sorbitol y propilenglicol¹⁹, el uso de propilenglicol a dosis altas y por tiempo prolongado tiene efectos depresores en el sistema nervioso central y aparato cardiovascular. Se ha observado que en niños de bajo peso causa hiperosmolaridad en la sangre. Los niños menores de 4 años presentan una limitada ruta metabólica, acumulando al propilenglicol en el organismo produciendo depresión del sistema nervioso central.⁽¹⁵⁾

1.3.1.1.10 NUEVA FORMULACIÓN

En estudios anteriores, se llevó a cabo un desarrollo farmacéutico de teofilina en solución oral, en concentración adecuada para la dosificación de pacientes pediátricos y que satisface la necesidad de esta población, dicha formulación y proporciones se pueden ver en la tabla 8.⁽⁶⁾ Sin embargo, este producto no puede comercializarse, puesto que las regulaciones exigen antes de su comercialización estudios preclínicos y clínicos que garanticen la seguridad, eficacia y calidad del nuevo medicamento.

Los excipientes están aceptados por las regulaciones (COFEPRIS y FDA) para pacientes pediátricos con una concentración de principio activo de 1mg/mL.

Tabla 8. Composición de la solución oral pediátrica.

| COMPONENTE | CANTIDAD |
|---------------------|------------------|
| <i>teofilina</i> | 0.080 g |
| <i>conservador</i> | 0.104 g |
| <i>antioxidante</i> | 0.320 g |
| <i>glicerina</i> | 0.200 mL |
| <i>edulcorante</i> | 0.112 g |
| <i>saborizante</i> | 2.000 mL |
| <i>agua</i> | 80.000 mL c.b.p. |

Esta solución fue acondicionada en frascos goteros de polietileno de baja densidad (depresibles) natural, como se observa en la Ilustración 7, los cuales fueron sometidos a pruebas de ciclado térmico como una prueba de estabilidad preliminar.



Ilustración 7 Formulación final, en empaque primario posterior al acondicionamiento para pruebas de ciclado térmico.

En la Tabla 9 se muestran los resultados referentes a las pruebas de estabilidad, así mismo, se puede observar que no hubo cambios significativos en la densidad relativa, ni en el índice de refracción de las dos formulaciones, esto puede deberse a que los excipientes de la formulación son compatibles, por tanto, no existe reacción de degradación entre ellos, ni con el fármaco. El pH de las soluciones se mantuvo constantes durante el periodo de estudio, manteniendo la estabilidad de la solución y de teofilina, debido a que esta se degrada a pH muy ácidos.

No existió cambio perceptible en las propiedades organolépticas de las soluciones: apariencia (color y olor), partículas suspendidas, sabor. En la etapa de desarrollo de la formulación, posterior a la elaboración de la solución, se filtró mediante membranas de 0.22µm, tamaño lo suficientemente pequeño como para impedir el paso de bacterias y hongos, este filtrado se conservó en los frascos goteros correspondientes, realizándose bajo condiciones asépticas impidiendo la contaminación microbiológica de la solución final.

Tabla 9. Resultados obtenidos de la prueba de ciclado térmico para formulación de una solución oral de teofilina (1 mg/mL).

| PRUEBAS DE CICLADO TÉRMICO | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------|---------------|
| Parámetro | Formulación (1mg/mL) | | |
| | <i>Día 0</i> | <i>Día 7</i> | <i>Día 15</i> |
| pH | 3 | 3 | 3 |
| Densidad | 1.0016g/mL | 1.0012g/mL | 1.0017g/mL |
| Sabor | Dulce-cereza | Dulce-cereza | Dulce-cereza |
| Apariencia | traslucido | traslucido | traslucido |
| Partículas suspendidas | ninguna | ninguna | ninguna |
| Índice de refracción | 1.334010 | 1.332002 | 1.334008 |

Mediante cromatografía en capa fina, se presentan más de dos manchas posteriores a la elución, mediante el revelado por UV (tabla 10). Los Rf resultantes de una de esas manchas son teofilina (0.83 teofilina sola y entre 0.82-0.84 para las formulaciones) y compuestos que pueden absorber en el UV, tales como: el solubilizante 2 (puede formar una conjugación por la larga cadena de caprolactama) y el conservador (presenta enlaces covalentes simples alternados con enlaces dobles y un grupo carbonilo que lo hacen absorber en el UV). Como referencia se colocaron: solubilizante 2, conservador, saborizante y edulcorante, a fin de identificar los compuestos observables en las placas. Dando como resultado que las manchas comparadas del conservador y solubilizante 2 (Rf de 0.94 y 0.89 respectivamente) con los Rf de las formulaciones coinciden con estos compuestos que absorben en el UV, por lo que estas manchas pertenecen al conservador y al solubilizante 2.

Tabla 10. Resultados obtenidos de la estabilidad mediante ciclado térmico para la formulación de una solución oral de teofilina (1 mg/mL), usando la metodología cromatografía en capa fina: FInicio: Formulación 1 mg/mL inicio del ciclado; FMedio: Formulación 1mg/mL posterior a 7 días del ciclado; FFinal: Formulación 1 mg/mL posterior a 15 días del ciclado.

| T=12°C HR=66% CV=2.23% | | Compuestos observados en la elución de la placa cromatográfica. | | |
|---------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
| | | <i>Rf</i> | <i>Rf</i> | <i>Rf</i> |
| Referencias | <i>Teofilina</i> | 0.83 | | |
| | <i>Solubilizante 2</i> | | 0.89 | |
| | <i>Conservador</i> | | 0.94 | |
| | <i>Edulcorante</i> | | 0.88 | |
| | <i>Saborizante</i> | | 0.89 | |
| Formulaciones | <i>Finicio</i> | 0.83 | 0.91 | 0.87 |
| | <i>Fmedio</i> | 0.82 | 0.85 | 0.84 |
| | <i>Ffinal</i> | 0.83 | 0.89 | 0.88 |

Cabe mencionar que la estructura química del edulcorante presenta ciclos en los cuales existe una unión O-CH-O-COH que podría presentar absorción en la longitud de onda de la cámara de UV (254 nm). Así mismo, el saborizante formado por un anillo aromático podría presentar absorción. En la placa se observa una ligera mancha en ambos compuestos con Rf de 0.88 para

edulcorante y de 0.89 para el saborizante, dichos resultados están descritos en la Tabla 10. Por tanto, estos compuestos aportarían el aumento de dicha mancha en la placa para las formulaciones finales.

1.4 BIODISPONIBILIDAD

Se le llama biodisponibilidad a la cantidad relativa de fármaco (inalterado) administrado que alcanza la circulación general, y la velocidad a la cual esto ocurre. Resulta de la combinación de las palabras disponibilidad biológica, se define como la velocidad y la cantidad a la cual el principio activo o entidad terapéutica se absorbe para alcanzar la circulación sistémica y estar disponible para ejercer su efecto.⁽²⁵⁾ La circulación sistémica se refiere primeramente a la sangre venosa (exceptuando la portal hepático durante la fase de absorción) y la sangre arterial, la cual transporta el fármaco a los tejidos.⁽²⁶⁾

La biodisponibilidad absoluta es la medida de la biodisponibilidad de un producto de prueba, en relación con la administración intravenosa del fármaco. La vía intravenosa implica por definición, el 100% de biodisponibilidad. Mientras que, la biodisponibilidad relativa es la medida de la biodisponibilidad de un producto de prueba, en relación con una preparación estándar (producto innovador o de patente, o una solución acuosa de fármaco puro).⁽²⁶⁾

Los estudios de biodisponibilidad comparativa se refieren a la comparación de la biodisponibilidad de diferentes formulaciones de un mismo fármaco. Cabe mencionar que dos formulaciones con el mismo fármaco, si son bio-equivalentes, se asume que tiene el mismo efecto terapéutico o que serán equivalentes terapéuticos. Un equivalente terapéutico son aquellos que tienen la misma cantidad de principio activo (forma farmacéutica similar fabricada por diferentes compañías) y una alternativa farmacéutica son aquellas que contienen la misma entidad terapéutica, no necesariamente en la misma cantidad, misma sal o éster (diferentes formas farmacéuticas) siempre y cuando su velocidad y cantidad absorbidas no muestran diferencias significativas cuando se administran a la misma dosis molar de la entidad terapéutica bajo condiciones de experimentación similar.⁽²⁵⁾

Si un medicamento de prueba alcanza concentraciones circulantes inferiores, se corre el riesgo de no provocar el efecto deseado, y asimismo, si alcanza concentraciones mayores se corre el riesgo de que provoque mayores efectos adversos, por tanto, no debe existir diferencia estadísticamente significativa entre los perfiles farmacocinéticos.⁽²⁷⁾

1.5 VALIDACIÓN

Validar es el proceso mediante el cual se establece a través de pruebas de laboratorio que las características de desempeño del método satisfacen los requerimientos para su aplicación analítica con evidencia documentada, fundamentalmente asegura tener resultados confiables y reproducibles. Se busca que el método empleado sirva para los fines con los que fue hecho.⁽²⁷⁾ Ver el Anexo 1 parámetros de validación.

1.6 MODELO EXPERIMENTAL

La patogenia del asma alérgica incluye el proceso de sensibilización sistémica, la cual consiste en la captación y procesamiento del alérgeno por las células presentadoras del antígeno (CPA) a las células TCD4+, las que se activan y diferencian a un tipo especial de células T cooperadoras: Th2 (polarización). Esta activación a Th2 promueve la maduración y el reclutamiento de eosinófilos

en la vía respiratoria, así como la generación de IgE por las células B mediante la secreción de interleucinas (IL) tipo 4, 5 y 13. Las IgE se anclan en la membrana de los mastocitos que liberan mediadores inflamatorios luego de reacción cruzada con el alérgeno. Los tratamientos actuales no resuelven la enfermedad y se centran en contrarrestar los episodios de broncoespasmo y controlar la inflamación subyacente en el proceso crónico, con la finalidad de reducir la morbilidad asociada a la enfermedad.

Se ha experimentado con numerosas especies a las cuales se les ha inducido asma mediante una gran variedad de protocolos.⁽²⁸⁾

1.7 MODELOS ANIMALES DE ASMA ALÉRGICA

Las principales características funcionales y patogénicas del asma alérgica se han observado en diversos modelos animales. Las especies utilizadas han sido: ratón, rata, cobaya, conejo, hurón, perro, gato, oveja, cerdo, algunos primates e incluso caballo. Algunas de estas especies desarrollan asma alérgica de forma espontánea y a otras se les induce experimentalmente. En este sentido los modelos mayormente utilizados son el ratón, la cobaya, la oveja y el mono.⁽²⁸⁾

El modelo de cobaya sensibilizada con ovoalbúmina (OVA) se caracteriza, al igual que el asma humana, por una fase aguda temprana y una fase crónica más tardía tras el contacto con el alérgeno, por la existencia de una inflamación pulmonar eosinofílica y por hiperreactividad bronquial. Este modelo fue el más utilizado hasta que se describieron los primeros modelos en el ratón, y ha servido especialmente para evaluar el interés terapéutico de diversas moléculas, pero no ofrece la versatilidad genética del ratón, y tampoco se dispone de tantos reactivos específicos de especie que permitan identificar gran parte de las fluctuaciones moleculares y celulares en el estudio de su patogenicidad.⁽²⁸⁾

El modelo de asma en la oveja también se caracteriza por una fase aguda temprana seguida de una fase crónica más tardía, acompañadas de hiperreactividad bronquial. Además, desde el punto de vista anatómico y funcional, los pulmones ovinos normales se asemejan mucho a los humanos. Aunque la inducción de asma en la oveja se ha realizado en su mayor parte con alérgenos de nemátodos, sobre todo *Ascaris suum*, se ha visto que, la oveja desarrolla una respuesta específica de inmunoglobulina E (IgE) con una intensa eosinofilia.⁽²⁸⁾

Al principio se estudiaban animales espontáneamente sensibilizados a *A. suum*, pero en la actualidad existe ya un modelo inducido en el que se sensibilizan los animales a ácaros del polvo y que reproduce prácticamente todas las características clínicas y patogénicas del asma humana.

Los modelos de ovejas y primates son los modelos menos utilizados por ser poco explotables científicamente debido a el costo, la duración de los experimentos, las dificultades en su manejo, la falta de reactivos desarrollados para valorar la expresión molecular y la mayor reprobación de su utilización en el laboratorio que otras especies, a pesar de que, el modelo de primate se ha usado desde hace 25 años.⁽²⁸⁾

Por motivos fundamentalmente científicos, económicos y de facilidad de uso (estabulación, manejo, disponibilidad de reactivos específicos de especie), el animal universalmente utilizado como modelo de asma alérgica hoy día es el ratón, con respecto a otras especies destacar la

posibilidad de su manipulación genética (transgénicos y *knockouts*) e inmunológica (ratones con inmunodeficiencias espontáneas o inducidas).⁽²⁸⁾

1.7.1 MODELOS DE ASMA ALÉRGICA EN EL RATÓN

Se han propuesto muchos modelos experimentales de asma inducida en el ratón. En general, todos los protocolos de inducción se basan en una sensibilización sistémica mediante la inyección de un alérgeno con el fin de generar una respuesta inmunitaria de memoria, seguida de la reexposición local del sistema respiratorio al mismo alérgeno. En ocasiones, en la sensibilización se administra el alérgeno junto con un coadyuvante o compuesto inmunopotenciador inespecífico como el sulfato de aluminio o *alum* para garantizar una respuesta inmunitaria suficientemente intensa.⁽²⁸⁾

Uno de los alérgenos mayormente utilizados es la ovoalbúmina, una proteína proveniente de la clara del huevo, es uno de los alérgenos en mayor concentración en el huevo. La alergia a ésta es una reacción adversa en relación con la ingestión de huevo. Se presenta cuando el organismo produce un anticuerpo, la IgE (inmunoglobulina E) dirigida contra una sustancia. Los síntomas más frecuentes pueden ser reacciones cutáneas seguidos de los gastrointestinales agudos y respiratorios e incluso en los casos más graves una reacción generalizada de anafilaxia (reacciones anteriores junto con hipotensión, colapso vascular y disritmias cardíacas). El huevo es junto con la leche, el alérgeno que con mayor frecuencia se encuentra implicado en los pacientes con dermatitis atópica, síntomas digestivos y patología respiratoria asociada por inhalantes.⁽²⁹⁾

En la literatura se menciona un modelo neonatal de hipoxia en ratón asociado con características de apnea en lactantes prematuros. El modelo neonatal en ratón de hipoxia intermitente (IH) simula la recurrente hipoxia/re-oxigenación que desarrolla episodios de apnea en la prematuridad (AOP), en ratones C57BL/6 P2 madre y lactante, alojados en habitaciones aisladas equipadas con cámaras hipóxicas controladas por ordenador.⁽³⁰⁾

La apnea del prematuro es un trastorno del desarrollo que se presenta en los recién nacidos menores a 37 semanas de gestación y que suele resolverse la gran mayoría de las veces, al término de la gestación. Se debe diferenciar de respiración periódica la cual es un patrón respiratorio benigno, que se caracteriza por ciclos respiratorios de 10-15 segundos de duración, con pausas respiratorias mayor a 3 segundos sin desaturación significativa. Se postula que ambos fenómenos tienen su origen en inmadurez del cerebro del prematuro.

CAPÍTULO 2.

METODOLOGÍA

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 GENERALIDADES

El presente proyecto es subsecuente a la etapa de diseño de la formulación y de los estudios de estabilidad preliminar.

Esta parte consistió en un modelo piloto de varias etapas:

La primera fue desarrollar un método analítico de detección y cuantificación del fármaco (teofilina) en la forma farmacéutica y en plasma, el cual se llevó a cabo mediante la modificación de metodologías descritas en artículos de investigación previos.

En la siguiente etapa se realizó un modelo experimental en ratón, con la finalidad de caracterizar la acción terapéutica del fármaco en esta nueva formulación (efectividad), debido a que los excipientes son diferentes a los probados en los medicamentos ya comercializados, en este caso, se usa un polímero que podría modificar la efectividad y/o biodisponibilidad del fármaco. Y finalmente, la obtención de la biodisponibilidad absoluta de la nueva forma farmacéutica.

En esta etapa preclínica es común el uso de animales cuando se hacen pruebas *in vivo*, en este estudio se utilizó un modelo de asma alérgica en ratones BALB/c⁽³¹⁾ y ratones sanos, con la finalidad de construir la cinética del medicamento, contra el medicamento en solución intravenosa, del mismo modo, se evaluará la respuesta en ratones enfermos comparando estas formas farmacéuticas para evaluar si el medicamento está siendo efectivo a esa concentración en sangre.

2.2 MEDICAMENTO

La descripción de los dos tipos de tratamientos es la siguiente:

- ✓ **Tratamiento A (Producto de Referencia):** Teofilina solución IV de 200 mg/10mL, administrada por vía intravenosa.
- ✓ **Tratamiento B (Producto de Prueba):** Teofilina solución oral nueva formulación “Teofilina SO” de 1 mg/mL (Laboratorio de Farmacología, INP).

La formulación oral pediátrica nueva fue elaborada en el Laboratorio de Farmacología, de la Torre de Investigación “Joaquín Cravioto”, del Instituto Nacional de Pediatría (INP). El total de los productos proporcionados, tanto el de referencia como el de prueba (Tratamientos A y B), fueron del mismo lote.

El medicamento no usado quedó en resguardo del responsable del Área Clínica del Laboratorio de Farmacología en el Instituto Nacional de Pediatría.

2.3 EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO: VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se desarrollaron dos métodos para cuantificar teofilina y la validación correspondiente para cada uno:

- 1) En la forma farmacéutica, con la finalidad de evaluar la estabilidad de la formulación.
- 2) En sangre de ratón recolectada en tarjeta Guthrie (de tamizaje neonatal), para evaluar en un modelo *in-vivo* la biodisponibilidad absoluta.

La validación se llevó a cabo con el fin de obtener mediciones confiables, obteniendo los parámetros de desempeño de la Tabla 11. La metodología empleada para las determinaciones fue mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la cuantificación del fármaco en forma farmacéutica y cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UPLC) para la cuantificación en matriz sanguínea.

2.3.1 CONDICIONES DEL EQUIPO CROMATOGRÁFICO Y DEL SISTEMA.

- Equipo: Cromatógrafo de líquidos Acquity™ Ultra Performance LC Waters.
- Condiciones para la cuantificación de teofilina en forma farmacéutica:
Fase móvil HPLC/UPLC: Metanol/ Agua milli-Q (45:55).
Flujo Isocrático, velocidad de flujo: 0.7 mL/min.
Fase estacionaria: C18/ octadecilsilano.
Columna Shodex, tamaño: 150 mm x 4 mm.
Temperatura de columna: 30 °C.
Detector: UV (TUV Detector), longitud de onda: UV-Vis 273 nm.
Automuestreador y loop: Loop completo, volumen de inyección 10 µm.
Tiempo de retención de la teofilina: 3.4 min.
- Condiciones para la cuantificación de teofilina en matriz biológica:
Fase móvil HPLC/UPLC: Metanol/ Ácido fórmico 0.1% (50:50).
Flujo Isocrático, velocidad de flujo: 0.1 mL/min.
Fase estacionaria: C18/ octadecilsilano.
Columna Acquity UPLC BEH C18, tamaño: 2.1 x 50 mm.
Temperatura de columna: 35 °C.
Detector: MS/MS equipo Waters Quattro™ micro API Mass Spectrometer de triple cuadrupolo.
Automuestreador y loop: Loop parcial con sobre llenado de aguja, volumen de inyección 10 µm.
Tiempo de retención de la teofilina: 1.54 min.

Tabla 11. Parámetros de desempeño para la validación del método analítico.

| PRUEBA | PRODUCTO TÉRMINADO | MUESTRA SANGUÍNEA |
|--------------------------|--------------------|-------------------|
| Exactitud | X | X |
| Precisión | X | X |
| Especificidad | X | X |
| Límite de detección | X | X |
| Límite de cuantificación | X | X |
| Linealidad | X | X |
| Selectividad | X | X |
| Sensibilidad | X | X |
| Robustez | X | X |
| Recobro | | X |

2.3.2 ESTÁNDARES

- Referencia. Teofilina Anhidra (MP).
- Externo. 7-beta-hidroxietil-teofilina (Santa Cruz Biotechnology)/ Isoniazida (Sigma Aldrich).
- Disolvente de estándar: Agua/Metanol (50:50).
- Tiempo de retención esperado de la teofilina: 3.4 min.

2.4 MODELO ANIMAL: CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA Y ALOJAMIENTO

Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto Nacional de Pediatría a temperatura de 25°C con libre acceso al alimento y agua, con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas. Se monitoreo su alimentación y peso (antes de la administración del anestésico y/o tratamiento) con el fin de evitar que algún ratón presentara sobrepeso o alguna anomalía nutricional. Se colocaron 10 ratones del mismo sexo (para evitar que una hembra quedara preñada; sexados previamente) en cajas colectivas para ratón.

Para el proyecto se calculó el tamaño de la muestra que se obtuvo tomando en cuenta que la N mínima es de 6 animales por grupo, sin embargo, es necesario evaluar las incidencias que generen un riesgo presente que puedan disminuir la N inicial⁽³²⁾:

$X = N / ((A/100) * (B/100) * (C/100) * \dots) = 6 / ((60/100) * (60/100) * (90/100)) = 19.6 = 20$ animales por cada grupo

20 x 5 grupos = 100 animales para el experimento.

A= Riesgo de que los animales no presenten insuficiencia respiratoria (40%).

B= Riesgo de que en la sensibilización algún ratón muera (40%).

C= Riesgo inherente al modelo, pérdida (15%).

N= Número mínimo de animales por grupo.

A, B, C= Riesgos.

La sensibilización se hizo primeramente con un estudio piloto con solo 50 ratones para observar la respuesta de modelo a todos los procedimientos experimentales descritos en esta metodología. Se usaron ratones macho y hembra BALB/c (50-50%), a los cuales se les indujo una insuficiencia respiratoria en un tiempo aproximado de dos meses y medio, con el fin de comparar los medicamentos descritos anteriormente, con respecto a su eficacia terapéutica.

- **Criterios de inclusión:** Ratones macho y hembra BALB/c de entre 5 y 6 semanas con peso de 18 a 20 g.
- **Criterios de eliminación:** Cuando algún ratón presente una sobre-reacción al medicamento o cuando la enfermedad se sobre exprese, esto será evaluado usando la escala de dolor, obteniendo un puntaje de 3, parámetros descritos en la tabla 15.

2.5 EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO: MODELO ANIMAL

2.5.1 SENSIBILIZACIÓN DEL MODELO MURINO “ESTUDIO PILOTO”

El método se realizó mediante un estudio experimental básico *in vivo*, usando cinco grupos de ratones Balb/c (Grupo I. Sanos, Grupo II. Enfermos, Grupos III. Enfermos en tratamiento con solución oral, Grupo IV. Enfermos en tratamiento con solución intravenosa y Grupo V: Sanos con tratamiento de solución oral), integrados por 10 ratones cada uno, en donde, posterior a una semana de adaptación en las condiciones del laboratorio, los grupos 2 al 4 se sensibilizaron con dos inyecciones de ovoalbúmina (OVA), vía intraperitoneal de 100 µg el día 0 y 14 sin presencia de coadyuvante y se expuso a cada ratón a nueve dosis intranasales de OVA de 500 µg en los días 27, 28, 29, 47, 61, 73, 74 y 75 siendo anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 80 µg/g ketamina y 16 µg/g de xilazina (cavidad abdominal, lateral a la línea media, aguja de 25G x 5/8”), antes de la exposición intranasal con el fin de generar un modelo de insuficiencia respiratoria y no lastimar la cavidad nasal del animal debido al movimiento, evaluando previamente si está sedado siguiendo los indicadores descritos en la Ilustración 8.^(28,33) El uso de ketamina produce sialorrea, se administró atropina para reducir secreciones (0.02 mg/kg).

Para el grupo 1 y 5 (controles sanos) solo se les administró solución salina isotónica intraperitoneal o intranasal según el caso, simulando el tratamiento dado a los grupos anteriores, estas diferencias se pueden ver en la Tabla 12.

Tabla 12. Tabla de sensibilización del modelo animal, se presentan las dosis, tiempos y vías en que será expuesto antígeno. OVA: ovoalbúmina; SSI: Solución Salina Isotónica.

| Sensibilización de ratones BALB/c | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|
| Antígeno: ovoalbúmina (OVA) | | | | | |
| Anestesia: Inyección intraperitoneal de 80 µg/g ketamina, 16 µg/g de xilazina y 0.02 mg/kg de atropina. (33) | | | | | |
| Vía y dosis de administración | | | | | |
| Administración | Ratones | | | | |
| Día | I | V | II | III | IV |
| 1 | Intraperitoneal de SSI/100 µg | | Intraperitoneal de OVA/100 µg sin presencia de coadyuvante | | |
| 14 | Intraperitoneal de SSI/100 µg /Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intraperitoneal de OVA/100 µg sin presencia de coadyuvante / Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 27 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 28 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 29 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 47 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 61 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 73 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 74 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |
| 75 | Intranasal de SSI/500 µg, previa anestesia | | Intranasal de OVA/500 µg, previa anestesia | | |

Antes de la administración del alérgeno y del tratamiento en los tiempos definidos se pesaron los animales, para calcular la dosis del anestésico (evitando la toxicidad), se hizo un pesado recurrente cada semana, con el fin de llevar el monitoreo del crecimiento de los ratones.

La anestesia cumplió con la *NOM-062-ZOO-1999. Técnicas experimentales: Anestesia y analgesia*⁽³⁴⁾, utilizando ketamina un anestésico con xilazina un agente sedante y relajante muscular, para potenciar su efecto y evitar dolor a los ratones al administrar OVA vía intranasal, usando las dosis recomendadas por el Comité Asesor de Bioética, FONDECYT-CONICYT⁽³³⁾.

Asimismo, se realizó el monitoreo de los indicadores que se deben tomar en cuenta durante la analgesia.

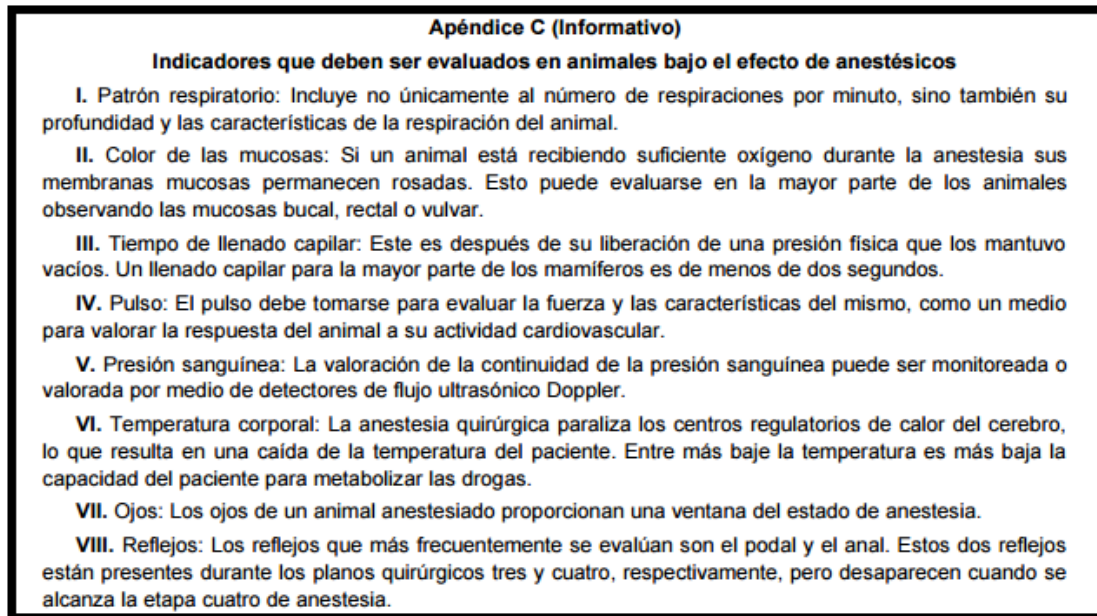


Ilustración 8. Indicadores que deben ser evaluados en los animales experimentales bajo efecto de anestésicos.⁽³⁴⁾

2.5.2 SENSIBILIZACIÓN DEL MODELO MURINO “ESTUDIO COMPLETO”

El método se realizó mediante un estudio experimental básico *in vivo*, usando cinco grupos de ratones Balb/c: Grupo I. Sanos, Grupo II. Enfermos, Grupos III. Enfermos en tratamiento con solución oral, Grupo IV. Enfermos en tratamiento con solución intravenosa y Grupo V: Sanos con tratamiento de solución oral, integrados por 10 ratones macho cada uno para el estudio piloto y 20 ratones (50-50% hembras y machos) para el estudio completo.

Posterior a una semana de adaptación en las condiciones del laboratorio se inició la sensibilización de los animales, como se puede observar en la Tabla 13 los grupos 2 al 4 se sensibilizaron con dos inyecciones de ovoalbúmina (OVA), vía intraperitoneal de 100 µg el día 0 y 14 sin presencia de coadyuvante y se expuso a cada ratón a nueve dosis intranasales de OVA de 500 µg en los días 27, 28, 29, 47, 61, 73, 74 y 75. Para el grupo 1 y 5 (controles sanos) solo se les administró solución salina isotónica intraperitoneal o intranasal según sea el caso, simulando el tratamiento dado a los grupos anteriores.

La solución intranasal se administró mediante el uso de una cánula redondeada de acero inoxidable representada en la Ilustración 9A, formando una gota en la punta y acercando la nariz del animal para que aspire de manera natural el líquido (gota a gota). Los animales no sufrirán

ahogamiento y se evitará lastimar las fosas nasales, este procedimiento se puede ver en la Ilustración 9B, esto es con el fin de generar un modelo de insuficiencia respiratoria.

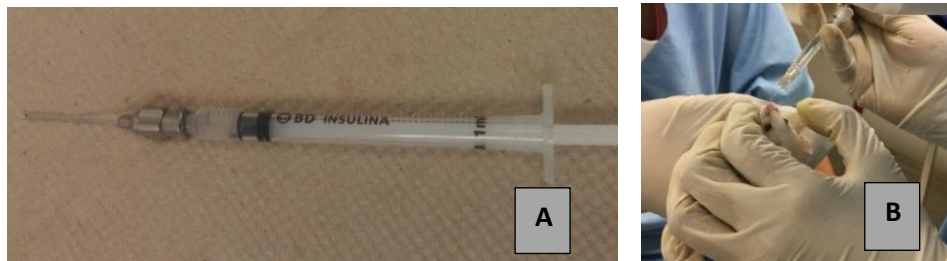


Ilustración 9, Cánula de acero inoxidable (A). Administración de ova intranasal en ratones Balb/c, mediante el uso de una cánula redondeada acercando la gota formada en la punta de esta a la nariz del animal, para que este inhale la OVA (B).

Tabla 13. Sensibilización del modelo animal, se presentan las dosis, tiempos y vías en que será expuesto antígeno. OVA: ovoalbúmina; SSI: Solución Salina Isotónica.

| Sensibilización de ratones BALB/c | | | | | |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------|---|------------------------------------------------------------|---------------------------|----|
| Vía y dosis de administración. Antígeno: ovoalbúmina (OVA) | | | | | |
| Administración | Ratones | | | | |
| | I | V | II | III | IV |
| Día | | | | | |
| 1 | Intraperitoneal de SSI/100 µg | | Intraperitoneal de OVA/100 µg sin presencia de coadyuvante | | |
| 14 | Intraperitoneal de SSI/100 µg | | Intraperitoneal de OVA/100 µg sin presencia de coadyuvante | | |
| 27 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 28 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 29 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 47 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 61 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 73 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 74 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |
| 75 | Intranasal de SSI/500 µg. | | | Intranasal de OVA/500 µg. | |

El medicamento fue administrado mediante el uso de:

- Una jeringa con cánula de alimentación de 25 mm, recta de acero inoxidable para la solución oral, asegurando que la concentración total del fármaco fue administrada en el ratón.
- Una jeringa de 1mL para la solución de teofilina intravenosa (IV) que fue administrada vía intravenosa (IV) en la cola del ratón.

La administración de teofilina se llevó a cabo en dos fases:

1. **La fase de impregnación:** 5 mg/kg/dosis oral/IV el primer día.
2. **La fase de mantenimiento:** 1 mg/kg/dosis oral/IV el segundo y tercer día.

Se administraron las dosis promedio obtenidas a partir de los pesos de los ratones antes de la administración. Se mantiene el régimen terapéutico como un valor constante. Con ello, se asegura que la dosis administrada es acorde al peso del ratón evitando una intoxicación.

Se midió la concentración de teofilina de solución oral (grupo III) y teofilina solución intravenosa (grupo IV) en sangre de ratón, así como los eventos adversos de teofilina solución oral (grupo V), los tratamientos asignados se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Tratamientos del modelo animal, se presentan las dosis, tiempos y vías en que será administrado cada tratamiento para cada grupo de ratones en el estudio (placebo o medicamento).

| Grupo | Condición | Tratamiento | Medicamento | Dosis | | |
|-------|-----------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | | Día 1. Impregnación | Día 2. Mantenimiento | Día 3. Mantenimiento |
| I | Sano | Placebo | Solución Salina Isotónica | 5 mg/kg/dosis oral | 1 mg/kg/dosis vía oral | 1 mg/kg/dosis vía oral |
| II | Enfermo | Placebo | Solución Salina Isotónica | 5 mg/kg/dosis oral | 1 mg/kg/dosis vía oral | 1 mg/kg/dosis vía oral |
| III | Enfermo | Tratamiento A (referencia) | Teofilina solución IV 200 mg/10mL, administradas por vía intraperitoneal. | 5 mg/kg/dosis IV | 1 mg/kg/dosis IV | 1 mg/kg/dosis IV |
| IV | Enfermo | Tratamiento B (prueba) | Teofilina solución oral de 2 mg/mL (Laboratorio de Farmacología, INP). | 5 mg/kg/dosis oral | 1 mg/kg/dosis vía oral | 1 mg/kg/dosis vía oral |
| V | Sano | Tratamiento B (prueba) | Teofilina solución oral de 2 mg/mL (Laboratorio de Farmacología, INP). | 5 mg/kg/dosis oral | 1 mg/kg/dosis vía oral | 1 mg/kg/dosis vía oral |

Se evaluó si el ratón presentó eventos adversos: hipersensibilidad a la inducción de insuficiencia respiratoria o tratamiento. Siendo causa de retiro inmediato del protocolo la manifestación de un evento adverso grave en el animal, por tanto, el sacrificio del ratón con el fin de evitarle sufrimiento innecesario, con puntaje nivel 3 en la escala del dolor, los parámetros se encuentran descritos en la Tabla 15 en negritas.

Tabla 15. Escala del dolor, para valorar el dolor en roedores.

| NIVEL | Leve | Moderado | Grave |
|--------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| PUNTAJE PARAMETRO | 1 | 2 | 3 |
| PESO CORPORAL | Sin ganancia de peso | Pérdida de hasta el 20% de su peso corporal | Pérdida de hasta el 30% de su peso corporal |
| INGESTA Y TOMA DE AGUA | Consumen un 25% menos de lo normal, durante 72 h. | Consumen un 40% menos de lo normal durante 72 h. | Consumen un 60% menos de lo normal por 7 días o muestran anorexia por 72 h. |
| PIEL | Piloerección parcial. | Pelo erizado o marcada piloerección. Nariz, orejas y manos pálidas. | Pelo erizado y deshidratación. Nariz, orejas y manos pálidas y frías. |
| ACTITUD | Deprimido, pero responde normalmente a los estímulos | Deprimido, con respuestas débiles a los estímulos. Poca interacción con sus compañeros. | Indiferente, no responde a estímulos, ni a la manipulación. |
| POSTURA | Encogido ocasionalmente | Encogido frecuentemente. | Encogido con aspecto "paralizado" o inmóvil. |
| VOCALIZACIONES AL MANEJO | Ocasionalmente | Frecuentemente | Vocaliza frecuentemente aún sin que se le toque ni estimule. |
| DESCARGAS ÓCULO-NASALES | Ligeras y ocasionales | Ligera y persistentes | Persistentes y profundas |
| RESPIRACIÓN | Respiración alterada ocasionalmente | Respiración alterada constantemente | Disnea o respiración anormal. |
| TEMBLORES | Ocasionales | Frecuentes, con postraciones transitorias (de < 1 h) | Persistentes, con postraciones > 1 h, Convulsiones. |

2.5.3 MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN

Posterior a la primera administración de tratamiento (día 1 Impregnación: 5 mg/kg/dosis) se midió para los grupos III, IV y V la concentración de fármaco en sangre de ratón a diferentes tiempos

(min), con el fin de evaluar la farmacocinética del medicamento “nuevo” en un modelo animal. Estas se obtuvieron en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h.

La muestra sanguínea en los ratones (no más de 100 µL) se obtuvo mediante un corte en la cola en el ratón:

- El animal sin anestesiarse se sujetó inmovilizando la cabeza para evitar mordeduras. Se limpió la cola del ratón de cualquier resto de heces u orina y se aplicó etanol al 70% dejándolo evaporar.
- Se situó la cola sobre una superficie plana y limpia, realizando un corte perpendicular con una hoja estéril de bisturí, aproximadamente 1-2 mm desde el extremo de la cola.

Toma de muestra para el estudio piloto: La recolección de la muestra se realizó mediante el uso de Tarjeta Guthrie o tarjeta de tamizaje neonatal Whatmann 903, un papel filtro especial en donde se adsorbe la muestra sanguínea tomando gotas de la sangre del ratón como puede verse en la Ilustración 10.

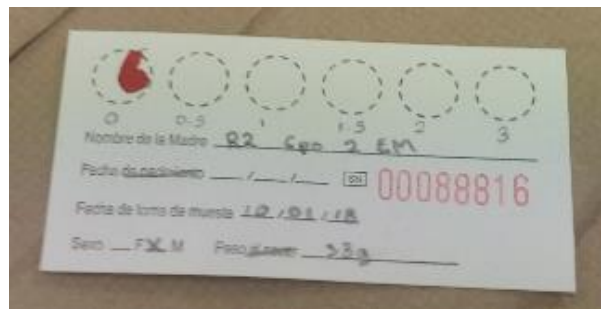


Ilustración 10. Tarjetas Guthrie usadas para la toma de muestra en estudio piloto.

Toma de muestra para el estudio completo: Se recolectó la muestra en micro-tubos eppendorf de 0.6 mL, vertiendo las gotas de la sangre del ratón dentro de tubo como se puede ver en la ilustración 11.



Ilustración 11. Toma de muestra mediante corte en la cola del ratón para el estudio completo.

Se aplicará hemostasia mediante presión suave con una torunda estéril o similar durante 30-45 segundos. Se devolverán los animales a sus jaulas.

En el caso de las tomas consecutivas de sangre, se quitó la costra formada con ayuda de una gasa con agua, se limpió con alcohol al 70% y se tomó la muestra correspondiente. Cabe

mencionar que los animales estuvieron con alimento y agua a disposición en la cinética, para evitar anemia.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo mediante el uso de cromatografía de ultra alta resolución acoplada a masas (UPLC-MS, siglas en inglés) con un volumen de muestra de 20 μ L, fase móvil metanol/ácido fórmico 0.1% (50:50 v/v), flujo 0.1 mL/min, columna C18, el método completo se encuentra descrito en el Anexo 2 (metodología para la cuantificación de teofilina mediante UPLC-MS)

Para la farmacocinética de teofilina se evaluaron las siguientes variables:

- Concentración cero (Cinicial): Cantidad de sustancia por unidad de volumen del plasma. En farmacocinética las concentraciones plasmáticas se emplean como concentración sérica o sanguínea. La Cinicial es la cantidad de sustancia que hay al tiempo cero de la administración, es decir, antes de la administración.
- Vida media de eliminación: En un proceso cinético de primer orden, es el tiempo necesario para que disminuya en un medio, una concentración dada de un fármaco en el organismo.
- Vida media de absorción: En un proceso cinético de primer orden, es el tiempo necesario para que aumente en un medio, una concentración dada de un fármaco en el organismo. Las cuales se calcularon a partir de la regresión de mínimos cuadrados de los logaritmos de las concentraciones plasmáticas en la fase terminal y de absorción respectivamente.
- Área bajo la curva (AUC): En farmacocinética lineal, el AUC es proporcional a la dosis que llega a la circulación sistémica. Se determinó utilizando la regla de trapezoides lineales.
- Tiempo máximo (tm_{ax}): Tiempo en el que, tras una entrada de primer orden, se observará un máximo en la concentración plasmática del fármaco que contiene.
- Concentración plasmática máxima (Cm_{ax}): Es la concentración plasmática máxima alcanzada luego de la administración extravascular de un fármaco y está relacionada con la cantidad absorbida de este. Se determinó experimentalmente.

Para el caso particular del grupo V: También se monitoreó la aparición de reacciones adversas que podrían surgir por la administración de teofilina en solución oral, se evaluó la respuesta con ayuda de la Tabla 15 y pruebas en sangre para medición de:

- Glucosa: en literatura se habla de un aumento en glucosa como reacción adversa en humanos, esperando tengan un efecto similar en el modelo murino.

Las mediciones se realizaron en los siguientes tiempos:

- Oximetría: antes de cada administración individual, cuando son las administraciones de tres días seguidos serán antes y posterior a esas administraciones.
- Variables obtenidas mediante sangre: Al final de la sensibilización y de la administración del tratamiento.
- Cinética: Posterior a la primera administración de tratamiento de teofilina.

En cuanto a la operacionalización de las variables, las tablas 16 y 17 presentan las variables medidas en el estudio preclínico.

Tabla 16 Operacionalización de las variables (clínicas) para el estudio preclínico.

| VARIABLE | TIPO | ESCALA | CÓMO MEDIR | DEPENDENCIA |
|----------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Nivel de saturación de oxígeno (SpO ₂) | Cuantitativa-continua | % | Oxímetro veterinario | Dependiente |
| Frecuencia de pulso | Cuantitativa-continua | Pulsaciones/min | Oxímetro veterinario | Dependiente |
| Nivel de hematocrito | Cuantitativa-continua | Macho 56,3% Hembra 55,4% | Método de micro-hematocrito | Dependiente |
| Glucosa | Cuantitativa-continua | Macho 206 mg/dL Hembra 193 mg/dL | Glucómetro. | Dependiente |
| Peso | Cuantitativa-continua | 18-20 g | Pesado en balanza | Independiente |
| Edad | Cuantitativa-continua | 6-8 semanas | Certificado de Harlan | Independiente |
| Nivel de hemoglobina | Cuantitativa-continua | Macho 15.6 g/dL Hembra: 15.4 g/dL | Método colorimétrico usando ferricianuro de potasio, pasando hemoglobina a metahemoglobina. | Dependiente |

En la columna de escala se observan los valores que se tienen como referencia, de acuerdo con la literatura y los criterios de inclusión.

Tabla 17. Operacionalización de las variables (farmacocinéticas) para el estudio preclínico.

| VARIABLE | TIPO | ESCALA | CÓMO MEDIR | DEPENDENCIA |
|-------------------------------|------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Concentración cero (Cinicial) | Cuantitativa-continua | µg | Metodología HPLC | Independiente |
| Vida media de eliminación | Cuantitativa-continua | min | calcularán a partir de la regresión de mínimos cuadrados de los logaritmos de las concentraciones plasmáticas en la fase terminal y de absorción respectivamente. (Modelo farmacocinético experimental) | Dependiente |
| AUC (área bajo la curva) | Cuantitativa-continua | — | regla de trapezoides lineales | Dependiente |
| C _{máx} | Cuantitativa-continua | µg | Modelo farmacocinético experimental | Dependiente |
| t _{máx} | Cuantitativa-continua | min | Modelo farmacocinético experimental | Dependiente |
| vida media de absorción | Cuantitativa-continua | min | calcularán a partir de la regresión de mínimos cuadrados de los logaritmos de las concentraciones plasmáticas en la fase terminal y de absorción respectivamente (Modelo farmacocinético experimental) | Dependiente |
| sexo | Cualitativa-dicotómica | 1 macho; 2 hembra | Modelo farmacocinético experimental | Independiente |

En la columna de escala se observan los valores que se tienen como referencia, de acuerdo con la literatura y los criterios de inclusión.

2.5.4 MODELO FARMACODINÁMICO

Al terminar el modelo farmacocinético se dejó un periodo de lavado de cuatro días, posterior a ello, se administró la fase de impregnación (1 día) y mantenimiento (2 días) a cada ratón evaluando la respuesta mediante oximetría y observando el comportamiento de cada ratón.

En todos los casos se midió: saturación de oxígeno, pulsaciones por minuto, IgE, hematocrito, hemoglobina, glucosa, se analizaron cortes histopatológicos.

2.5.4.1 SATURACIÓN DE OXÍGENO (SpO₂) Y PULSACIONES POR MINUTO

La saturación de oxígeno es la medida de la cantidad de oxígeno disponible en el torrente sanguíneo. Cuando la sangre es bombeada desde el corazón al cuerpo, primero pasa a través de los pulmones, donde las moléculas de oxígeno se unen a los eritrocitos de la sangre con el fin de ser llevado al resto del cuerpo. El porcentaje de eritrocitos que están completamente saturados con oxígeno se conoce como saturación arterial de oxígeno o nivel de oxígeno en sangre. La frecuencia de pulso o el pulso es el número de latidos cardíacos por minuto.

Las pulsaciones por minuto o la frecuencia cardíaca es el número de veces que el corazón se contrae durante un minuto, cada pulsación corresponde a un latido del corazón y aumenta cuando se realiza una actividad física.

El método utilizado para la medición es el oxímetro veterinario. La oximetría de pulso es un método para medir la cantidad de oxígeno en sangre mediante un aparato denominado oxímetro de pulso, este nivel de oxígeno en sangre se denomina nivel de saturación de oxígeno (SatO₂/SpO₂), expresa el porcentaje de oxígeno transportado en sangre en relación con el máximo de oxígeno capaz de transportarse. En circunstancias normales 89% de los eritrocitos debería contener oxígeno.

El oxímetro de pulso funciona como un dispositivo portátil con un sensor conectado a un cable, este emite rayos de luz roja e infrarroja a través de un lecho capilar pulsante para medir los niveles de oxígeno, también indica la frecuencia cardíaca (pulso). La proporción de rojo a la luz infrarroja transmitida da una medida de la saturación de oxígeno de la sangre. Atiende el principio de que la sangre oxigenada es de un color más brillante de color rojo que el de la sangre sin oxígeno, que es más azul-púrpura. El oxímetro mide la suma de la intensidad de ambos tonos de rojo, que representa las fracciones de la sangre con y sin oxígeno, su uso se describe gráficamente en la Ilustración 12.



Ilustración 12. Medición de saturación de oxígeno y frecuencia de pulso usando oxímetro veterinario.

2.5.4.2 MEDICIÓN DE INMUNOGLOBULINAS (IgE). MÉTODO ELISA

Debido a que algunos parámetros no mostraban evidencia tangible de que la sensibilización estuviese siendo efectiva (oximetría y niveles de hemoglobina), se decidió medir la proporción de IgE, con la finalidad de evaluar cualitativamente la inmunización con ovoalbúmina con la producción de inmunoglobulina E que es el principal mediador de una respuesta alérgica. Se muestrearon a los animales al inicio y al final de la inmunización. La metodología se llevó a cabo mediante una ELISA indirecta sin bloqueo, la metodología completa se encuentra descrita en el Anexo 3 (toma de muestra y determinación de inmunoglobulina E (IgE)).

2.5.4.3 HEMATOCRITO

El nivel de hematocrito es un examen que mide la cantidad de sangre que está compuesta por eritrocitos. Esta medición depende del número de glóbulos rojos. Obtenido mediante el porcentaje de eritrocitos en la sangre, debido a que un valor alto de hematocrito está asociado a niveles bajos de oxígeno en la sangre (hipoxia) similar a lo que pasa en una insuficiencia respiratoria. La medición se llevó a cabo mediante el método de micro hematocrito, la metodología completa se encuentra en el Anexo 4 (Medición de hematocrito).

2.5.4.4 HEMOGLOBINA EN SANGRE

La hemoglobina es una proteína en los glóbulos rojos que transporta oxígeno; cuando los niveles de hemoglobina en sangre son altos, en general, se debe a un nivel bajo de oxígeno en la sangre (hipoxia).

El método usado para cuantificar los niveles de esta proteína en sangre fue un método colorimétrico usando el reactivo de Drabkin, oxidando a la hemoglobina a ciano-metahemoglobina, esta última tiene una tonalidad naranja detectable en el visible, la reacción se puede observar en el Anexo 5 (Cuantificación de hemoglobina).

2.5.4.5 CORTES HISTOLÓGICOS. HISTOPATOLOGÍA

Los cortes de pulmón de ratones Balb/c se tiñeron con la técnica violeta de cresilo, la cual se llevó a cabo para la valoración del daño por inflamación debido a la infiltración de células inmunológicas, causadas por la inflamación aguda con broncoespasmo tardío como cuadro de la fisiopatología del asma.

De cada grupo se separaron dos ratones con la finalidad de teñir los pulmones, limpiando los órganos mediante un proceso llamado perfusión que consiste infundir soluciones para limpiar y endurecer de manera eficiente los órganos a teñir y se incluyeron en parafina de este se hicieron cortes delgados (5 μm de espesor) que se colocaron en portaobjetos para teñir mediante la técnica hematoxilina y eosina, la técnica completa está en el Anexo 6 (Metodología para la tinción de pulmón de ratón Balb/c).

2.5.4.6 GLUCOSA

La glucosa es un carbohidrato utilizado para la obtención de energía. El método utilizado para la medición se realizó mediante el kit de toma de glucosa (glucómetro) con tiras reactivas, Accu-chek Active. Las tiras reactivas contienen una variante mutante de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (mut. Q-GDH 2), pirroloquinolina quinona (cofactor enzimático), Bis-(2-hidroxi-etilo)-(4-hidroxi-iminociclohexa-2,5-dienilidina)-cloruro de amonio y sal de sodio de 2,18-ácido molibdatofosfórico.

La medición consiste en la reacción de oxidación de la glucosa, mediada por la enzima glucosa deshidrogenasa, la glucosa es convertida a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, posteriormente se estima el peróxido mediante la oxidación de un cromógeno en presencia de una peroxidasa para formar un producto de color, el medidor registra este cambio de color y en base a este, calcula el valor de glucemia. Los resultados se obtuvieron en mg/dL.

Se midió como variable de seguridad, debido a que la teofilina puede elevar la concentración de glucosa en sangre.

2.5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Para el tratamiento de los datos, todos los sujetos de investigación fueron incluidos en el análisis estadístico, exceptuando a los sujetos de investigación que no proporcionaron datos evaluables, es decir, aquellos que no tuvieron medición (debido a la muerte del animal).

Se usó estadística descriptiva con el fin de establecer las características de los grupos de estudio, integrada por tablas y gráficas representando medidas de tendencia central y medidas de dispersión.

Se evaluó cada uno de los grupos, comparándolos entre sí, mediante pruebas estadísticas paramétricas, en tanto que no existiera normalidad y/o homogeneidad en las varianzas, los datos se evaluaron con pruebas no paramétricas.

El análisis de los datos de las concentraciones se evaluó utilizando el programa Winnonlin versión 2.1 para la caracterización del perfil farmacocinético y la descripción de cada uno de los parámetros farmacocinéticos. Los resultados de los parámetros farmacocinéticos de las concentraciones plasmáticas del fármaco serán analizados mediante una prueba paramétrica (T-student), en caso de existir distribución diferente a la normal tendría lugar una prueba no paramétrica analizadas con el software SPSS Statistics 24.

2.5.6 ÉTICA

En cuanto a los aspectos éticos, para el uso y anestesia de animales de laboratorio (ratón) se siguió la Norma Oficial Mexicana sobre el *Cuidado y Manejo de Animales NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.*⁽³⁴⁾ Este estudio se considera de acuerdo con la norma como Categoría C, experimentos que causan estrés menor o dolor de corta duración: canulación de cavidades corporales, aunado a inyección de anestésicos y tomas de muestra sanguínea que es Categoría B que causan molestia o estrés mínimo, en la clasificación de actividades experimentales de acuerdo con el grado de invasión, molestia o daño producido sobre los animales de laboratorio.

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO

Se realizó una prueba de estabilidad acelerada en donde se colocó la formulación en solución oral de teofilina a temperaturas de 4°C, 40 °C y 25 °C con humedad ambiental por 190 días, haciendo tres muestreos. La formulación de teofilina en solución oral 1 mg/mL fue elaborada del mismo lote (FCINPT01), separada en frascos goteros de plástico y colocadas a la temperatura correspondiente. Se muestreó cada solución de teofilina SO (1 mg/mL) diluyendo 50 µL (equivalente a 50 µg) de cada una en un matraz volumétrico de 5 mL llevado al aforo con MeOH/H₂O (50:50 v/v), obteniendo una concentración final de 10 µg/mL.

Tabla 18. Resultados obtenidos de la estabilidad acelerada a las diferentes temperaturas.

| FORMULACIÓN 1 mg/mL | MUESTREO 1 T=0 | MUESTREO 2 T=73 DÍAS | MUESTREO 3 T= 190 DÍAS |
|------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 25°C | TRASLÚCIDO Tr=3.417 min C= 10.690 ± 0.626 µg/mL | TRASLÚCIDO Tr=3.406 min C= 9.574 ± 1.145 µg/mL | TRASLÚCIDO Tr= 3.550min C= 6.881 ± 0.151 µg/mL |
| 4°C | TRASLÚCIDO Tr= 3.415 min C= 9.136 ± 1.159 µg/mL | TRASLÚCIDO Tr= 3.415 min C= 11.077 ± 0.626 µg/mL | TRASLÚCIDO AMARILLENTO Tr= 3.300 min C= 4.862 ± 0.419 µg/mL |
| 40°C | TRASLÚCIDO Tr= 3.419 min C= 8.502 ± 0.308 µg/mL | TRASLÚCIDO Tr= 3.411 min C= 10.603 ± 0.102 µg/mL | AMARILLA Tr= 3.340 min C= 8.853 ±0.539 µg/mL |

Tr= tiempo de retención (tiempo al que es detectado por UV el pico cromatográfico de teofilina); C= concentración de teofilina obtenida por cada muestra.

Tabla 19. Apariencia de la formulación al final del tiempo de muestreo a las diferentes temperaturas. Fondo claro y oscuro.



De acuerdo con la Tabla 18, se logró observar que la formulación sigue siendo estable a los 73 días. Cada muestra independientemente de la temperatura para el muestreo 1 y 2, obtuvo un tiempo de retención de $3.3 \pm 5\%$ (3.14-3.47) con concentraciones de $10 \mu\text{g/mL} \pm 15\%$ (8.5-11.5), traslúcidas. En el caso del último muestreo la formulación a temperatura ambiente se mantuvo traslúcida pero su tiempo de retención salió del intervalo permitido de 5% y la concentración disminuyó a $0.353 \mu\text{g/mL}$, detectando otro pico cromatográfico de mayor respuesta a 3.247 min,

en la muestra a 4°C el tiempo estuvo en intervalo pero la concentración disminuyó a 4.862 µg/mL con una apariencia traslúcida amarillenta y la muestra a 40°C no tuvo variación de tiempo de retención ni concentración de teofilina pero se tornó amarillo intenso, por tanto hay una degradación de algún componente de la formulación, estos resultados se ven resumidos en las Tablas 18 y 19.

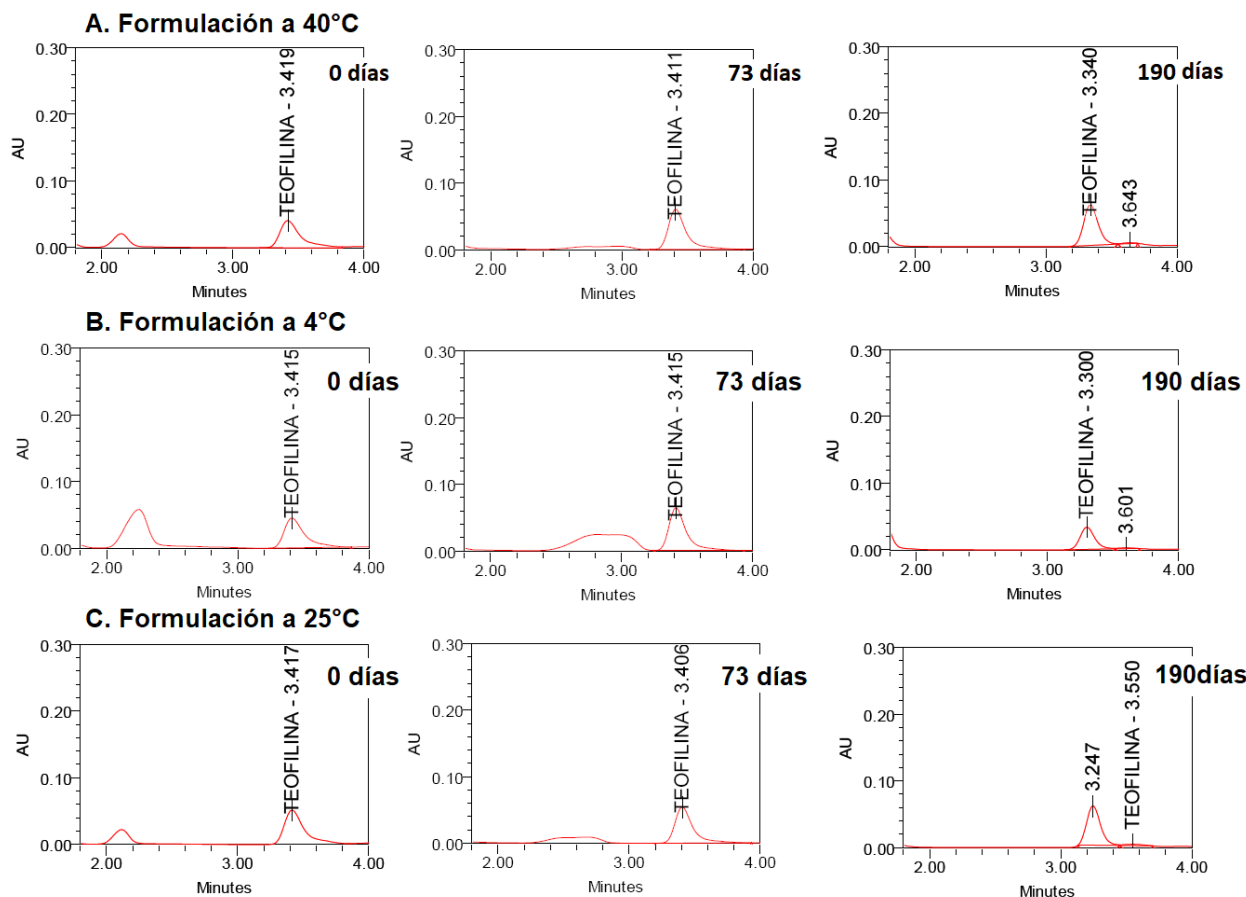


Ilustración 13. Cromatogramas de teofilina para la prueba de estabilidad, mediante la metodología de HPLC detector UV a 40°C. Cromatogramas obtenidos para cada muestreo (tres tiempos) de la estabilidad acelerada a) resultados obtenidos para la formulación en condiciones de temperatura alta 40°C, b) resultados obtenidos para la formulación en condiciones de temperatura baja 4°C, c) resultados obtenidos para la formulación a temperatura ambiente 25°C.

En la Ilustración 13 se muestran los resultados cromatográficos de estabilidad de la formulación de teofilina, donde se observa que en todas las muestras al tiempo uno, independiente de la temperatura de almacenamiento apareció otro pico antes de los 3 minutos debido a compuestos en la formulación. Al segundo tiempo de muestreo el pico de la teofilina permaneció constante, sin embargo, se observó el segundo pico debido a la formulación a un tiempo de retención mayor que al inicio y aplanado. Finalmente, en el último tiempo de muestreo a los 3.6 minutos apareció otro pico detectable en los cromatogramas para todas las diluciones alrededor del pico de la teofilina, siendo una degradación de un compuesto de la formulación, asimismo, se observa una disminución en el tamaño del pico de teofilina, por lo que se puede suponer que ya no es estable la formulación.

3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

De acuerdo con el desarrollo del protocolo de validación se usó una columna de octadecilsilano (C18), 4.6 mm de diámetro interno, 150 mm de longitud y tamaño de partícula de 1 µm, acoplado a un detector UV-Vis a 273 nm para teofilina e isoniazida como estándar interno (1 µg). Los parámetros cromatográficos obtenidos se muestran a continuación.

INFORME DE VALIDACIÓN

LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Tabla 20. Resultados obtenidos para límite de cuantificación y detección de la medición del blanco.

| LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN | |
|--------------------------------------|-------------|
| BCO | Abs (AU) |
| 1 | 0.0000587 |
| 2 | 0.0000498 |
| 3 | 0.0000460 |
| 4 | 0.0000428 |
| 5 | 0.0000426 |
| 6 | 0.0000412 |
| PROM | 0.00004685 |
| DE Abs | 6.57625E-06 |
| LOD | 2.16358E-05 |
| LOC | 6.57625E-05 |

Límite de detección:

$$\text{LOD} = y_B + 3S_B = 0.00004685 + 3 \cdot 6.57625E-06 = 2.16358E-05$$

$$\text{LOC} = y_b + 3S_b = 0.00004685 + 10 \cdot 6.57625E-06 = 6.57625E-05$$

El equipo UPLC alcanza a detectar analitos con una absorbancia de 0.0000216 nm y cuantificarlos con una absorbancia de 0.0000678 nm.

ACARREO

Tabla 21 Resultados obtenidos de la medición de absorbancia (nm) en la prueba de acarreo.

| CONCENTRACION µg/mL | EI | | | ER | | |
|------------------------|----------|--------|-----------|----------|--------|-----------|
| | Abs | ABC | TR min | Abs | ABC | TR min |
| BCO 1 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 0.074855 | 590927 | 2.603 | 0.075218 | 625321 | 3.431 |
| BCO 2 | - | - | - | - | - | - |

La muestra analítica no presenta acarreo, debido a que el blanco de disolventes posterior a la elución de teofilina no presenta señales medibles, lo cual se ve en la tabla 21.

ESTABILIDAD

Tabla 22 Resultados de estabilidad de la muestra es condiciones diversas de estabilidad.

| CONCENTRACIÓN µg/mL | CONDICIÓN | ESTABILIDAD | CONCENTRACIÓN µg/mL | CONDICIÓN | ESTABILIDAD |
|------------------------|-----------|-------------|------------------------|-----------|-------------|
| 10 | 40°C | ESTABLE | 10 | pH 5 | ESTABLE |
| 10 | 25°C | ESTABLE | 10 | pH 10 | NO ESTABLE |
| 10 | 4°C | ESTABLE | 10 | Húmedo | NO ESTABLE |
| 10 | Luz | ESTABLE | 10 | Seco | NO ESTABLE |
| 10 | Oscuro | ESTABLE | 10 | H2O2 | NO ESTABLE |
| 10 | pH 1 | NO ESTABLE | | | |

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 22 se indica que la teofilina es estable a diversas condiciones de temperatura (40, 25 y 4°C), de luz (luz y oscuridad) y a pH=5, sin embargo, es sensible a condiciones extremas de pH=1 y 10, peróxidos y ambientes extremadamente húmedos y secos, posterior a una semana bajo las condiciones señaladas anteriormente.

LINEALIDAD

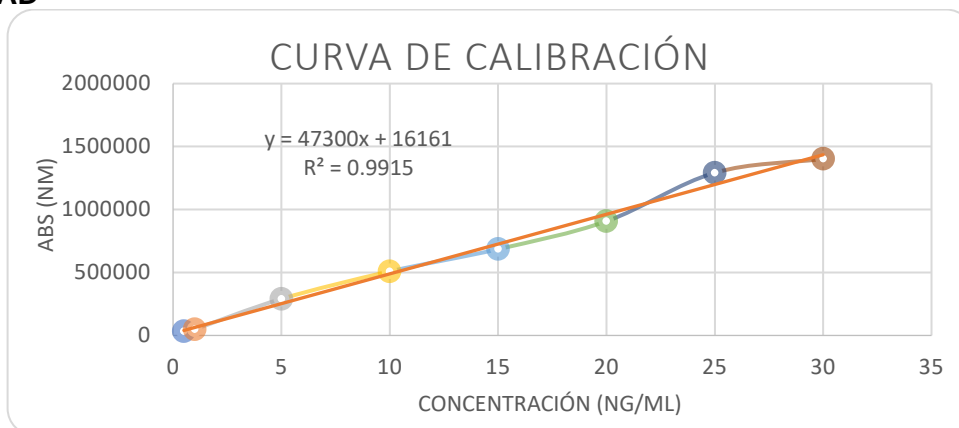


Ilustración 14. Curva de calibración.

En la Ilustración 14 se representa la curva de calibración y se observa que la ecuación de la recta para el estándar de referencia es: $Abs = 47300(\text{conc}) + 16161$, presenta un coeficiente de determinación de 0.9915, por lo que, el modelo predice a la concentración en un 99.15%.

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Tabla 23. Resultados finales de validación.

| Parámetro | Criterios | Resultados |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Linealidad del Sistema | Valor de pendiente (b_1), ordenada al origen (b_0) Coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.98 | $R^2=0.9916$ Abs= 47300(conc)+16161 |
| Linealidad del Método | $R^2 \geq 0.98$ | $R^2=0.9999$ |
| Precisión del Sistema | CV $\leq 2\%$ para métodos físico- químicos. | CV%=1.93 DE=0.224 Prom=11.61 |
| Reproducibilidad | Media aritmética, DE, CV $\leq 2\%$ | CV%=1.34 DE=0.152 Prom=11.34 |
| Repetibilidad | Media aritmética, DE, CV $\leq 2\%$ | CV%=1.88 DE=0.218 Prom=11.60 |
| Acarreo | No presentó acarreo | |
| Límite de detección | $LOD = y_B + 3s_B$ | LOD=0.00004685 + 3*6.57625E-06 = 2.16358E-05 |
| Límite de cuantificación | $LOC = y_b + 10s_b$ | LOC= 0.00004685 + 10*6.57625E-06 = 6.57625E-05 |
| Adecuabilidad | CV 2% respuesta analítica | CV%=0.56 DE=0.065 Prom=11.58 |
| Robustez | Tr no se ve modificado por temperaturas entre 25-40°C. | |
| Exactitud | Promedio aritmético, DE, CV no mayor 2%. | CV%=1.60 DE=0.183 Prom=11.47 IC(μ)=100.996-102.208% |

3.3 MODELO ANIMAL “ESTUDIO PILOTO”

3.3.1 SENSIBILIZACIÓN DE RATONES BALB/C

Se realizó un estudio piloto con la finalidad de probar que la metodología descrita inicialmente era correcta (sensibilización y cinética). En el curso de este estudio se observó que existían variables que debían ser modificadas (enmiendas).

Tabla 24. Características de cada grupo del estudio piloto.

| # | GPO | GRUPO | n | SEXO | EDAD (semanas) | PESO (g) | CONDICIÓN | TRATAMIENTO |
|---|-----|------------------------------|---|-------------|-------------------|----------------|---------------|----------------------------|
| 1 | SN | Sano sin tratamiento | 8 | M (100%) | 37.3 | 31.0 \pm 1.7 | Sano | SSI |
| 2 | EM | Enfermo sin tratamiento | 4 | M (100%) | 37.3 | 32.5 \pm 1.0 | Asma alérgica | SSI |
| 3 | ER | Enfermo con tratamiento IV | 5 | M (100%) | 37.3 | 30.8 \pm 2.3 | Asma alérgica | Teofilina IV |
| 4 | EP | Enfermo con tratamiento oral | 6 | M (100%) | 37.3 | 31.0 \pm 1.9 | Asma alérgica | Teofilina en solución oral |
| 5 | ST | Sano con tratamiento oral | 8 | M (100%) | 37.3 | 31.5 \pm 2.1 | Sano | Teofilina en solución oral |

*M: macho; SSI: solución salina isotónica; IV: intravenosa; $p=0.671$ ANOVA para peso, por tanto, no hay diferencias significativas en la variación de peso por grupo son iguales.

En la Tabla 24 se puede observar la distinción de los grupos por número, abreviatura y significado, las características generales de cada grupo, tamaño de muestra, peso y edad, así como, la asignación de tratamientos y condición de salud.

Cribado de ratones:

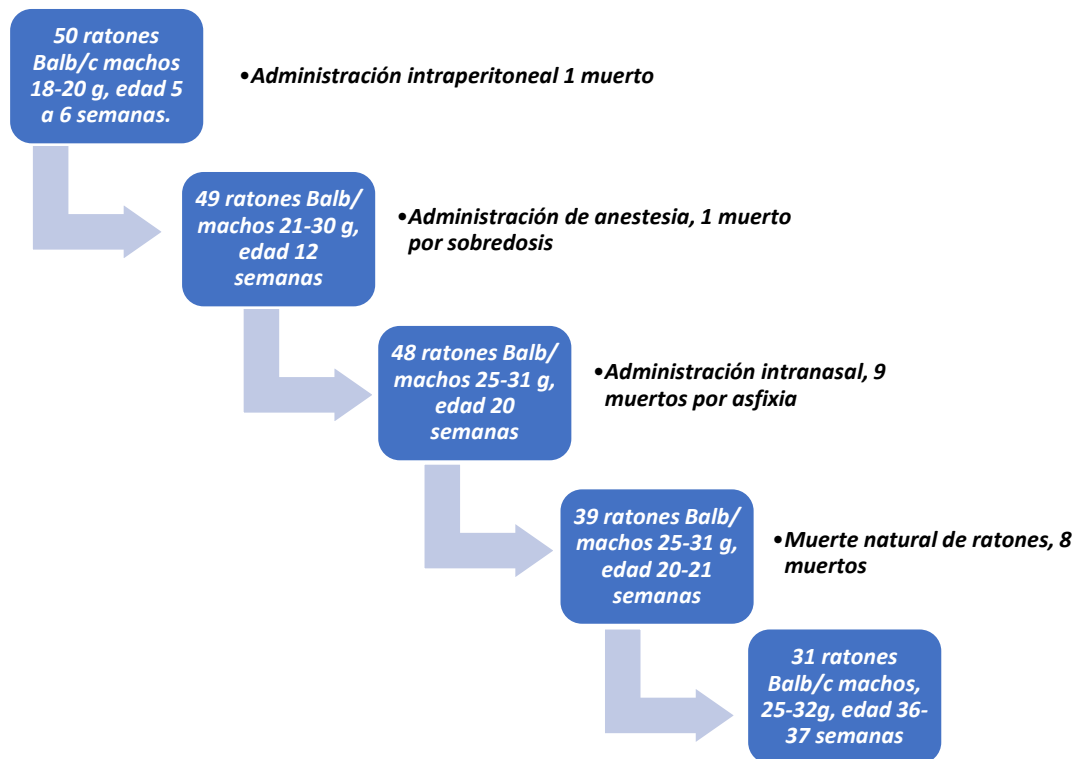


Ilustración 15. Esquema del cribado de ratones Balb/c del piloto.

En la Ilustración 15, se pueden observar las principales razones de disminución del tamaño de la muestra, siendo la más importante la asfixia al administrar la ovoalbúmina y por muerte natural. La sobredosis de anestésico no representó un daño mayor, debido a que se corrigió la dosis administrada.

3.3.2 ANESTESIA DE LOS RATONES BALB/C

En la evolución del estudio se observó que la dosis de anestésico era muy alta para los ratones Balb/c causando en uno la muerte como se indica en la Ilustración 15. Se reajustó la dosis, modificando la pauta a una séptima y una catorceava parte de lo reportado en la literatura lo cual se muestra en la Tabla 25. Cabe mencionar que, la administración se hacía usando una jeringa para insulina con su respectiva aguja como se puede ver en la Ilustración 16.

Tabla 25. Cambio de la dosis de anestésicos administrada vía intraperitoneal (IP) en ratones Balb/c.

| Anestésico | Dosis literatura | Dosis ajustada | Dosis reajustada |
|--------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Ketamina | 461.14 µg | 64.30 µg | 38.58 µg |
| Xilazina | 2305.40 µg | 342.90 µg | 205.74 µg |
| Atropina | 576.47 µg | 20.00 µg | 12.00 µg |
| Total | 0.50 mL | 0.05 mL | 0.03 mL |
| Observación | Dosis letal, genera broncoespasmo y ratón muere | El ratón posterior a dos administraciones (intranasal) IN se vuelve sensible al anestésico y con la OVA genera un espasmo y muere. | El ratón está sedado, pero se evita la broncoaspiración y se evita que el ratón muera. |



Ilustración 16. Administración de ovoalbúmina intranasal.

3.3.3 CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES

CURVA DE CRECIMIENTO POR GRUPO DE LOS RATONES BALB/C (PILOTO)

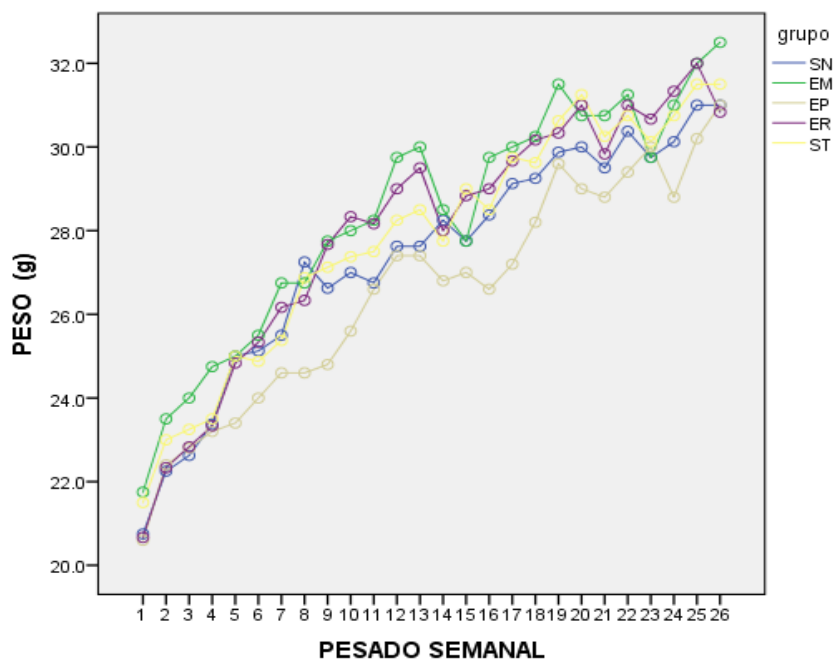


Ilustración 17. Gráfico de control de peso semanal.

Los animales llegaron con una edad de 6 semanas y terminaron con 36 semanas, por lo que se realizó el monitoreo del peso de éstos. La curva de crecimiento de los animales de estudio se puede observar en la Ilustración 17 para cada grupo del estudio piloto.

El peso de los animales antes de la administración de tratamiento (semana 36) no tuvo diferencias significativas entre grupos $p=0.671$, $F=0.593$ con 4 grados de libertad usando un análisis estadístico de ANOVA de una vía, por lo que todos oscilan en el mismo peso.

3.3.4 MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN

3.3.4.1 CINÉTICA DEL ESTUDIO

Los resultados obtenidos en el proceso de validación, para la extracción de teofilina en sangre seca de las tarjetas se muestra en la Ilustración 18 que no existe repetibilidad entre las extracciones (18A y 18B), de igual manera se observa en la Tabla 26 que las respuestas de teofilina A y B varían entre 0.00054 y 0.0012, las interferencias no son las mismas, en el blanco de matriz biológica existen respuestas similares a la extracción A con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de teofilina solo que sin presentar respuesta en el tiempo de teofilina como se puede ver en la Ilustración 18C. Se probó la extracción usando suero, observando señales mejor resueltas con una señal de 3.1 min característica de teofilina y una señal correspondiente a la matriz de 2.2 min, ver la Tabla 26 y la Ilustración 18D.

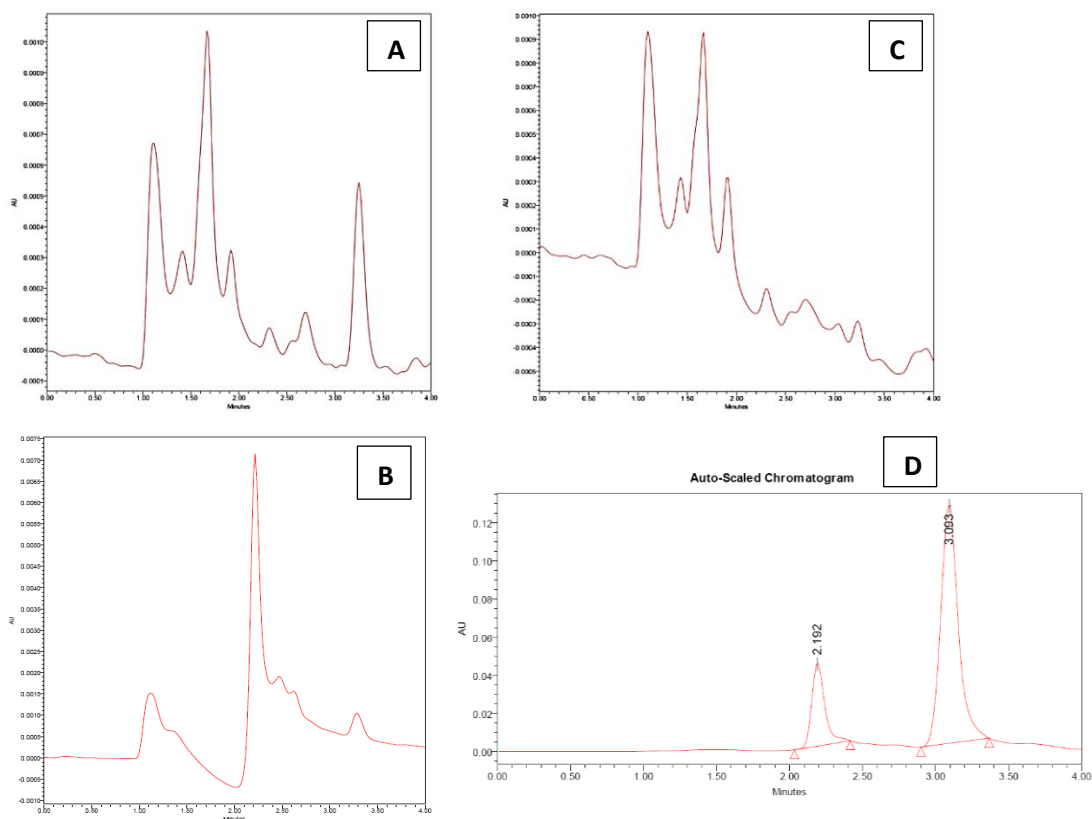


Ilustración 18. A) Extracción de estándar de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de tarjeta Guthrie. Señal de teofilina a 3.3 min respuesta baja, interferencias de mayor respuesta que la teofilina, debidas a la matriz biológica. B) Extracción de estándar de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de tarjeta Guthrie. Señal de teofilina a 3.3 min respuesta baja, interferencias en la respuesta debidas a la matriz biológica (diferente a la respuesta de la extracción A), repetición. C) Extracción del blanco, señales debidas a la matriz biológica sin teofilina. D) Extracción estándar de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de suero. Señal de la teofilina a 3.1 min y respuesta debida a la matriz biológica de 2.2 min.

Tabla 26. Resultados numéricos de las extracciones de teofilina.

| MUESTRA | MATRIZ | TIEMPO DE RETENCIÓN | ABSORBANCIA | OBSERVACIONES |
|-------------|-----------------|---------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------|
| 100 µg/mL A | Tarjeta Guthrie | 3.3 min | 0.00054 AU | Interferencias, dos mayores a la de teofilina: 0.00068 AU y 0.0012 AU. |
| 100 µg/mL B | Tarjeta Guthrie | 3.3 min | 0.0012 AU | Interferencias, dos mayores a la de teofilina: 0.00152 AU y 0.0074 AU. |
| 0 µg/mL | Tarjeta Guthrie | 0 min | 0 AU | Respuestas de la matriz menores a 0.00094 AU |
| 10 µg/mL | Suero | 3.1 min | 0.12 AU | Interferencia de 0.044 AU a los 2.2 min |

3.3.5 MODELO FARMACODINÁMICO

3.3.5.1 OXIMETRÍA

Las mediciones de oximetría se tomaron a lo largo de la sensibilización. Posteriormente se realizaron tres mediciones: antes de administrar el medicamento y a las 3 y 24 horas después de la administración. El oxímetro veterinario nos dio la medición de saturación de oxígeno y pulsaciones por minuto.

3.3.5.1.1 SATURACIÓN DE OXÍGENO

En la Tabla 27 se muestran los resultados de la variable saturación de oxígeno, la cual presentó una distribución diferente a la normal, con respecto a la prueba de normalidad, cabe señalar que solo la variable SPO_2 (11) presenta una distribución normal con un $p=0.058$, un valor de p con tendencia a la significancia, con tendencia a una distribución diferente a la normal. Sin embargo, debido a que la medida de tendencia central que mejor puede representar a estos datos es la mediana, todas las variables se tomaron como libre distribución.

Tabla 27. Medidas de tendencia central de la saturación de oxígeno en la sensibilización y cinética y prueba de normalidad.

| Variable | GPO. SN | GPO. EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|---------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| SPO_2 (1) | 98.00 (92.75-98.75) | 98.50 (94.00-100.00) | 99.00 (97.50-99.25) | 98.00 (90.50-98.50) | 95.50 (92.00-99.00) | 0.000 |
| SPO_2 (2) | 97.00 (93.50-98.75) | 91.50 (85.50-98.25) | 94.00 (94.00-96.00) | 97.00 (93.00-99.00) | 91.00 (87.25-98.50) | 0.006 |
| SPO_2 (3) | 97.00 (84.75-98.00) | 98.00 (96.50-98.75) | 98.00 (98.00-99.00) | 98.00 (97.50-98.50) | 96.00 (82.75-99.00) | 0.000 |
| SPO_2 (4) | 97.00 (93.99-98.75) | 91.50 (83.75-97.00) | 97.00 (92.75-98.25) | 90.00 (86.50-96.50) | 95.50 (91.50-98.75) | 0.005 |
| SPO_2 (5) | 98.50 (92.50-99.75) | 87.50 (87.00-94.00) | 96.50 (87.75-98.50) | 98.00 (87.50-99.00) | 87.50 (85.00-93.75) | 0.000 |
| SPO_2 (6) | 94.50 (93.00-95.75) | 96.00 (87.50-97.75) | 96.00 (84.25-99.00) | 98.00 (95.50-98.50) | 98.00 (95.00-98.75) | 0.000 |
| SPO_2 (7) | 96.50 (85.75-98.75) | 96.50 (92.50-99.00) | 89.50 (83.99-95.75) | 94.00 (85.50-97.50) | 95.00 (87.75-98.00) | 0.001 |
| SPO_2 (8) | 97.00 (92.50-98.00) | 98.00 (88.25-98.75) | 98.50 (89.25-99.00) | 98.00 (88.00-98.50) | 92.00 (83.25-98.00) | 0.000 |
| SPO_2 (9) | 99.00 (98.00-99.00) | 99.00 (90.75-99.00) | 97.00 (94.50-99.00) | 91.00 (88.00-98.50) | 91.00 (84.50-95.00) | 0.000 |
| SPO_2 (10) | 98.00 (94.00-99.00) | 91.00 (84.75-98.00) | 92.00 (90.00-99.00) | 93.00 (84.50-94.50) | 89.00 (85.75-92.75) | 0.037 |
| SPO_2 (11) | 92.50 (90.00-97.75) | 95.50 (90.00-98.00) | 93.00 (91.25-94.00) | 91.00 (89.50-93.50) | 93.00 (88.25-98.00) | 0.058 |
| SPO_2 (FC1) | 95.50 (87.50-99.00) | 98.00 (96.50-99.55) | 96.50 (93.25-98.50) | 98.00 (93.00-99.00) | 95.50 (87.75-98.75) | 0.000 |
| SPO_2 (FC2) | 98.00 (94.75-99.50) | 92.00 (86.50-93.00) | 94.50 (86.50-97.00) | 96.00 (92.00-98.00) | 95.00 (89.00-97.75) | 0.018 |
| SPO_2 (FC3) | 97.00 (90.75-99.00) | 97.50 (90.25-98.75) | 98.00 (82.75-99.25) | 97.00 (90.00-98.50) | 96.50 (89.75-99.00) | 0.000 |

SPO_2 : Saturación de oxígeno; p: prueba estadística de normalidad (Shapiro-Wilk), mediana y rango intercuartilar (25-75).

Se usó una prueba estadística no paramétrica de Friedman, para variables con distribución diferente a la normal y comparación de variables relacionadas, ver rangos en la Tabla 29. El

análisis estadístico arrojó que no hay diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, como se puede observar en la Tabla 28 los valores de p son mayores a 0.05 (valor para aceptar Ho), excepto en el grupo de ratones sensibilizados (ER) $p=0.031$.

Tabla 28. Resultados estadísticos de la oximetría, saturación de oxígeno, para cada grupo durante la sensibilización.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Sig. | 0.193 | 0.374 | 0.031 | 0.187 | 0.174 |
| Chi cuadrado | 13.588 | 10.791 | 19.811 | 13.707 | 13.976 |

Tabla 29. Resultados estadísticos de la prueba Friedman para saturación de oxígeno, medidas de tendencia central y rangos de la prueba del grupo ER.

| | N | Media | Desviación estándar | Mínimo | Máximo | Rango promedio |
|----------|---|---------|---------------------|--------|--------|----------------|
| PO2MV1 | 6 | 98.50 | 1.378 | 96 | 100 | 9.50 |
| SPO2MV2 | 6 | 95.00 | 2.000 | 94 | 99 | 5.33 |
| SPO2MV3 | 6 | 98.33 | .516 | 98 | 99 | 8.42 |
| SPO2MV4 | 6 | 96.00 | 2.828 | 92 | 99 | 6.08 |
| SPO2MV5 | 6 | 94.33 | 5.538 | 87 | 100 | 6.08 |
| SPO2MV6 | 6 | 92.8333 | 7.44088 | 82.00 | 99.00 | 5.25 |
| SPO2MV7 | 6 | 89.6667 | 6.74290 | 83.00 | 98.00 | 3.33 |
| SPO2MV8 | 6 | 95.3333 | 5.39135 | 87.00 | 99.00 | 6.67 |
| SPO2MV9 | 6 | 96.6667 | 2.33809 | 93.00 | 99.00 | 7.00 |
| SPO2MV10 | 6 | 93.6667 | 4.22690 | 90.00 | 99.00 | 4.67 |
| SPO2MV11 | 6 | 92.8333 | 2.56255 | 89.00 | 97.00 | 3.67 |

La medición al administrar el medicamento no presentó diferencias significativas en ningún caso como se puede observar en la Tabla 30.

Tabla 30. Resultados estadísticos de la oximetría, saturación de oxígeno, para cada grupo durante la administración del medicamento.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.131 | 0.174 | 0.311 | 0.568 | 0.968 |
| Chi cuadrado | 4.065 | 3.500 | 2.333 | 1.130 | 0.065 |

3.3.5.1.2 PULSACIONES POR MINUTO

Esta variable presentó una distribución diferente a la normal, con respecto a la prueba de normalidad, cabe señalar que algunas de las variables presentaron distribución normal, sin embargo, debido a que la medida de tendencia central que mejor puede representar a todos estos datos es la mediana, todas las variables se tomaron como libre distribución, lo cual se expresa en la Tabla 31.

Se usó una prueba estadística no paramétrica de Friedman para variables con distribución diferente a la normal y comparación de variables relacionadas. El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, exceptuando el grupo ST, como se puede observar en la Tabla 32. Para la medición

al administrar el medicamento de igual manera solo presentó diferencias el grupo ST, los valores de p se pueden observar en la Tabla 34.

Tabla 31. Medidas de tendencia central de las pulsaciones por minuto en la sensibilización y cinética y prueba de normalidad.

| Variable | GPO. SN | GPO. EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|-----------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------|
| HPM (1) | 49.00 (45.50-64.75) | 57.00 (47.25-65.25) | 55.50 (51.25-65.75) | 51.00 (48.50-70.00) | 52.50 (38.25-54.00) | 0.016 |
| HPM (2) | 57.50 (51.75-60.25) | 54.00 (43.00-68.75) | 55.50 (44.75-75.25) | 64.00 (51.00-70.50) | 49.00 (35.25-68.00) | 0.605 |
| HPM (3) | 52.50 (39.75-76.75) | 51.50 (45.75-57.25) | 57.50 (50.00-65.25) | 67.00 (43.00-79.00) | 55.50 (51.25-81.50) | 0.169 |
| HPM (4) | 48.00 (40.25-63.50) | 45.00 (41.25-50.25) | 67.50 (47.50-78.50) | 77.00 (41.50-96.00) | 52.50 (45.00-60.75) | 0.026 |
| HPM (5) | 61.50 (45.75-61.50) | 77.50 (59.50-91.75) | 50.50 (44.50-70.25) | 69.00 (48.00-114.00) | 55.50 (49.00-69.75) | 0.000 |
| HPM (6) | 50.00 (44.50-70.25) | 50.50 (38.75-72.75) | 78.50 (56.00-96.50) | 67.00 (50.50-103.50) | 63.50 (51.00-79.00) | 0.043 |
| HPM (7) | 57.50 (52.50-72.00) | 53.00 (43.25-69.50) | 47.50 (36.75-71.00) | 57.00 (49.00-75.50) | 41.00 (37.50-58.25) | 0.123 |
| HPM (8) | 53.50 (51.50-61.00) | 68.50 (59.50-88.00) | 53.50 (38.75-77.25) | 50.00 (42.00-101.50) | 68.50 (53.00-99.75) | 0.005 |
| HPM (9) | 69.00 (63.25-81.25) | 55.50 (36.50-106.00) | 70.50 (50.50-86.25) | 54.00 (50.00-81.50) | 60.50 (52.25-70.50) | 0.422 |
| HPM (10) | 68.00 (60.25-89.25) | 47.00 (37.25-54.50) | 64.50 (44.25-110.25) | 48.00 (45.50-67.00) | 51.50 (44.50-52.00) | 0.002 |
| HPM (11) | 51.00 (37.25-61.50) | 40.50 (39.25-53.75) | 51.50 (4.25-69.25) | 45.00 (42.00-71.00) | 45.50 (35.75-52.00) | 0.141 |
| HPM (FC1) | 45.50 (35.00-96.50) | 45.50 (40.25-58.25) | 47.00 (43.00-60.25) | 55.00 (54.00-70.50) | 59.00 (43.75-86.25) | 0.000 |
| HPM (FC2) | 53.00 (50.50-86.75) | 46.00 (41.75-58.50) | 69.00 (48.25-90.00) | 63.00 (50.50-151.50) | 55.50 (46.00-85.50) | 0.000 |
| HPM (FC3) | 50.00 (41.75-60.00) | 51.50 (44.50-83.25) | 59.50 (56.75-63.25) | 52.00 (47.50-57.50) | 57.00 (40.25-65.75) | 0.168 |

HPM: Pulsaciones por minuto; p: prueba estadística de normalidad (Shapiro-Wilk); mediana y rango intercuartilar (25-75).

Tabla 32. Resultados estadísticos de la oximetría, pulsaciones por minuto para cada grupo durante la sensibilización.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|--------|--------|-------|-------|--------|
| Sig. | 0.065 | 0.162 | 0.580 | 0.909 | 0.032 |
| Chi cuadrado | 17.439 | 14.247 | 8.498 | 4.717 | 19.710 |

Tabla 33. Resultados estadísticos de la prueba Friedman para pulsaciones por minuto, medidas de tendencia central y rangos de la prueba para el grupo ST.

| VARIABLE | N | Media | Desviación estándar | Mínimo | Máximo | Rango promedio |
|----------|---|---------|---------------------|--------|--------|----------------|
| HPMV1 | 8 | 50.38 | 14.192 | 31 | 78 | 4.75 |
| HPMV2 | 8 | 50.25 | 17.434 | 27 | 70 | 4.81 |
| HPMV3 | 8 | 62.13 | 17.570 | 43 | 90 | 7.38 |
| HPMV4 | 8 | 53.38 | 8.634 | 42 | 67 | 5.56 |
| HPMV5 | 8 | 58.1250 | 10.92098 | 46.00 | 75.00 | 6.88 |
| HPMV6 | 8 | 65.0000 | 18.26785 | 39.00 | 96.00 | 7.81 |
| HPMV7 | 8 | 46.3750 | 13.67936 | 32.00 | 72.00 | 3.81 |
| HPMV8 | 8 | 76.0000 | 32.16475 | 40.00 | 138.00 | 8.13 |
| HPMV9 | 8 | 61.1250 | 12.27585 | 40.00 | 79.00 | 7.88 |
| HPMV10 | 8 | 52.3750 | 13.50066 | 37.00 | 83.00 | 5.06 |
| HPMV11 | 8 | 44.5000 | 9.08688 | 32.00 | 58.00 | 3.94 |

Tabla 34. Resultados estadísticos de la oximetría, pulsaciones por minuto, para cada grupo durante la administración del medicamento.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.657 | 0.526 | 0.223 | 0.076 | 0.000 |
| Chi cuadrado | 0.839 | 1.286 | 3.000 | 5.158 | 1.000 |

3.3.5.2 MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA)

Los parámetros de oxigenación no dieron una evaluación clara acerca de la sensibilización, por lo que se evaluó el aumento de la IgE de manera cualitativa, estandarizando la técnica y tomando muestras de ratón pre y post al proceso de sensibilización.

Tabla 35. Metodologías realizadas para evaluar viabilidad de anti-IgE, estandarización de la técnica y medición de IgE.

| ELISAS | PROCEDIMIENTO | RAZÓN |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| DIRECTA | Por diluciones (1:100) PLACA1: sueros ratón PLACA 2: Sueros humanos | Viabilidad de anti-IgE. |
| CAPTURA | Por diluciones (1:100) PLACA1: sueros ratón PLACA 2: Sueros humanos | Viabilidad de anti-IgE, dilución de suero y anticuerpos. |
| CAPTURA | PRE Y POST suero de ratón. CAMBIOS DE TIEMPOS DE LAVADO | Estandarización |
| CAPTURA | SANGRIA S1 Y S6. Forrado con ANTI-IgE y bloqueo con albúmina | Estandarización |
| CAPTURA | Sueros al tiempo: S1, S4 Y S6. Forrado con ANTI-IgE y bloqueo con albúmina | Estandarización |
| CAPTURA | Placa 1: forrado con ANTI-IgE y bloqueo con leche descremada Placa 2: forrado con OVA sin bloqueo | Estandarización |
| CAPTURA | Forrado de OVA diferentes concentraciones: 4, 2, 1, 0.5 µg/mL | Estandarización, dilución de OVA |
| CAPTURA | Forrado con OVA; sueros de ratones macho Balb/c. Prueba de sueros con forrado de Anti-IgE sin bloqueo. | Evaluación de sueros |

Se estandarizó la metodología evaluando la viabilidad del Anti-IgE, el cruce del anticuerpo humano con antígeno de ratón, estandarización de la dilución de trabajo tanto de los sueros como del control positivo, mediante una ELISA directa. Usando una concentración de 2 µg/mL de IgE para en control positivo, el suero a una dilución 1:50 y de anti-IgE conjugada con peroxidasa 1:500.

Se realizó una ELISA de captura forrando con anti-IgE el pozo, colocando la IgE o bien el suero de ratón y cerrando la captura con anti-IgE con peroxidasa, a fin de mejorar la detección, se cambió la metodología varias veces como se puede observar en la Tabla 35. La metodología quedó estandarizada con una ELISA de captura forrada con el antígeno (OVA, 1 µg/mL) sin bloqueo, diluyendo el suero 1:50, el anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido 1:500.

3.3.5.3 ÍNDICE DE HEMATOCRITO

Las variables para la medición del porcentaje de hematocrito presentan distribución diferente a la normal con una $p=0.014$ de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk). Por lo que se usó una prueba Kruskal Wallis para la comparación de %IHC.

Tabla 36. Medidas de tendencia central y dispersión del %IHC y pruebas de normalidad.

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| %IHC | 43.39 (45.45-49.09) | 55.24 (39.26-72.83) | 47.90 (46.32-51.74) | 25.76 (12.18-28.26) | 49.21 (44.63-51.35) | 0.014 |

p obtenida de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk; %IMC índice de hematocrito porcentual.

Tabla 37. Resultados del análisis estadístico rangos y p (Kruskall-Wallis).

| Rangos | | | Estadísticos de prueba | |
|--------|----|----------------|------------------------|--------|
| grupo | N | Rango promedio | | %IMC |
| SN | 7 | 17.29 | Chi-cuadrado | 12.163 |
| EM | 4 | 18.25 | gl | 4 |
| EP | 5 | 3.00 | Sig. asintótica | 0.016 |
| ER | 6 | 18.17 | | |
| ST | 8 | 18.38 | | |
| Total | 30 | | | |

La prueba estadística arrojó una $p=0.016$, por lo que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, los resultados están descritos en la Tabla 37. El porcentaje de hematocrito es diferente para al menos un grupo, por ello, se realizó una prueba de U de Mann Whitney para ver las diferencias entre los grupos, en la Tabla 38, se puede observar que los grupos tienen diferencias significativas con respecto al EP (grupo enfermo con administración de tratamiento IV).

Tabla 38. Pruebas separadas U de Mann Whitney, para ver diferencia por grupo.

| Grupos para comparar | | Suma de rangos | | U de Mann Whitney | Sig asintótica (bilateral) | Sig. Exacta (unilateral) |
|----------------------|-----------|----------------|--------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|
| SN | EM | 41.00 | 25.00 | 13.000 | 0.850 | 0.927 |
| SN | EP | 63.00 | 15.00 | 0.000 | 0.004 | 0.003 |
| SN | ER | 48.00 | 43.00 | 20.000 | 0.886 | 0.945 |
| SN | ST | 53.00 | 67.00 | 25.000 | 0.728 | 0.779 |
| EM | EP | 30.00 | 15.00 | 0.000 | 0.014 | 0.016 |
| EP | ER | 15.00 | 51.00 | 0.000 | 0.006 | 0.004 |
| EM | ER | 22.00 | 33.00 | 12.000 | 1.000 | 1.000 |
| ST | EP | 15.00 | 76.00 | 0.000 | 0.003 | 0.002 |
| ST | EM | 52.00 | 26.00 | 16.000 | 1.000 | 1.000 |
| ST | ER | 45.00 | 60.00 | 24.000 | 1.000 | 1.000 |

3.3.5.4 HEMOGLOBINA

La variable de hemoglobina presenta distribución normal con una $p= 0.341$ de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk), descrita en la Tabla 39. Se usó una prueba estadística paramétrica de ANOVA de una vía para la comparación de Hb, arrojando un resultado no significativo descrito en la Tabla 40.

Tabla 39. Medidas de tendencia central y dispersión de Hemoglobina (Hb) y pruebas de normalidad.

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Hb | 20.43 ±6.92 | 19.04 ±6.92 | 23.46 ±3.72 | 19.29 ±5.32 | 20.99 ±2.87 | 0.341 |

Tabla 40. Prueba estadística paramétrica ANOVA una vía para hemoglobina.

| ANOVA | | | | | | |
|-------|------------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| HbMV1 | Entre grupos | 67.443 | 4 | 16.861 | .610 | .659 |
| | Dentro de grupos | 718.868 | 26 | 27.649 | | |
| | Total | 786.311 | 30 | | | |

3.3.5.5 CORTES HISTOPATOLÓGICOS

La metodología inicial de la histopatología fue la siguiente: Al realizar el sacrificio de ratones mediante guillotina, se tomó el cuerpo del ratón y se extrajo la muestra de pulmón de cada ratón, el corte se realizó tomando una fracción del lóbulo superior, se sumergió en solución fijadora de paraformaldeído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 por un periodo aproximado de 72 horas para limpiar las estructuras y fijarlas completamente. Éstas se incluyeron en parafina y de aquí se siguió la misma metodología que la descrita en el Anexo 6.

Los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina, para la valoración del daño por inflamación debido a la infiltración de células inmunológicas. Las observaciones obtenidas al revisar las laminillas a través del microscopio a 60x, dieron los siguientes resultados:

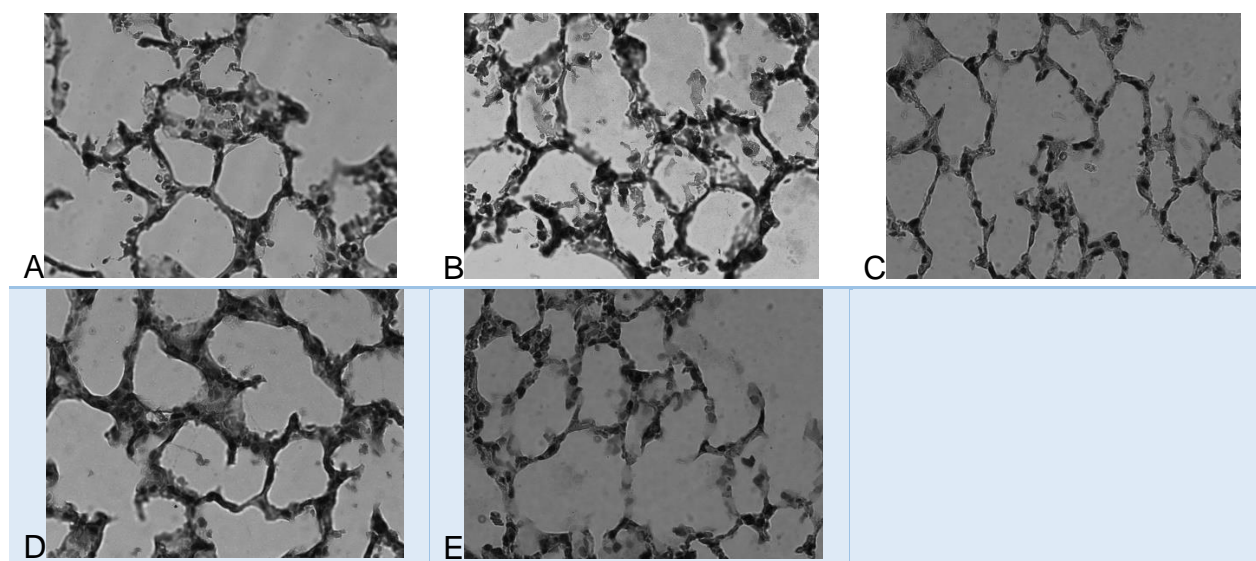


Ilustración 19. Fotografía de los cortes de pulmón teñido con eosina-hematoxilina.

- A) Grupo SN Control Negativo:** Pulmón de un animal sano tratado con solución salina (placebo), no se encontraron ningún infiltrado inflamatorio e inmunológico.
- B) Grupo EM Control positivo:** Animal enfermo tratado con solución salina (placebo), se ve infiltrado de células inmunológicas.
- C) Grupo ER Enfermo referencia:** Animal enfermo tratado con teofilina intravenosa 200 mg/10 mL (referencia), no se observa infiltrado inmunológico.
- D) Grupo EP Enfermo Prueba:** Animal enfermo tratado con teofilina solución oral 2 mg/mL (prueba), no se observa infiltrado inmunológico.

E) Grupo ST Control con tratamiento: Animal sano tratado con teofilina en solución oral 2mg/mL (prueba), no se observa infiltración de células inmunológicas.

3.3.5.6 GLUCOSA

La variable presenta distribución normal $p=0.785$, descrito en la Tabla 41. Por ello, se usó una prueba ANOVA de una vía para la comparación de Glucosa, obteniendo una $p=0.204$, ver Tabla 42. En este caso no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 41. Estadística descriptiva de la variable glucosa. (media y desviación estándar)

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| GLUCOSA | 157.25 ±21.85 | 139.25 ±30.61 | 136.67 ±15.48 | 151.60 ±16.09 | 135.50 ±18.85 | 0.785 |

Tabla 42. Resultado del análisis estadístico ANOVA de una vía para glucosa.

| ANOVA | | | | | |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 2678.765 | 4 | 669.691 | 1.601 | .204 |
| Dentro de grupos | 10872.783 | 26 | 418.184 | | |
| Total | 13551.548 | 30 | | | |

RESUMEN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO PILOTO.

Tabla 43. Resumen de las variables del estudio piloto (estadística descriptiva y p de la prueba estadística correspondiente).

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| SPO ₂ (I) | 98.00 (92.75-98.75) | 98.50 (94.00-100.00) | 99.00 (97.50-99.25) | 98.00 (90.50-98.50) | 95.50 (92.00-99.00) | 0.000 |
| SPO ₂ (II) | 92.50 (90.00-97.75) | 95.50 (90.00-98.00) | 93.00 (91.25-94.00) | 91.00 (89.50-93.50) | 93.00 (88.25-98.00) | 0.058 |
| SPO ₂ (FC1) | 95.50 (87.50-99.00) | 98.00 (96.50- 99.55) | 96.50 (93.25- 98.50) | 98.00 (93.00- 99.00) | 95.50 (87.75- 98.75) | 0.000 |
| SPO ₂ (FC3) | 97.00 (90.75-99.00) | 97.50 (90.25-98.75) | 98.00 (82.75-99.25) | 97.00 (90.00-98.50) | 96.50 (89.75-99.00) | 0.000 |
| HPM (I) | 49.00 (45.50-64.75) | 57.00 (47.25-65.25) | 55.50 (51.25-65.75) | 51.00 (48.50-70.00) | 52.50 (38.25-54.00) | 0.016 |
| HPM (II) | 51.00 (37.25-61.50) | 40.50 (39.25-53.75) | 51.50 (4.25-69.25) | 45.00 (42.00-71.00) | 45.50 (35.75-52.00) | 0.141 |
| HPM (FC1) | 45.50 (35.00-96.50) | 45.50 (40.25-58.25) | 47.00 (43.00-60.25) | 55.00 (54.00-70.50) | 59.00 (43.75-86.25) | 0.000 |
| HPM (FC3) | 50.00 (41.75-60.00) | 51.50 (44.50-83.25) | 59.50 (56.75-63.25) | 52.00 (47.50-57.50) | 57.00 (40.25-65.75) | 0.168 |
| Hb | 20.43 ±6.92 | 19.04 ±6.92 | 23.46 ±3.72 | 19.29 ±5.32 | 20.99 ±2.87 | 0.341 |
| GLUCOSA | 157.25 ±21.85 | 139.25 ±30.61 | 136.67 ±15.48 | 151.60 ±16.09 | 135.50 ±18.85 | 0.785 |
| %IHC | 43.39 (45.45-49.09) | 55.24 (39.26-72.83) | 47.90 (46.32-51.74) | 25.76 (12.18-28.26) | 49.21 (44.63-51.35) | 0.014 |

En esta tabla 43 se muestran las medianas y rangos de cada variable por grupo, de igual modo, se describe el valor de p, un valor menor a 0.05 representa significancia estadística, por lo tanto, hay diferencia entre los grupos y un valor mayor a 0.05 indica que no hay diferencias entre los grupos.

3.3.6 CAMBIOS HECHOS AL PILOTO: ENMIENDAS AL ESTUDIO

- *Anestesia:* Se evitó usar jeringa de 1 mL con aguja y administración de anestesia, cambiando al uso de una cánula de acero inoxidable con punta redondeada al administrar la solución intranasal de ovoalbúmina.
- *Medición de parámetros en sangre:* Se decidió realizar la medición de Inmunoglobulina E como parámetro sanguíneo de certeza en la respuesta de asma alérgica del ratón.
- *Cinética y toma de muestra:* Se tomó la muestra de la cola siendo recolectada en microtubo de 0.6 mL para la farmacocinética, sin usar tarjetas Guthrie o sangre total. La obtención de muestra para la medición de IgE será mediante la toma retra-ocular al inicio y al final de la sensibilización.
- *Histopatología:* Se decidió realizar un proceso de perfusión a dos animales de cada grupo para mejorar la tinción del tejido, continuando con la inclusión, corte del micrótopo y tinción eosina-hamatoxilina.

Posterior a las modificaciones realizadas en el estudio piloto, se llevó a cabo el estudio completo con 100 ratones Balb/c hembras y machos (50:50).

3.4 MODELO ANIMAL: ESTUDIO COMPLETO

Tabla 44. Características generales de estudio completo.

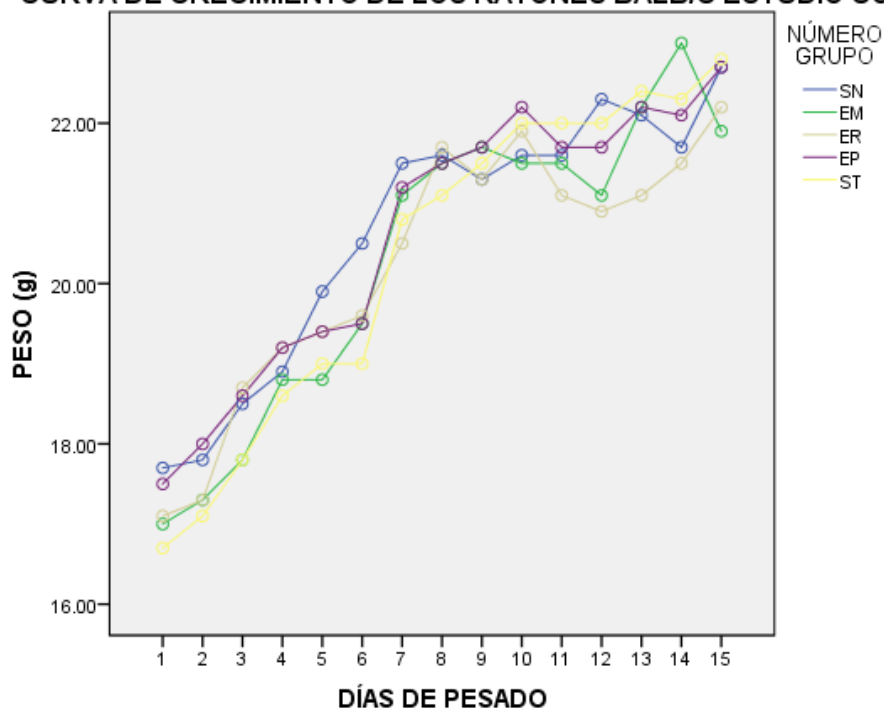
| # | GPO | GRUPO | n | SEXO | EDAD (semanas) | PESO (g) | CONDICIÓN | TRATAMIENTO |
|---|-----|-------------------------------------|----|-------|-------------------|------------|---------------|----------------------------|
| 1 | SN | <i>Sano sin tratamiento</i> | 19 | 45% H | 22.9 | 24 (23-28) | Sano | SSI |
| 2 | EM | <i>Enfermo sin tratamiento</i> | 20 | 50% H | 22.9 | 26 (22-30) | Asma alérgica | SSI |
| 3 | ER | <i>Enfermo con tratamiento IV</i> | 20 | 50% H | 22.9 | 25 (22-28) | Asma alérgica | Teofilina IV |
| 4 | EP | <i>Enfermo con tratamiento oral</i> | 20 | 50% H | 22.9 | 25 (23-28) | Asma alérgica | Teofilina en solución oral |
| 5 | ST | <i>Sano con tratamiento oral</i> | 20 | 50% H | 22.9 | 25 (23-30) | Sano | Teofilina en solución oral |

*H: Hembras; SSI: Solución Salina Isotónica; IV: Intravenoso

3.4.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES

De manera similar al estudio piloto, se llevó a cabo un monitoreo de peso de los animales del estudio completo, lo cual se muestra en la Ilustración 20. El peso de los animales antes de la administración de tratamiento (semana 21) no tuvo diferencias significativas entre grupos $p=0.984$, $F=0.095$ con 4 grados de libertad usando un análisis estadístico de ANOVA de una vía.

CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES BALB/C ESTUDIO COMPLETO



Las covariables que aparecen en el modelo se evalúan en los valores siguientes: MACHO/HEMBRA
JOVENES = 2.0000

Ilustración 20. Curva de crecimiento de ratones Balb/c estudio completo (Monitoreo de peso).

3.4.2 MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN

Como se mencionó en el estudio piloto la matriz de extracción del fármaco cambió a suero, sin embargo, se presentaron una serie de problemas en el suero similares a los de la tarjeta Guthrie, las cuales llevaron a modificar el procedimiento constantemente hasta quedar con la metodología de extracción empleada en el capítulo de metodología. El proceso de desarrollo del método para la cuantificación de teofilina en suero de ratón se puede observar en el Anexo 7 (Desarrollo de la metodología para cuantificar teofilina en suero de ratón).

Con dicha metodología las muestras procesadas fueron dos ratones de los grupos 3 y 4 a los cuales se les indujo una respuesta alérgica y se les administró la nueva formulación en solución oral de teofilina (Gpo 4) y teofilina IV (Gpo 3). El método presenta linealidad y un $r^2=0.9956$ como puede verse en la Ilustración 21, se calcularon las concentraciones de teofilina extrapoladas en la curva de calibración de las muestras de ratón y se dibujó el perfil de dicha formulación el cual se observan en la Ilustración 22 con una absorción rápida en un tiempo de concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$) de 30 minutos y concentración máxima entre 606.99 y 1032.73 ng/mL, dichos parámetros farmacocinéticos se muestran en la Tabla 45.

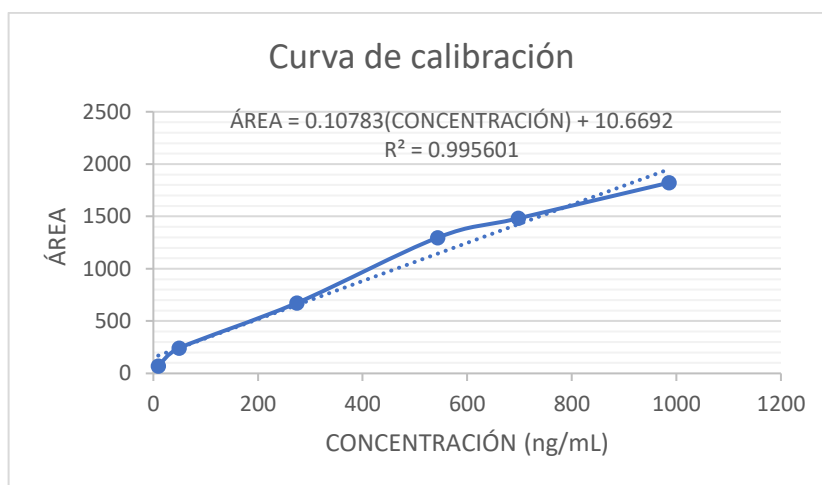


Ilustración 21. Curva de calibración usada para cuantificar las muestras de ratón.

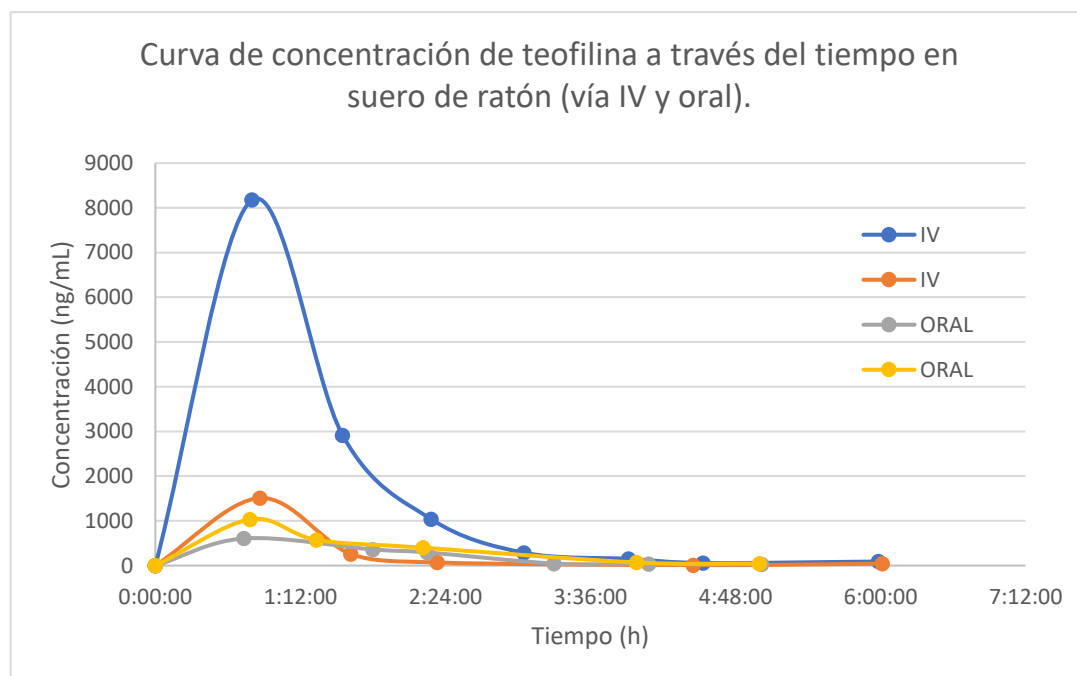


Ilustración 22. Curva concentración de teofilina a través del tiempo en suero de ratón.

Tabla 45. Parámetros farmacocinéticos de ratones Balb/c administrados con solución oral e IV de teofilina.

| RATÓN | T _{máx} (min) | C _{máx} (ng/mL) | AUC _{0-t} | AUC _{0-∞} | V _d | Cl | T _{1/2} (min) | T _{retención en el cuerpo} |
|-------|------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------------|------------------------|-------------------------------------|
| ORAL | 44 | 606.99 | 1122.33 | 6.54 | 0.0127 | 0.0042 | 2.1064 | 1.5159 |
| | 47 | 1032.73 | 1750.74 | 3.33 | 0.0036 | 0.0028 | 0.9139 | 1.5803 |
| | 45.5±2.1 | 819.86±301.04 | 1436.54±444.35 | 4.94±2.27 | 0.008±0.006 | 0.0035±0.001 | 0.9139±1.510 | 1.55±0.05 |
| IV | 52 | 1508.82 | 1559.92 | 3.75 | 0.0044 | 0.0031 | 0.9836 | 1.2062 |
| | 48 | 8176.03 | 9741.63 | 0.95 | 0.0005 | 0.0005 | 0.7180 | 1.2320 |
| | 50±2.8 | 4842.42±4714.43 | 5650.78±5785.34 | 2.35±1.98 | 0.0025±0.003 | 0.0018±0.002 | 0.4921±0.6952 | 1.219±0.018 |

3.4.3 MODELO FARMACODINÁMICO

3.4.3.1 OXIMETRÍA

Las mediciones de oximetría se realizaron a lo largo de la sensibilización, modificándolo a los puntos clave que fueron el inicial y posterior a las administraciones de ovoalbúmina. Posteriormente se hicieron tres mediciones: antes, a las tres horas después y a las 24 horas de la administración del medicamento. El oxímetro veterinario evalúa saturación de oxígeno y pulsaciones por minuto.

3.4.3.1.1 SATURACIÓN DE OXÍGENO

Las mediciones de saturación de oxígeno presentaron una distribución diferente a la normal con respecto a la prueba Kolmogorov Asimov, las cuales se observan en la Tabla 46, algunas variables presentaban distribución normal, sin embargo, la medida de tendencia central que mejor puede representar a estos datos es la mediana, todas las variables se tomaron como libre distribución.

Tabla 46. Estadística descriptiva de la variable saturación de oxígeno (mediana, rango y pruebas de normalidad).

| | GPO. SN | GPO. EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------|
| SPO ₂ (1) | 95.00 (93.00-98.25) | 99.00 (93.75-100.00) | 96.50 (90.25-99.00) | 96.50 (90.25-100.00) | 98.00 (89.50-99.25) | 0.003 |
| SPO ₂ (2) | 98.00 (94.50-99.00) | 97.50 (93.25-99.00) | 98.50 (95.75-99.25) | 95.50 (87.50-98.25) | 97.50 (92.00-98.25) | 0.000 |
| SPO ₂ (3) | 95.50 (86.50-97.25) | 95.00 (87.25-99.00) | 98.00 (96.75-99.00) | 97.00 (94.00-98.50) | 96.50 (91.25-99.25) | 0.024 |
| SPO ₂ (4) | 96.50 (85.75-99.25) | 98.00 (97.75-100.00) | 96.50 (90.75-99.00) | 92.50 (83.75-97.50) | 98.00 (88.50-99.00) | 0.008 |
| SPO ₂ (5) | 96.00 (84.50-99.00) | 96.00 (92.50-99.00) | 96.50 (92.75-98.00) | 96.00 (87.75-98.00) | 97.50 (96.00-98.25) | 0.117 |
| SPO ₂ (6) | 98.00 (96.75-99.00) | 97.50 (95.25-99.25) | 97.00 (95.00-98.25) | 93.50 (87.00-99.00) | 98.00 (94.00-99.25) | 0.000 |
| SPO ₂ (7) | 98.00 (96.25-98.00) | 98.00 (97.00-99.00) | 98.00 (97.00-99.00) | 98.00 (95.00-99.25) | 98.00 (94.75-98.25) | 0.000 |
| SPO ₂ (FC1) | 96.00 (93.00-98.00) | 97.00 (92.00-99.00) | 96.50 (92.00-98.25) | 96.00 (95.00-99.00) | 93.50 (86.25-96.75) | 0.118 |
| SPO ₂ (FC2) | 95.00 (89.00-99.00) | 93.50 (87.00-98.00) | 98.00 (93.75-99.00) | 97.50 (95.50-99.00) | 98.00 (94.25-99.00) | 0.089 |
| SPO ₂ (FC3) | 98.00 (92.00-98.00) | 96.50 (90.25-98.00) | 95.50 (87.75-98.00) | 99.00 (96.75-99.25) | 97.00 (91.75-99.00) | 0.000 |
| SPO ₂ (FD1) | 98.00 (92.00-99.00) | 94.50 (87.25-98.75) | 98.00 (93.25-99.00) | 95.00 (92.00-98.50) | 96.00 (92.00-98.00) | 0.000 |
| SPO ₂ (FD2) | 97.00 (91.00-98.00) | 91.50 (87.00-95.50) | 96.50 (92.00-98.00) | 96.00 (91.50-98.00) | 96.50 (88.00-98.00) | 0.042 |
| SPO ₂ (FD3) | 94.00 (90.00-98.00) | 95.50 (87.25-98.00) | 95.50 (92.50-98.00) | 98.00 (93.00-98.50) | 94.50 (87.00-98.00) | 0.000 |

SPO₂: Saturación de oxígeno; p: prueba estadística de normalidad (Shapiro-Wilk), mediana y rango intercuartilar (25-75).

Se usó una prueba estadística no paramétrica de Friedman para variables con distribución diferente a la normal y comparación de variables relacionadas. El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, como se puede observar en la Tabla 47.

Tabla 47. Resultados estadísticos de la oximetría, saturación de oxígeno, para cada grupo durante la sensibilización.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.549 | 0.633 | 0.512 | 0.412 | 0.999 |
| Chi cuadrado | 4.963 | 4.321 | 5.253 | 6.099 | 0.381 |

Las mediciones de oximetría obtenidas al administrar el medicamento, de igual manera que la anterior no presentó diferencias significativas, excepto para el grupo sano con tratamiento ST ($p=0.033$), como se indica en la Tabla 48.

Tabla 48. Resultados estadísticos de la oximetría, saturación de oxígeno, para cada grupo durante la administración del medicamento.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.839 | 0.520 | 0.272 | 0.442 | 0.033 |
| Chi cuadrado | 0.351 | 1.307 | 2.606 | 1.632 | 6.816 |

Tabla 49. Resultados estadísticos de la prueba de Friedman de la saturación de oxígeno, para el grupo ST durante la administración del medicamento.

| | Rango promedio |
|----------------------|----------------|
| FC saturación inicio | 1.55 |
| FC saturación 3hrs | 2.33 |
| FC saturación final | 2.13 |

La administración consecutiva de teofilina no mostró diferencias significativas en el nivel de oxigenación para ninguno de los grupos, tal como se muestra en la Tabla 50.

Tabla 50. Resultados estadísticos de la oximetría, saturación de oxígeno, para cada grupo durante la administración del medicamento por tres días consecutivos.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.568 | 0.432 | 0.602 | 0.814 | 0.754 |
| Chi cuadrado | 1.130 | 1.680 | 1.014 | 0.413 | 0.565 |

3.4.3.1.2 PULSACIONES POR MINUTO

Esta variable presentó una distribución diferente a la normal, con respecto a la prueba de normalidad, cabe señalar la variable BPM_6 presentó distribución normal, véase en la Tabla 51, sin embargo, debido a que la medida de tendencia central que mejor puede representar a todos estos datos es la mediana, todas las variables se tomarán como libre distribución.

Se usó una prueba estadística no paramétrica de Friedman para variables con distribución diferente a la normal y comparación de variables relacionadas. El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, dichos resultados están representados en la Tabla 52 (durante la sensibilización), en la Tabla 53 y 54 (posterior a la administración de medicamento).

Tabla 51. Medidas de tendencia central de las pulsaciones por minuto en la sensibilización, cinética, administración consecutiva y prueba de normalidad. Estudio completo.

| Variable | GPO. SN | GPO. EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|-----------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| BPM (1) | 62.50 (49.75-75.25) | 55.00 (41.75-66.25) | 53.50 (37.75-65.25) | 56.00 (41.25-61.50) | 48.00 (41.75-53.00) | 0.200 |
| BPM (2) | 62.50 (51.75-67.00) | 60.50 (46.75-80.75) | 58.00 (43.75-85.00) | 55.00 (44.25-56.50) | 52.00 (44.75-64.25) | 0.000 |
| BPM (3) | 50.00 (41.50-61.00) | 56.00 (46.75-65.50) | 52.00 (45.00-99.75) | 57.00 (40.00-76.25) | 43.50 (34.75-48.00) | 0.000 |
| BPM (4) | 54.00 (47.00-69.00) | 52.50 (40.00-68.25) | 52.50 (44.25-62.25) | 51.00 (38.75-70.00) | 47.00 (35.50-80.00) | 0.003 |
| BPM (5) | 56.50 (50.00-65.25) | 56.00 (41.00-76.25) | 47.40 (37.50-75.00) | 51.00 (44.25-67.00) | 55.50 (42.75-61.00) | 0.001 |
| BPM (6) | 53.50 (35.25-67.00) | 51.50 (34.75-67.25) | 61.50 (42.25-79.25) | 62.50 (40.00-81.75) | 57.00 (36.75-92.50) | 0.200 |
| BPM (7) | 51.00 (45.25-73.50) | 63.00 (35.75-111.25) | 61.50 (51.25-73.50) | 49.00 (36.00-75.75) | 52.00 (36.75-76.75) | 0.055 |
| BPM (FC1) | 58.00 (50.00-79.00) | 62.00 (52.50-66.25) | 48.50 (40.00-64.25) | 51.00 (45.75-61.75) | 53.50 (46.25-62.75) | 0.001 |
| BPM (FC2) | 52.00 (39.00-59.00) | 57.00 (48.00-75.25) | 53.50 (44.25-65.00) | 52.50 (38.25-57.50) | 51.00 (42.00-70.00) | 0.000 |
| BPM (FC3) | 54.00 (47.00-69.00) | 57.00 (39.50-62.00) | 58.50 (44.50-71.00) | 58.50 (52.25-67.50) | 53.00 (46.25-73.25) | 0.000 |
| BPM (FD1) | 56.00 (51.00-61.00) | 52.50 (46.50-62.00) | 70.50 (47.75-90.00) | 48.00 (46.00-57.00) | 57.50 (49.25-76.75) | 0.000 |
| BPM (FD2) | 55.00 (49.00-62.00) | 52.00 (39.25-65.00) | 57.50 (47.00-63.50) | 55.00 (44.00-63.00) | 46.00 (43.00-67.50) | 0.000 |
| BPM (FD3) | 62.00 (47.00-70.00) | 54.50 (46.25-67.00) | 52.00 (41.75-72.25) | 48.00 (38.00-59.00) | 57.00 (46.25-70.50) | 0.000 |

*BPM: Pulsaciones por minuto; p: prueba estadística de normalidad (Shapiro-Wilk); mediana y rango intercuartilar (25-75).

Tabla 52. Resultados estadísticos de la oximetría, pulsaciones por minuto para cada grupo durante la sensibilización.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.590 | 0.808 | 0.894 | 0.850 | 0.690 |
| Chi cuadrado | 4.649 | 3.005 | 2.264 | 2.659 | 3.902 |

Tabla 53. Resultados estadísticos de la oximetría, pulsaciones por minuto, para cada grupo durante la administración del medicamento.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.170 | 0.915 | 0.500 | 0.150 | 0.963 |
| Chi cuadrado | 3.547 | 0.117 | 1.385 | 3.800 | 0.076 |

Tabla 54. Resultados estadísticos de la oximetría, pulsaciones por minuto, para cada grupo durante la administración del medicamento por tres días consecutivos.

| GPO | 1 SN | 2EM | 3ER | 4EP | 5ST |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sig. | 0.102 | 0.638 | 0.110 | 0.247 | 0.640 |
| Chi cuadrado | 4.568 | 0.900 | 4.410 | 2.800 | 0.894 |

3.4.3.2 MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA)

Mediante el uso de la metodología estandarizada y sueros los ratones pre y post- inmunización, previo a la administración de tratamiento. Se obtuvieron las medianas de absorbancia para cada uno, grupo SN absorbancia pre=0.3437 nm post=0.3881 nm; grupo EM absorbancia pre=0.2986 nm, post=0.7519 nm; grupo ER absorbancia pre=0.2821 nm, post=0.4516 nm; grupo EP absorbancia pre=0.3285 nm, post=0.5033 nm y grupo ST absorbancia pre=0.2889 nm, post=0.3875 nm, como puede verse en la Ilustración 23.

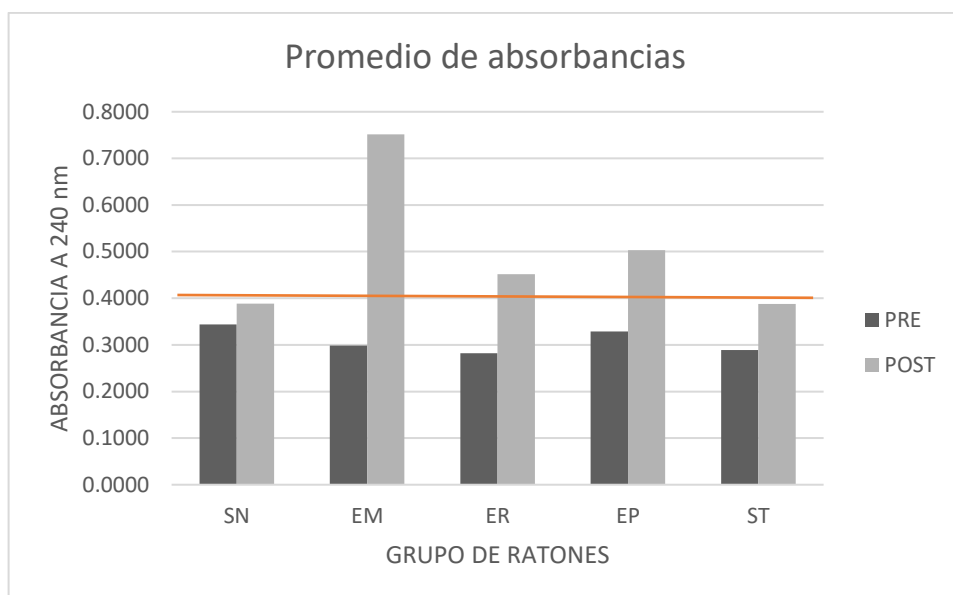


Ilustración 23. Promedio de las absorbancias de cada grupo pre y post- inmunización. ST, SN: grupos sanos, EM, ER y EP: grupos enfermos, la línea representa el corte visual de las respuestas positivas y negativas.

3.4.3.3 ÍNDICE DE HEMATOCRITO

La variable presenta distribución diferente a la normal con una $p=0.014$ de la prueba de normalidad (Kolmogorov-Asimov). En la Tabla 55, se pueden observar las medidas de tendencia central del índice de hematocrito para cada grupo, el valor de $p=0.000$ indica una libre distribución. Por lo que se usó una prueba Kruskal Wallis para la comparación de %IHC.

Tabla 55. Medidas de tendencia central y dispersión del %IHC y pruebas de normalidad.

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| %IHC | 54.79 (52.78-56.24) | 51.72 (50.23-55.84) | 53.63 (52.63-57.30) | 54.49 (52.42-56.55) | 54.10 (51.90-56.54) | 0.000 |

Tabla 56. Resultados del análisis estadístico rangos y p (Kruskal-Wallis).

| grupo | Rangos | | Estadísticos de prueba | |
|-------|--------|----------------|------------------------|-------|
| | N | Rango promedio | | %IMC |
| SN | 16 | 45.88 | Chi-cuadrado | 5.738 |
| EM | 16 | 28.59 | gl | 4 |
| EP | 16 | 44.16 | Sig. asintótica | 0.220 |
| ER | 16 | 43.59 | | |
| ST | 16 | 40.28 | | |
| Total | 80 | | | |

Como se puede observar en la Tabla 56, la prueba estadística arrojó una $p=0.220$, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento.

3.4.3.4 HEMOGLOBINA

La variable presenta distribución diferente a la normal con una $p=0.000$ de la prueba de normalidad (Kolmogorov-Asimov), ver Tabla 57. Por lo que se usó una prueba Kruskal Wallis para la comparación de hemoglobina.

Tabla 57. Medidas de tendencia central y dispersión de Hemoglobina (Hb) y pruebas de normalidad.

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|
| Hb | 89.08 (14.19-217.86) | 101.06 (22.45-231.46) | 89.99 (22.56-197.57) | 85.16 (26.16-164.32) | 88.21 (26.63-181.26) | 0.000 |

Como se puede observar en la Tabla 58, la prueba estadística arrojó una $p=0.985$, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 58. Resultados del análisis estadístico rangos y p (Kruskal-Wallis).

| grupo | Rangos | | Estadísticos de prueba | |
|-------|--------|----------------|------------------------|-------|
| | N | Rango promedio | | %IMC |
| SN | 16 | 37.81 | Chi-cuadrado | 0.374 |
| EM | 16 | 42.41 | gl | 4 |
| EP | 16 | 39.75 | Sig. asintótica | 0.985 |
| ER | 16 | 41.16 | | |
| ST | 16 | 41.38 | | |
| Total | 80 | | | |

3.4.3.5 CORTES HISTOPATOLÓGICOS: HISTOPATOLOGÍA

Las observaciones obtenidas al revisar las laminillas de pulmón de ratón perfundido, a través del microscopio a 40x, dieron los siguientes resultados:

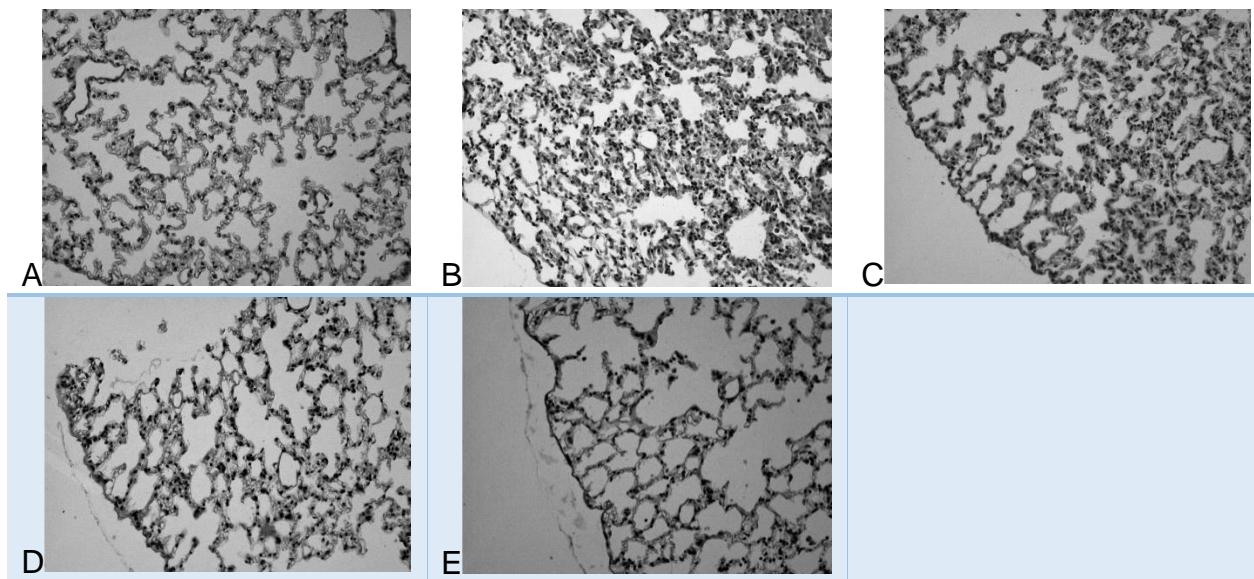


Ilustración 24. Fotografía de los cortes de pulmón teñido con eosina-hematoxilina.

Los cambios histológicos observados en pulmón de ratón, sensibilizados con ovoalbúmina y tratados con teofilina en solución oral e intravenosa, se muestran en la Ilustración 24 y se describen a continuación:

- A) Grupo SN Control Negativo:** Pulmón de un animal control en el cual se observaron los espacios alveolares normales (Hematoxilina-eosina 20x).
- B) Grupo EM Control positivo:** Pulmón de un animal sensibilizado con ovoalbúmina en el cual se observó infiltrado de células inflamatorias y eritrocitos en los espacios alveolares (Hematoxilina-eosina 20x).
- C) Grupo ER Enfermo referencia:** Pulmón de un animal sensibilizado con ovoalbúmina y tratado con teofilina por vía intraperitoneal, en el cual se observa infiltrado de células inflamatorias y eritrocitos, pero en menor grado que en el grupo enfermo no tratado (Hematoxilina-eosina 20x).
- D) Grupo EP Enfermo Prueba:** Pulmón de un animal sensibilizado con ovoalbúmina y tratado con teofilina administrada por vía oral, en el cual observaron los espacios alveolares normales (Hematoxilina-eosina 20x).
- E) Grupo ST Control con tratamiento:** Pulmón de un animal control tratado con solución salina, en el cual se observaron los espacios alveolares normales (Hematoxilina-eosina 20x).

3.4.3.6 GLUCOSA

Como se aprecia en la Tabla 59, las variables presentan distribución diferente a la normal ($p=0.017$). Por lo que se usó una prueba Kruskal-Wallis para la comparación de Glucosa la cual dio un valor de $p=0.005$, mostrando diferencias significativas, véase Tabla 60.

Tabla 59. Estadística descriptiva de la variable glucosa. (media y desviación estándar).

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------|
| Glucosa | 135.00 (133.00-151.00) | 142.00 (125.50-148.00) | 152.00 (136.00-162.50) | 129.00 (121.75-158.75) | 111.00 (95.00-127.50) | 0.017 |

Tabla 60. Resultados del análisis estadístico rangos y p (Kruskal-Wallis).

| Rangos | | | Estadísticos de prueba | |
|--------|----|----------------|------------------------|--------|
| grupo | N | Rango promedio | | %IMC |
| SN | 7 | 27.93 | Chi-cuadrado | 14.982 |
| EM | 10 | 24.20 | gl | 4 |
| EP | 9 | 31.83 | Sig. asintótica | 0.005 |
| ER | 10 | 22.75 | | |
| ST | 9 | 9.28 | | |
| Total | 45 | | | |

RESUMEN DE LAS VARIABLES DEL ESTUDIO COMPLETO.

En esta tabla 61 se muestran las medianas y rangos de cada variable por grupo, de igual modo, se describe el valor de p, un valor menor a 0.05 representa significancia estadística, por lo tanto, hay diferencia entre los grupos y un valor mayor a 0.05 indica que no hay diferencias entre los grupos.

Tabla 61. Resumen de las variables del estudio completo (estadística descriptiva y p de la prueba estadística correspondiente).

| VARIABLE | GPO. SN | GPO EM | GPO. ER | GPO. EP | GPO. ST | p |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------|
| SPO₂ (1) | 95.00 (93.00-98.25) | 99.00 (93.75-100.00) | 96.50 (90.25-99.00) | 96.50 (90.25-100.00) | 98.00 (89.50-99.25) | 0.003 |
| SPO₂ (7) | 98.00 (96.25-98.00) | 98.00 (97.00-99.00) | 98.00 (97.00-99.00) | 98.00 (95.00-99.25) | 98.00 (94.75-98.25) | 0.000 |
| SPO₂ (FC1) | 96.00 (93.00-98.00) | 97.00 (92.00-99.00) | 96.50 (92.00-98.25) | 96.00 (95.00-99.00) | 93.50 (86.25-96.75) | 0.118 |
| SPO₂ (FC3) | 98.00 (92.00-98.00) | 96.50 (90.25-98.00) | 95.50 (87.75-98.00) | 99.00 (96.75-99.25) | 97.00 (91.75-99.00) | 0.000 |
| SPO₂ (FD1) | 98.00 (92.00-99.00) | 94.50 (87.25-98.75) | 98.00 (93.25-99.00) | 95.00 (92.00-98.50) | 96.00 (92.00-98.00) | 0.000 |
| SPO₂ (FD3) | 97.00 (91.00-98.00) | 91.50 (87.00-95.50) | 96.50 (92.00-98.00) | 96.00 (91.50-98.00) | 96.50 (88.00-98.00) | 0.042 |
| HPM (1) | 62.50 (49.75-75.25) | 55.00 (41.75-66.25) | 53.50 (37.75-65.25) | 56.00 (41.25-61.50) | 48.00 (41.75-53.00) | 0.200 |
| HPM (7) | 51.00 (45.25-73.50) | 63.00 (35.75-111.25) | 61.50 (51.25-73.50) | 49.00 (36.00-75.75) | 52.00 (36.75-76.75) | 0.055 |
| HPM (FC1) | 58.00 (50.00-79.00) | 62.00 (52.50-66.25) | 48.50 (40.00-64.25) | 51.00 (45.75-61.75) | 53.50 (46.25-62.75) | 0.001 |
| HPM (FC3) | 54.00 (47.00-69.00) | 57.00 (39.50-62.00) | 58.50 (44.50-71.00) | 58.50 (52.25-67.50) | 53.00 (46.25-73.25) | 0.000 |
| HPM (FD1) | 56.00 (51.00-61.00) | 52.50 (46.50-62.00) | 70.50 (47.75-90.00) | 48.00 (46.00-57.00) | 57.50 (49.25-76.75) | 0.000 |
| HPM (FD3) | 62.00 (47.00-70.00) | 54.50 (46.25-67.00) | 52.00 (41.75-72.25) | 48.00 (38.00-59.00) | 57.00 (46.25-70.50) | 0.000 |
| Hb | 89.08 (14.19-217.86) | 101.06 (22.45-231.46) | 89.99 (22.56-197.57) | 85.16 (26.16-164.32) | 88.21 (26.63-181.26) | 0.000 |
| GLUCOSA | 135.00 (133.00-151.00) | 142.00 (125.50-148.00) | 152.00 (136.00-162.50) | 129.00 (121.75-158.75) | 111.00 (95.00-127.50) | 0.017 |
| %IHC | 54.79 (52.78-56.24) | 51.72 (50.23-55.84) | 53.63 (52.63-57.30) | 54.49 (52.42-56.55) | 54.10 (51.90-56.54) | 0.000 |

CAPÍTULO 4.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

4.1 ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO

La nueva formulación es estable hasta los 73 días bajo condiciones de temperatura expresadas en las pruebas de estabilidad acelerada (40°C), a largo plazo (25°C) y a 4°C.⁽³⁵⁾ Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que las pruebas de estabilidad acelerada (75 ± 5 %) y a largo plazo (60 ± 5 %) requieren condiciones específicas de humedad, cuestiones que no están controladas en el laboratorio. Por ello, es necesario realizar estas pruebas bajo las condiciones de humedad requerida y evaluar si la estabilidad se mantiene bajo estas condiciones.

4.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método analítico usado para las pruebas de estabilidad en la forma farmacéutica, se validó satisfactoriamente y cumple con los criterios de aceptación de acuerdo con la norma oficial mexicana 177.⁽³⁶⁾

4.3 MODELO ANIMAL “ESTUDIO PILOTO”

4.3.1 SENSIBILIZACIÓN DE RATONES BALB/C

4.3.1.1 ANESTESIA DE LOS RATONES BALB/C

El proceso de anestesia tuvo muchos cambios en la dosificación, al administrar la pauta reportada en la literatura⁽³³⁾ se sobre-dosificó al animal y murió. El primer reajuste de la dosis fue a la séptima parte, que, para los fines de administrar una solución vía intranasal, no era la adecuada debido a que los ratones se mantenían completamente anestesiados produciendo ahogamiento, ya que tenían las vías respiratorias suprimidas, el líquido las ocluía y generaba un broncoespasmo.

El último reajuste llegó a una catorceava parte, dejando a los animales sedados, se disminuyó la muerte por ahogamiento con el líquido. Sin embargo, el hecho de usar anestesia era debido a que se administraba la solución de ovoalbúmina usando una jeringa de 1 mL con aguja, si el ratón estaba despierto éste podría sufrir daño al ser picado o cortado con el bisel. El 20% de la muerte de los ratones se le atribuye a las causas antes mencionadas (Ilustración 15), el 2% se debió a la administración IP de OVA y el 16% muerte natural por edad de los animales (tiempo muy largo del estudio, por atraso debido a causas de desastre natural).

Para el estudio completo se decidió usar una cánula con punta redondeada para evitar así, que esta dañara las fosas nasales de los ratones y evitar la anestesia. El procedimiento era obtener una gota de líquido en la punta de la cánula redondeada, acercar a la nariz del ratón y dejar que el animal inhale de manera mecánica la gota, haciendo esta actividad lentamente, lo cual se logró satisfactoriamente, evitando la muerte por anestesia o ahogamiento, siendo la primera enmienda al protocolo.

En estudios de sensibilización de ratones Balb/c la administración sistémica se hace de igual manera que en este estudio, pero la fase de activación de la respuesta en vías aéreas se hace exponiendo a los animales a la OVA mediante nebulización, situación que no se pudo llevar a

cabo con el material existente en el laboratorio, asimismo, no se sensibilizó usando coadyuvante⁽²⁸⁾.

4.3.2 CURVA DE CRECIMIENTO

Para los animales de este piloto se extendió el tiempo de sensibilización por situaciones de causa de fuerza mayor que impidió trabajar con ellos. El aumento del peso de cada ratón es debido al crecimiento por edad, observándose un crecimiento normal de los ratones durante el estudio piloto.

Se planteaba que el observar una pérdida de peso, podría ser debida a patologías adquiridas en el bioterio, situación no esperada debido a que el lugar cuenta con cuartos aislados para cada procedimiento.

Otra hipótesis que se planteaba inicialmente con respecto al peso era que los animales podrían dejar de comer y disminuir su peso al desarrollar asma alérgica, sin embargo, esto no se vio, debido a que no se presentaron cuadros clínicos constantemente, sino hasta el contacto con un inmunógeno, los cuadros aumentan en una enfermedad crónica en donde ya existe una modificación tisular en los bronquios, sin embargo, es poco probable la pérdida de apetito.

De igual modo, se realizó una prueba estadística con la finalidad de demostrar que el peso no variaba entre grupos, obteniendo que, no hay diferencia entre ellos con una $p=0.671$, por lo que la comparación entre grupos es posible (son similares los grupos en cuanto al peso, a pesar de la libre demanda de alimento y agua).

4.3.3 MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN

4.3.3.1 TOMA Y RECOLECCIÓN DE MUESTRA

La toma de muestra se intentó inicialmente mediante la punción de la vena safena, situación que era complicada debido a que posterior a tres tomas para obtener el muestreo de la cinética, se formaba un hematoma alrededor de la punción de la vena y la sangre dejaba de fluir, generando en la pata del ratón un daño⁽³⁷⁾, por lo que se recurrió al corte de la cola (descrito en el capítulo de metodología) cortando no más de 5 mm de la punta de la cola del ratón de la que se obtenían hasta aproximadamente 100 μL de sangre. El único inconveniente era que si el personal no estaba capacitado y no calentaba un poco la cola del animal y presionaba con la uña y no con las yemas de los dedos, se generaba irritación en la cola, hematoma y la sangre dejaba de fluir. Se evitó el problema capacitando al equipo de trabajo previamente a la evolución del experimento.

En cuanto a la recolección de la toma de muestra, se había previsto usar tarjetas de tamizaje neonatal o tarjetas Guthrie, en donde la toma de muestra era sencilla, rápida y no era necesario llenar el círculo equivalente a 40 μL de sangre (Ilustración 10): El problema surgió en el análisis de las muestras, debido a que la adsorción de la muestra era muy alta, tomando en cuenta que es una matriz de celulosa y proteínas como la albúmina quedan adheridas en ésta, aunado a que teofilina tiene una unión de entre 40-60% a proteínas principalmente a albúmina, complicaba la extracción de teofilina y los resultados en el HPLC mostraba absorbancias pequeñas

(concentraciones bajas del fármaco), por la retención del principio activo y una gran cantidad de interferencias, datos obtenidos del análisis del proceso de validación, por ello, las muestras obtenidas en esas tarjetas no se extrajeron. Situación que generó un cambio en la recolección de la muestra (otra enmienda al protocolo).

Se hicieron pruebas del método de extracción en sangre total y suero. Se observó que la matriz más adecuada para la medición era suero, cambiando la forma de recolección de la muestra en tubos plástico de 0.6 mL con tapa, los cuales se centrifugaban para obtener suero y colocando éste en tubos de plástico de 0.2 mL con tapa, se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

4.3.4 CINÉTICA DEL ESTUDIO

Como se mencionó anteriormente, la extracción de teofilina en las tarjetas Guthrie presentó una gran cantidad de interferencias y un bajo rendimiento (menor al 30% de recobro), por lo que no es posible cuantificar al fármaco, aunado a que las repeticiones de está extracción no salieron similares, las respuestas varían cerca del doble, a pesar de que el blanco de la muestra se parezca a una de ellas como se pudo observar en la Ilustración 18 y la Tabla 26.

Se probó la extracción usando suero, observándose una señal en 3.1 min característica de teofilina y una de 2.2 min debida a la matriz biológica, en la cual las interferencias son menores a la respuesta del fármaco de 0.12 AU (Ilustración 18, D), con ello, la matriz biológica a usar fue suero para el estudio completo.

4.3.5 MODELO FARMACODINÁMICO

4.3.5.1 OXIMETRÍA

4.3.5.1.1 SATURACIÓN DE OXÍGENO

El análisis estadístico para la saturación de oxígeno no fue significativo, es decir, no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo. Por tanto, la saturación de oxígeno se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas a lo largo de la sensibilización, excepto en el grupo ER (sensibilizado), en donde se observó una diferencia significativa, posiblemente debida a que en la medición SPO2MV7 de este grupo presenta una media muy baja. Es posible que no se hayan observado cambios en los grupos EM y EP (sensibilizados), debido a que el asma alérgica no presenta episodios clínicos de manera constante, en este caso sería con la exposición del alérgeno (OVA) y la medición no siempre se hacía posterior a la administración de OVA, el grupo ER presentó una medición muy por debajo de la mediana (medición 7, corroborado por el rango de la prueba de Friedman que es de 3.33, ver Tabla 30), causado por una exacerbación en algunos de los ratones de ese grupo. Para los grupos SN y ST, es coherente la no significancia debido a que solo se les administraba solución salina isotónica con la finalidad de emular el proceso experimental, pero son animales sanos (ver Tabla 29).

A pesar de no presentar una diferencia significativa se puede observar una pequeña disminución en los valores de mediana de cada grupo al inicio y al final de la sensibilización (SPO2 1-11), menor a 95.50%, para todos los grupos valores que suben de igual manera para todos antes de la toma del medicamento.

La medición de oximetría al administrar el medicamento no presentó diferencias significativas en ningún caso, asociada a las razones anteriores, se esperaba que la administración del medicamento generará un aumento en la oxigenación debido a la broncodilatación en las vías respiratorias, situación no observada en este grupo de ratones.

4.3.5.1.2 PULSACIONES POR MINUTO

El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, es decir, las pulsaciones por minuto se mantuvieron sin diferencias estadísticamente significativas, excepto el grupo ST, en donde se observó una diferencia significativa, posiblemente debida a que los animales se estresaron más en esa medición por ser el último grupo al que se midió. Para la medición al administrar el medicamento de igual manera no presentaron diferencias significativas solamente en el grupo ST. Por lo que, es importante que el manejo de los animales sea por grupo elegido al azar y no por orden, así mismo, manejar a los animales en un cuarto diferente al de espera de los demás grupos.

4.3.5.2 MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA)

Debido a que las mediciones de oxigenación no fueron un parámetro que diera certeza de que la sensibilización haya sido efectiva, es decir, no había parámetros claros para asegurar que se había inducido asma alérgica en los ratones, fue necesario tener un parámetro que diera certeza de que el modelo sí estaba respondiendo a la sensibilización, por ello se evaluó el aumento de IgE de manera cualitativa, debido a que es uno de los principales mediadores de la respuesta en asma alérgica.

Para ello, se tuvo que estandarizar la metodología, probando inicialmente la viabilidad y el cruce de los anticuerpos anti-IgE humano e IgE de ratón, para poder fijar las diluciones de éstos y el bloqueo. El proceso final como se puede ver en el capítulo de metodología no está bloqueado, debido a que, se hace con albúmina de bovino o caseína, se probaron ambos, sin embargo, se comprobó que existía una reacción inespecífica de la IgE producida en el ratón, reconociendo tanto a la ovoalbúmina y a la albúmina de bovino o la caseína. Cabe señalar que la reacción específica de inmunización es en contra del antígeno administrado al animal, que en este caso es la OVA, por ello, reconocerá fácilmente a la albúmina y alguna proteína que se le parezca. Finalmente, se decidió evaluar los sueros pre y post sensibilización para observar un aumento cualitativo de la IgE.

4.3.5.3 ÍNDICE DE HEMATOCRITO

Para la medición del índice de hematocrito se realizó una comparación mediante una prueba estadística para variables no paramétricas, obteniendo una $p=0.016$, por lo que hay diferencias estadísticamente significativas en al menos uno de los grupos de tratamiento.

Se planteaba que existiría una diferencia en el índice de hematocrito suponiendo que para los grupos sensibilizados se presentaría una hipoxia tal que aumentara la producción de eritropoyetina y de glóbulos rojos, incrementando el porcentaje de hematocrito.

Teóricamente, el grupo enfermo sin tratamiento (EM) presentaría valores de hematocrito mayores a los de los cuatro grupos restantes, para los grupos enfermos con tratamiento (ER y EP) se

esperaba que estuvieran en valores iguales a los grupos sanos (SN y ST) o simplemente más bajos que el EM.

La prueba estadística solamente nos dice que al menos un grupo es diferente, pero no dice cual. Se probó un análisis estadístico comparando solo dos grupos a la vez (U-Mann Whitney), el grupo EP presentó diferencia con respecto a los otros grupos, es decir, el grupo EP tiene un valor de hematocrito significativamente menor que los demás grupos. Posiblemente a que el medicamento generó una broncodilatación y disminuyó el Índice de hematocrito, aunado a una posible anemia, debido a que previamente se llevó la etapa de muestreo farmacocinético. Es necesario mencionar que este tipo de pruebas separadas aumenta el error esperado de la prueba.

Se puede evaluar que, sí se presenta la tendencia esperada comparando las medianas, teniendo un valor bajo de hematocrito para los grupos SN y ST (43% y 49%), un porcentaje mayor para el grupo EM (55%) y un porcentaje similar a los controles negativos de 48% para el grupo ER. El grupo EP, fue el único que dio un valor muy pequeño (26%), quizá por anemia, a pesar de que todos los grupos se dejaron descansar una semana posterior a la cinética.

4.3.5.4 HEMOGLOBINA

Este parámetro al igual que el índice hematocrito, aumenta si existe una falta de oxigenación, debido a la producción de eritrocitos para captar las moléculas de oxígeno más eficientemente, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, ni se muestra tendencia en las medias. Puede ser debido a que los animales no estaban en una crisis asmática al tomar de muestra.

4.3.5.5 CORTES HISTOPATOLÓGICOS

No se encontraron diferencias concluyentes al usar este método, debido a que se puede observar presencia de eritrocitos, lo que habla de que quizá el tejido no estaba tan limpio y bien fijado, por ello, se decidió usar 2 ratones de cada grupo y realizar el proceso de perfusión para obtener un pulmón en mejores condiciones y que se logren ver sin interferencias de eritrocitos.

4.3.5.6 GLUCOSA

La medición de este parámetro está destinado al monitoreo de posibles reacciones adversas, en la literatura se menciona que el incremento de glucosa es una de ellas. En este caso no existieron diferencias estadísticamente significativas, es decir, los niveles de glucosa se mantuvieron iguales en cada grupo, el grupo sano y el que recibió teofilina no presentaron cambios, por tanto, la glucosa no se vio afectada por la administración.

4.3.5.7 CAMBIOS HECHOS AL PILOTO: ENMIENDAS AL ESTUDIO

El hecho de no usar anestesia facilitó la administración, debido a que el goteo a pesar de ser lento se reducía la posibilidad de ahogamiento de los animales por broncoespasmo o ahogamiento. Asimismo, el uso de una cánula redondeada evitaba lastimar las fosas nasales del ratón al administrar la solución intranasal de ovoalbúmina.

Se planteó un parámetro (medición de IgE) que junto con una tinción de pulmón de una correlación con la finalidad de observar si el modelo de inducción de asma alérgica estaba desarrollado.

Tomando en cuenta que la oximetría no presenta datos de disminución de la saturación de oxígeno en la sangre al seguir la sensibilización a través del tiempo, muestreando antes de la sensibilización y al final de ésta por toma retra-ocular, para determinar de manera cualitativa en aumento de la inmunoglobulina E.

También, se pretendía mejorar la tinción de pulmones, perfundiendo a dos animales por grupo para limpiar de manera más eficiente el órgano y observar los infiltrados celulares en el lumen del pulmón sin contaminación de eritrocitos que se quedaron por una mala limpieza en la muestra.

La cinética también tuvo modificaciones, debido a que la recolección de la muestra en tarjetas Guthrie daba sangre seca, al extraer se presentaban una gran cantidad de interferencias, la extracción en suero mejoró la respuesta cromatográfica, cambiando la recolección de sangre a tubos de 0.6 mL centrifugando para separar el suero.

4.4 MODELO ANIMAL: ESTUDIO COMPLETO

4.4.1 CURVA DE CRECIMIENTO

El monitoreo de peso de los animales de estudio se realizó de igual manera que el piloto, debido a que están a libre demanda de alimentos y agua, sin embargo, se pretendía evaluar que no hubiese animales con mayor peso y por tanto una distribución diferente del medicamento en el cuerpo (Ilustración 20).

La edad de los animales antes de la administración del tratamiento fue de 21 semanas, menor a las 37 semanas del grupo piloto, debido a que el proceso no se detuvo y se siguió cronológicamente sin ningún percance. El peso de éstos se analizó para probar que no hay variación entre ellos, mediante un análisis estadístico de ANOVA de una vía con una $p=0.984$, $F=0.095$ con 4 grados de libertad. Demostrando que no hay diferencia entre los pesos de los ratones por grupo y su comparación es posible.

4.4.2 MODELO FARMACOCINÉTICO: CONCENTRACIÓN DE TEOFILINA EN SANGRE DE RATÓN

Los problemas presentados en la matriz biológica elegida (suero) llevaron a modificar varias veces la metodología de extracción cambiando el tipo de detector (UPLC-MS).

Las metodologías en HPLC-UV a pesar de presentar tendencia a la linealidad al empezar el proceso de validación y a pesar de los cambios, la limpieza de la muestra, el límite de cuantificación y la selectividad no entraban en los criterios de aceptación para el método. Las respuestas del analito presentan una gran cantidad de respuestas provenientes al suero, así mismo y posterior a la inyección de cuatro muestras de suero de ratón procesadas se presentaba un acarreo, lo cual impedía que los picos subsecuentes se definieran y que el blanco presentara una respuesta, de esta manera el método demostraba aun no estar en condiciones óptimas.

Se cambió de metodología y de tipo de detector usando UPLC-UV y UPLC-MS realizando un screening con diferentes metodologías, sin embargo, las técnicas con la curva de calibración no eran lineales, presentando una meseta, es decir, solo se extraía la respuesta del blanco. El cambio

de precipitante, agente de extracción tiempos de centrifugado y de agitación no parecían mejorar la cuantificación. Se realizaron metodologías extractivas usando variaciones de pH y procesos enzimáticos, pero no dieron el resultado esperado, se seguía obteniendo una meseta, además de que la metodología era cada vez más larga y complicada.

Se planteó que la alimentación humana tiene una gran cantidad de xantinas, las cuales se presentaban como una cantidad basal en plasma o suero humano. Con ello, se enmascaraban las concentraciones de la curva de ratón, aparentemente por ello, se veía una meseta en la cuantificación. Se utilizó suero de rata, con lo cual la metodología se mostraba lineal usando la metodología expuesta en el capítulo de metodología y en el Anexo 7. El procedimiento no se extrajo por cuestiones de variación, las concentraciones son demasiado pequeñas y el proceso de validación es complicado.

Finalmente, por situaciones de tiempo, se procesaron algunas muestras de los grupos enfermos tanto para tratamiento IV y oral, con la finalidad de observar el perfil para cada forma farmacéutica. El método presenta linealidad y un $r^2=0.9956$, las concentraciones de teofilina extrapoladas en la curva de calibración de las muestras de ratón presentan el perfil esperado para ambas soluciones oral e intravenosa. La absorción fue rápida con un tiempo de concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$) de 44-47 min para la solución oral mientras que la intravenosa se observa una $T_{m\acute{a}x}$ de 48-52 minutos, la concentración máxima entre 606.99-1032.73 ng/mL y 1508.82-8176.03 ng/mL para vía oral e intravenosa respectivamente, se puede observar que existe una gran variación intra grupo para ambas formulaciones, situación ocurrida en humanos^(38,39), asimismo, los parámetros farmacocinéticos obtenidos se muestran en la Tabla 45, sin embargo, también entre ellos varían, es necesario realizar la cuantificación de todos los ratones de cada grupo, con la finalidad de evaluar de mejor manera la cinética de los ratones balb/c y poder establecer la variación. Las otras muestras están en proceso de cuantificación debido a cuestiones técnicas no se pudieron obtener dichos resultados.

4.4.3 MODELO FARMACODINÁMICO

4.4.3.1 OXIMETRÍA

4.4.3.1.1 SATURACIÓN DE OXÍGENO

Se monitoreó la oxigenación de los ratones, el análisis se llevó a cabo usando una prueba estadística no paramétrica de Friedman. El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, es decir, la saturación de oxígeno se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas a lo largo de la sensibilización y tampoco se vio una tendencia de disminución en las medias de la medición inicial y final. Esto es debido a que el asma alérgica no presenta episodios clínicos de manera constante, en este caso sería con la exposición del alérgeno (OVA) y aún en estos casos no siempre se ve un efecto hipóxico debido a la sensibilidad individual y la autolimitación de las vías respiratorias.

Mientras que la medición al administrar el medicamento no presentó diferencias significativas, solo para el grupo ST si hubo diferencia (lo cual no debería pasar) la no significancia está asociada a las razones anteriores. Se esperaba que la administración del medicamento generará un aumento en la oxigenación debido a la broncodilatación en las vías respiratorias, situación no observada en este grupo de ratones. Es posible que los valores extremos de las mediciones de ratones hayan generado esta disminución en las medias y rangos promedio (80 y 83), se quitaron estos datos del análisis y se obtuvo una $p=0.068$ con tendencia a la significancia, clínicamente la diferencia

tendría que ser de una hipoxia que mejorara con el medicamento, pero es un grupo control que recibe medicamento, por lo cual la administración de teofilina no haría que mejorarán sus niveles de oxigenación.

Además, la administración consecutiva de teofilina no mostró diferencias significativas en el nivel de oxigenación para ninguno de los grupos.

4.4.3.1.2 PULSACIONES POR MINUTO

La prueba estadística demostró que no había diferencias significativas con respecto a las mediciones a lo largo del tiempo para cada grupo, es decir, las pulsaciones por minuto se mantuvieron sin diferencias estadísticamente significativas. La medición al administrar el medicamento para la cinética y los tres días consecutivos, de igual manera no presentaron diferencias significativas en ningún caso. De manera indirecta, se puede decir que no existen variaciones importantes en las pulsaciones por minuto para los ratones, es decir, no existe un evento cardíaco, taquicardia o bradicardia en los ratones, descartando la aparición de estas reacciones adversas (ver reacciones adversas en marco teórico).

4.4.3.2 MEDICIÓN DE IgE (MÉTODO ELISA)

Los valores de IgE para los grupos sanos: ST (grupo sano con tratamiento) y SN (grupo sano sin tratamiento), deberían mantenerse en la misma proporción antes y después de la inmunización. Para los grupos enfermos: EM (grupo enfermo sin tratamiento), ER (grupo enfermo con tratamiento de referencia), y EP (grupo enfermo con tratamiento de prueba), la proporción de IgE debería aumentar con respecto a la previa.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el grupo SN y ST no tienen una diferencia visiblemente diferente como los grupos EM, EP, y ER. Estadísticamente hablando se observó, mediante una prueba Wilcoxon de signos y rangos para variables con distribución diferente a la normal, que los grupos EM, ER y EP presentan diferencias significativas $p=0.028$, $Z=-2.201$; $p=0.028$, $Z=-2.201$; $p=0.028$, $Z=-2.201$, respectivamente, por lo que se puede decir, si hubo diferencia entre el periodo pre y post la sensibilización (si hay una respuesta alérgica), en cuanto al grupo SN no presenta diferencias significativas $p=0.225$, $Z=-1.214$, por tanto no hay diferencias en el antes y después de la sensibilización (no hay respuesta alérgica), en el caso del grupo ST presenta una $p=0.043$, $Z=-2.023$, estadísticamente significativa o bien con tendencia a la no significancia, por lo que quizá hubo una sensibilización. Es necesario tomar en cuenta que este proceso estadístico sería más confiable si se obtuvieran las concentraciones de IgE.

Cabe mencionar que la evaluación se llevó a cabo mediante un anticuerpo humano en suero de ratón, existiendo la posibilidad de las variaciones por pegado inespecífico de éstos. Sin embargo, de manera general se observa la tendencia esperada en cuanto a la inmunización de los ratones Balb/c.

4.4.3.3 ÍNDICE DE HEMATOCRITO

La prueba estadística arrojó una $p=0.220$, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, el índice de hematocrito es similar para todos los grupos. Se planteaba que existiría una diferencia en el índice de hematocrito suponiendo que el grupo enfermo sin tratamiento (EM) presentaría valores de hematocrito mayores a los cuatro

restantes, para el grupo enfermo con tratamiento se esperaba que estuviera en valores iguales a los grupos sanos (SN y ST) o simplemente más bajos que el EM. Y en este caso las diferencias de medianas tampoco muestran la tendencia esperada. Por lo que, se supone que no existe una hipoxia tal que disminuya el Índice de hematocrito, debido a que las crisis alérgicas no están presentes en todo momento, solo con la exposición del alérgeno.

4.4.3.4 HEMOGLOBINA

Este parámetro al igual que el índice hematocrito, aumenta si existe una falta de oxigenación debido a la producción de eritrocitos para captar las moléculas de oxígeno más eficientemente, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, ni se muestran tendencia en las medias. Puede ser debido a que los animales no estaban en una crisis asmática en la toma de muestra.

4.4.3.5 CORTES HISTOPATOLÓGICOS: HISTOPATOLOGÍA

Los cortes de pulmón mostraron la tendencia esperada, el grupo control negativo 1 y 5 presentan una respuesta normal sin infiltraciones celulares, en los grupos enfermos 2, 3 y 4 sí se presenta infiltraciones celulares, el control positivo 2 tiene una mayor concentración de infiltración que los grupos enfermos y tratados con teofilina 3 y 4. El tratamiento intravenoso presenta una mayor proporción de infiltrado que aquellos con tratamiento en solución oral, posiblemente porque la teofilina intravenosa no se infundió correctamente en la vena del ratón.

4.4.3.6 GLUCOSA

La medición de este parámetro está destinado al monitoreo de posibles reacciones adversas, en la literatura se menciona que el incremento de glucosa es una de ellas. En este caso existió diferencias estadísticamente significativas en al menos un grupo, que en este caso de manera visual el grupo que presenta una modificación es el ST, grupo sano con tratamiento, por tanto, la glucosa se vio afectada por la administración de teofilina solo en el grupo sano. Sin embargo, la mediana de este grupo es menor a los demás, suponiendo que el tratamiento hizo que los niveles de glucosa bajaran en lugar de subir como se describe en la literatura. Cabe señalar que los animales previamente estuvieron expuestos a una cinética en la cual se les extrajo sangre continuamente, pudiendo generar anemia en este grupo.

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

5.1 ESTUDIO PILOTO

Con respecto a la saturación de oxígeno no se puede concluir que exista una disminución en la saturación de oxígeno estadísticamente hablando, pero si se observa una pequeña tendencia de disminución en las mediciones iniciales y finales de la sensibilización con ovoalbúmina poniendo un eje en donde valores mayores a 95.50% de saturación pertenecen a los valores iniciales y valores mayores a 95.50% pertenecen a los valores finales de la sensibilización, es decir, el porcentaje de los eritrocitos que están completamente saturados de oxígeno disminuyó, aunque no de manera significativa, se observa una disminución por debajo a los 95.50%, que puede hablar de una desaturación de oxígeno.

Los valores de saturación de oxígeno después de la administración del tratamiento no tienen tendencia de subir o bajar las respuestas, se mantienen similares, por lo que no es posible concluir que exista una broncodilatación por el medicamento.

Para las pulsaciones por minuto no presentaron diferencias significativas para ningún grupo, excepto para el grupo ST, es decir, no hubo cambios en las pulsaciones por minuto (latidos del corazón), en el grupo ST que es sano se presentó una diferencia significativa que puede deberse al estrés causado por la manipulación de los animales siendo el último grupo administrado. En conclusión el estrés causado en la administración es mínimo y no existe la posibilidad de haya una alteración respiratoria por la alteración del animal que cause un sesgo en la medición de oxigenación.

Con respecto a la medición de IgE, las placas de ELISA directa comprobaron la viabilidad del anticuerpo anti-IgE y que este cruzaba con los sueros de ratón, pero esta metodología generaba reacción inespecífica. La ELISA de captura dio las diluciones de trabajo de los sueros 1:50, anti-IgE con peroxidasa 1:500, concentraciones del control positivo de 2 µg/mL y OVA de 1 µg/mL, sin bloqueo.

El índice de hematocrito muestra una respuesta significativamente menor para el grupo prueba con respecto al grupo tratado IV y los dos sanos, de manera no significativa, también se pudo observar un valor más alto de hematocrito para el grupo enfermo sin tratamiento. Lo cual podría decir que el medicamento oral si fue efectivo causando una broncodilatación lo que ocasionó una menor producción de eritrocitos, lo que en una crisis bronco-constrictora sucede lo contrario, se necesita mayor número de eritrocitos para captar el oxígeno y llevarlo a circulación.

Los niveles de hemoglobina no muestran una diferencia significativa, debido quizá a que los animales no estaban en una crisis asmática.

Los niveles de glucosa se mantuvieron iguales por cada grupo, el grupo sano y el que recibió teofilina no presentaron cambios, por tanto, la glucosa no se vio afectada por la administración.

La técnica de obtención de la muestra de pulmón no era la adecuada, encontrando solo en el grupo 2 células de infiltración pulmonar, por ello, se recurrió a la perfusión del animal.

Finalmente, muchas de las variables no mostraron significancia, pero si una tendencia a los resultados esperados, no es claro que el modelo haya funcionado, debido a que en esta etapa se estandarizaron los procedimientos y el tamaño de la muestra disminuyó: grupo 1 (2 de 10); grupo 2 (6 de 10); grupo 3 (5 de 10); grupo 4 (4 de 10) y grupo 5 (2 de 10). Y en algunos casos no hay poder estadístico, Sin embargo, era pertinente hacer el análisis para evaluar las modificaciones y las posibles tendencias.

5.2 ESTUDIO COMPLETO

La oximetría es un parámetro confiable para los eventos hipóxicos, sin embargo, es necesario tener un grado más avanzado de la enfermedad, como asma crónica en donde existe una remodelación tisular y el evento hipóxico sea persistente, a diferencia de un caso agudo que usualmente el evento se presenta en contacto con el alérgeno. Asimismo, se comprueba que no hay diferencias significativas para ningún grupo, evitando un sesgo en la medición de oxigenación por alteración de los animales.

Los niveles de hematocrito y hemoglobina no presentan diferencias causadas por la falta de oxigenación, situación similar que, con la saturación de oxígeno, no existe un evento broncoconstrictor permanente que dé una disminución crucial de la oxigenación.

Los niveles de glucosa no presentaron una modificación significativa, solo en el grupo que recibió tratamiento y es sano, sin embargo, la literatura marca un aumento de los niveles y en este caso se observa una disminución.

Los niveles de IgE mostraron un incremento en la proporción para los grupos enfermos: EM, ER y EP, con respecto a los valores previos a la inmunización, por ello, hubo una respuesta alérgica mediada por IgE, obteniendo un modelo de asma alérgico. Para el caso de los grupos control, el grupo SN se mantuvo sin diferencias en el aumento de la respuesta, no hubo una respuesta alérgica, el grupo ST mostró un aumento que pudiese ser significativo, lo que demostraría que sí hubo una respuesta alérgica, debida quizá a una contaminación experimental. Finalmente, cabe señalar que el anti-IgE era de humano y los sueros de ratón, a pesar de mostrar cruce, este anticuerpo pudo no ser el idóneo, sin embargo, si se observó la tendencia esperada.

La histopatología mostró la tendencia esperada, los cortes de pulmón para el grupo control negativo 1 y 5 dieron respuesta normal en la luz pulmonar, en los grupos enfermos 2, 3 y 4 se presentaron infiltraciones de células en la luz pulmonar. El control positivo 2 tiene una mayor cantidad de infiltración que aquellos grupos enfermos y tratados con teofilina 3 y 4.

El comportamiento tanto bioquímico como histopatológico presentaron la misma tendencia, por lo que, se puede decir que el modelo murino si desarrolló una respuesta de asma alérgica. También, se vio una protección, o bien, una disminución de los daños pulmonares a los grupos que recibieron el tratamiento de teofilina intravenosa u oral. De manera indirecta la nueva formulación cumple el objetivo terapéutico y el fármaco esta biodisponible para ejercer su efecto.

En cuanto a la farmacocinética, se tuvieron dificultades técnicas por lo que aún no es posible comparar todos los perfiles farmacocinéticos de ambas formulaciones y obtener la biodisponibilidad absoluta, situación en la que aún se sigue trabajando. Sin embargo, las muestras analizadas para la solución oral demostraron el perfil esperado. La nueva formulación es biodisponible y se absorbe rápidamente, alcanzando una $C_{máx}$ a los 30 min.

Los resultados demuestran una absorción rápida del fármaco, con una alta variabilidad en los parámetros farmacocinéticos, situación similar a lo ocurrido en humanos. Es necesario terminar de analizar ambos perfiles (oral e intravenoso) y poder obtener un valor de biodisponibilidad absoluta, por ello, no se puede concluir certeramente nada, debido a que solo tenemos analizados dos ratones por grupo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Riet-Nales DA, Kozarewicz P, Aylward B, de Vries R, Egberts TCG, Rademaker CMA, et al. Paediatric Drug Development and Formulation Design—a European Perspective. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2017;18(2):241–9. Available from: <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0558-3>
2. Pedi ELR. Necesidad de la investigación pediátrica con medicamentos . Perspectiva de una agencia reguladora. 2007;29–40. Available from: https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/contenidos.institutoroche.es/pdf/2012/libro_pediatria/pct_seccionI_capt2.pdf
3. Yaffe SJ AV. Neonatal and Pediatric Pharmacology: Therapeutic Principles in Practice. 4ta ed. Kluwer W, editor. Wolters Kluwer. Buenos Aires; 2010.
4. 44003 @ apps.who.int [Internet]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44003>
5. Fernández-Llamazares C. Seguridad en el uso de medicamentos en pediatría. *Arch Argent Pediatr* [Internet]. 2012;109(06):510–8. Available from: <https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2011/v109n6a09.pdf>
6. Cervantes Arellano MJ, Hernández García E. Desarrollo de una solución oral pediátrica para el tratamiento de enfermedades respiratorias. [Internet]. 2015. Available from: <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=catt02029a&AN=tes.TESO1000739059&lang=es&site=eds-live>
7. Search @ Www.Uptodate.Com [Internet]. Available from: [http://www.uptodate.com/contents/search?search=causes+of+ascites+according+to+serum+ascites+albumin+gradient+\(SAAG\)&x=16&y=9](http://www.uptodate.com/contents/search?search=causes+of+ascites+according+to+serum+ascites+albumin+gradient+(SAAG)&x=16&y=9)
8. Instituto Mexicano del Seguro Social. Manejo Del Recien Nacido Prematuro Sano En La Sala De Prematuros. Guía Práctica Clínica GPC [Internet]. 2010;1–63. Available from: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/362GER.pdf>
9. Del P. Diagnóstico y Tratamiento de Evidencias y Recomendaciones. Available from: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-724-14-Apneadelprematuro/724GER.pdf>
10. a681006-es @ medlineplus.gov [Internet]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a681006-es.html#why>
11. Henderson-Smart DJ, Steer PA. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2010 Jan 20 [cited 2019 Mar 23];(1). Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD000273.pub2>
12. Napal V. Gestión en Farmacia Hospitalaria. Sani-Red [Internet]. 2006;39–57. Available from: <http://www.ub.edu/legmh/capitols/giraldez.pdf>
13. habitantes @ cuentame.inegi.org.mx [Internet]. Available from: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/habitantes.aspx?tema=P>
14. Secretaria de Salud. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad por causas sujetas a vigilancia epidemiológica en México, 2014. 2017; Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/267617/Mortalidad_2014.pdf
15. Panamericana, editor. Neumología_Pediatrica_Pediatric_Neumolog @ books.google.com.mx [Internet]. 5°. Bogotá: 2006; Available from: https://books.google.com.mx/books/about/Neumologia_Pediatrica_Pediatric_Neumolog.html?id=sq9LZilrUsAC&redir_esc=y
16. principios-activos-teofilina-r03da04 @ www.vademecum.es [Internet]. Available from: <https://www.vademecum.es/principios-activos-teofilina-r03da04>
17. Valverde Molina E. Farmacia Pedrátrica Hospitalaria [Internet]. 2011. 673 p. Available from: http://gruposdetrabajo.sefh.es/gefp/images/stories/documentos/LIBRO_FARMACIA_PEDIATRICA/LIBRO_FARMACIA.pdf
18. PEDIAMECUM. Index @ PEDIAMECUM.ES [Internet]. 2012. Available from: <http://pediamecum.es/>

19. Taketomo CK HH. *Pediatric & Neonatal Dosage Handbook*. 22st ed. Lexicomp, editor. 2015.
20. CENETEC. Diagnóstico y tratamiento del asma en menores de 18 años en el primero y segundo niveles de atención 1. *Guia Pract Clin SS* [Internet]. 2008;1–40. Available from: <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/009GER.pdf>
21. 18 @ www.medicamentosplm.com [Internet]. Available from: http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/teolong_capsulas_de_liberacion_prolongada/3/103/10043/18
22. FDA. Index @ [Www.Accessdata.Fda.Gov](http://www.accessdata.fda.gov) [Internet]. FDA approved drug products. 2018. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm
23. elixophyllin @ www.drugs.com [Internet]. Available from: <https://www.drugs.com/pro/elixophyllin.html>
24. “Inactive” Ingredients in Pharmaceutical Products: Update (Subject Review) [Internet]. Available from: <https://pediatrics.aappublications.org/content/99/2/268>
25. Medina SR, Castañeda HG FM. *Biodisponibilidad y bioequivalencia en los medicamentos genéricos*. Santillan DRM, editor. 2002.
26. Cárdenas RHL CA. *Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos*. Metropolitana UA, editor. México, DF; 1996.
27. Pr B, Nacionales L, Farmac C. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. 2002;1–83. Available from: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqocs.pdf
28. Torres R, Picado C, de Mora F. Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2019 Mar 23];41(3):141–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300289605706050>
29. Alergia a las proteínas del huevo [Internet]. Madrid; Available from: <https://www.aepnaa.org/ver/huevo>
30. Cai J, Tuong CM, Gozal D. A neonatal mouse model of intermittent hypoxia associated with features of apnea in premature infants. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. 2011/06/15. 2011 Sep 15;178(2):210–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699999>
31. 6018391-Estudios-pre-clinicos-y-clinicos @ docplayer.es [Internet]. Available from: <https://docplayer.es/6018391-Estudios-pre-clinicos-y-clinicos.html>
32. Rojo A. Calculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentacion con animales. Valoración de las incidencias. [Internet]. *Animales de laboratorio*. 2014. p. 31–3. Available from: https://www.uib.cat/digitalAssets/303/303729_2014_animaleslaboratorio_num62_31_33.pdf
33. Comisión nacional de investigación científica y tecnológica (CONICYT). “Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal”. 4 to Taller de Bioética [Internet]. 2009. Available from: <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/10/Libro-4-Aspectos-Bioéticos-de-la-Experimentación-Animal.pdf>
34. NOM-062-ZOO. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999;(9):1689–99. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
35. ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos (modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996). [Internet]. 4 de enero de 2006. Available from: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html>
36. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas

- de intercambiabilidad. Requisitos [Internet]. Diario Oficial de la Federación. 2005. Available from: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5334608&fecha=04/03/2014
37. LANCASTER MC. Laboratory Animals. Nature [Internet]. 2006;216(5121):1249–1249. Available from: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/11/Safena.pdf.pdf>
 38. Rovei V, Chanoine F, Strolin Benedetti M. Pharmacokinetics of theophylline: a dose-range study. Br J Clin Pharmacol [Internet]. 1982 Dec;14(6):769–78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7150456>
 39. Biopharmacie L De. Estudio de Bioequivalencia de Teofilina considerando Cinética de Michaelis-Menten. 1994;13(3). Available from: http://www.latamjpharm.org/trabajos/13/3/LAJOP_13_3_1_5_X37Q8A3K81.pdf

ANEXOS

ANEXO 1. Parámetros de validación

Lo parámetros de validación son:

Linealidad. Es la capacidad que tiene un método analítico, de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra, en un intervalo de trabajo. Se preparan tres curvas del analito en el medio de disolución, a 50, 75, 100 y 125% de la concentración establecida. Se calcula coeficiente de correlación (r), pendiente, ordenada al origen y error relativo a la regresión (Sy/x), obteniendo una r=0.99, Sy/x no mayor 3%.

Exactitud. Proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mesurando.

$$\%Error = \frac{\bar{X} - Valor\ te\acute{o}rico}{Valor\ te\acute{o}rico} \times 100$$

Límite de detección del método. La más pequeña cantidad detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación.

El límite de detección del método como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B : $LOD = y_B + 3S_B$

Límite de cuantificación del método (LOQ). Cantidad más pequeña del analito que se determina cuantitativamente y cuya precisión y exactitud están establecidas previamente. $LOQ = y_b + 10S_b$

Porcentaje de recuperación. Es la capacidad que tiene un método analítico para determinar cuantitativamente la cantidad conocida de analito adicionada a la matriz. Este porcentaje puede dar ideas de las interferencias que posee una matriz determinada.

$$\%R = \frac{C_x - C_M}{C_A} * 100$$

Dónde: C_x = Concentración promedio de las determinaciones.

C_m = Concentración de la muestra.

C_A = Concentración Real Adicionada.

Precisión. Grado de aproximación entre resultados de prueba independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Repetibilidad. Similitud obtenida en repeticiones simultaneas del método analítico. El límite de (r). El valor menor o igual a la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo, en condiciones de repetibilidad dentro del 95% de probabilidad.

Reproducibilidad. Expresa la variabilidad en la aplicación del método en diferentes condiciones. El valor menor o igual a la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo, en condiciones de reproducibilidad dentro del 95% de probabilidad.

Robustez. Se define como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos para las mismas muestras bajo variaciones o modificaciones del método. Es una medida de la capacidad para permanecer sin ser afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas en los parámetros del método y suministra una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Todos estos estudios se realizan cuando se hacen cambios en el método para mejorar su eficiencia, evaluar costos o cuando se presenten variaciones en las condiciones ambientales.

Sensibilidad. Medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración.

ANEXO 2. Metodología de extracción y procesamiento de muestras en UPLC-MS/MS

METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TEOFILINA MEDIANTE UPLC-MS/MS.

Las muestras cargadas para la curva de calibración se prepararon mediante la adición de 190 μ L de plasma de rata y 10 μ L de disolución de teofilina de concentración conocida 20X. Por efecto de la dilución se adicionó una concentración veinte veces mayor a la de trabajo, siguiendo los lineamientos de la NOM-177 SSA1-2013, que no permite utilizar la concentración de trabajo menor al 5%. La curva de calibración usada se representa en la Tabla 62.

Tabla 62. Curva de calibración usada para la cuantificación de teofilina en suero de ratón.

| CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | μ L Solución | AFORO (mL) |
|-----|--------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------|
| CC1 | 10 | 200 | 200 (Sol. 10 μ g/mL) | 10 |
| CC2 | 50 | 1000 | 1000 (Sol. 10 μ g/mL) | 10 |
| CC3 | 100 | 2000 | 2000 (Sol. 10 μ g/mL) | 10 |
| CC4 | 250 | 5000 | 50 (Sol. 1 mg/mL) | 10 |
| CC5 | 500 | 10000 | 100 (Sol. 1 mg/mL) | 10 |
| CC6 | 750 | 15000 | 150 (Sol. 1 mg/mL) | 10 |
| CC7 | 1000 | 20000 | 200 (Sol. 1 mg/mL) | 10 |

CC1: Punto 1 de la curva de calibración; CC2: Punto 2 de la curva de calibración, etc.

La cuantificación de teofilina se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a masas-masas (UPLC-MS/MS, siglas en inglés). Mediante el siguiente procedimiento:

1. Colocar 20 μ L de suero en un tubo eppendorf de 1.5 mL con micropipeta de 10 – 100 μ L.
2. Agregar 120 μ L de disolución saturada de sulfato de amonio
3. Agitar durante 45 segundos en vórtex a máxima velocidad, temperatura ambiente (verificar la formación del vórtice para una adecuada agitación).
4. Agregar 120 μ L de acetona.
5. Agitar durante 45 segundos en vórtex a máxima velocidad, temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos, temperatura ambiente.
7. Verter el sobrenadante en otro tubo eppendorf de 1.6 mL (cuidar que el botón de proteína no se transfiera).
8. Adicionar 200 μ L de cloroformo con multi-dispensadora de 200 μ L.
9. Agitar en vórtex durante 45 segundos a máxima velocidad, temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos, temperatura ambiente.

11. Retirar la fase acuosa con micropipeta, la parte de arriba.
12. Verter la fase orgánica en un tubo de vidrio.
13. Evaporar el cloroformo en desecador a Baño María a 40°C y flujo de aire por 15min.
14. Adicionar 75 μ L de disolución para reconstituir la muestra (100 ng/mL de cafeína en metanol/agua 50:50).
15. Agitar durante 30 segundos en vórtex a máxima velocidad, temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 4500 rpm durante 5 minutos a 4°C.
17. Transferir la muestra a un vial para UPLC (Total recovery, Waters ®), asegurándose que al colocar el líquido no se formen burbujas de aire.
18. Inyectar 10 μ L en equipo de Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia con detector masas-masas (UPLC-MS/MS, siglas en inglés). Fase móvil Metanol/Ácido fórmico 0.1% (50:50), flujo 0.1 mL/min, columna C18.

ANEXO 3. Toma de muestra y determinación de inmunoglobulina E (IgE)

A. TOMA DE MUESTRA RETRA-OCULAR:

- 1.- Se sujeta al ratón de cuerpo y cabeza, evitado que se mueva, pero procurando no ahogar al animal.
- 2.- El ratón está bien sujeto cuando los ojos saltan de las cuencas oculares (si hace movimiento de asfixia soltarlo).
- 3.- Tomar una pipeta Pasteur, limpia, estéril y con la punta en buen estado para evitar dañar el ojo del animal (sin fisuras, chueca o rota).
- 4.- Introducir la punta de la pipeta por la parte externa del ojo, en donde forma una v el parpado.
- 5.- Mover la punta a la parte baja del parpado y girar la pipeta, presionando suavemente, como se muestra en la Ilustración 25.
- 6.- Una vez que haya salido la sangre, tomar la cantidad requerida (200 μ L).
- 7.- Colocarla en un tubo de 0.6 mL con tapa.
- 8.- Limpiar el ojo del animal con una gasa húmeda y colocar en su caja.
- 9.- La pipeta se coloca en un matraz con agua y cloro.
- 10.- Las muestras se centrifugan a 2500 rpm y se separa el suero, conservándose en refrigeración.



Ilustración 25. Toma de muestra retra-ocular.

B. DETECCIÓN CUALITATIVA DE IgE:

Se realizaron dos tipos de metodologías con la finalidad de revisar la viabilidad del Anti-IgE humano y cruza con el IgE del ratón y la segunda la medición de la proporción de IgE usando el antígeno específico.

IgE usado: Anti-Human IgE (ϵ -chain specific)-peroxidasa, antibody produced in goat, A9667-2mL, Sigma- Aldrich Life Science, 048K4818.

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. El antígeno ovoalbúmina (OVA) se diluyó con solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 a una concentración de 2 µg/mL, se agitó en vórtex 10seg.
2. Se colocaron 100 µL en cada pozo excepto en los blancos y control positivo directo.
3. Control positivo (C+), se tomó 0.6 µL de IgE pura de 1 mg/mL y 100 µL de buffer de carbonatos pH 9.6.
4. Se colocaron 100 µL de IgE en la placa (C+) como control directo positivo, para los demás pozos se colocaron 100 µL de OVA.
5. Se incubó la placa de ELISA a 4°C durante toda la noche (en refrigeración).
6. Se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso sobre una gasa.
7. La placa se lavó 4 veces con 200 µL/pozo de solución de fosfatos y tween 20 (PBS-tween 20) y una vez con solo PBS, siguiendo el vertido y secado del paso 6.
8. Se diluyeron los sueros 1:50 con PBS. Se colocaron 100 µL de cada dilución del suero en los pozos de poliestireno de la placa de ELISA, para la IgE de los sueros y la capture.
9. Se incubó la placa a 37°C por hora y media.
10. Se repiten los pasos 6 y 7.
11. Se diluyó el segundo anticuerpo Anti-IgE/peroxidasa 1:500 mL con PBS
12. Se colocó 100 µL/pozo de la dilución de Anti-IgE/peroxidasa y se incubó 2 horas a 37°C.
13. Se repiten los pasos 6 y 7.
14. Revelado de la placa: Se preparó la solución de revelado colocando 10mL de ácido cítrico 0.1M, 10 mL de citrato de sodio 0.1 M, 10 mg de orto-fenilendiamina (OPD) y 10 µL de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 30%. Se colocaron 100 µL/pozo de la solución reveladora.
15. Se dejó incubar en oscuridad por 5 min.
16. Se detuvo la reacción con 50 µL de ácido sulfúrico 1 N.
17. Se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector espectrofotométrico para placas de ELISA.

ANEXO 4. Medición de hematocrito

La muestra de sangre de ratón (sangre total) se tomó en capilares heparinizados directamente del ratón, posterior al realizar el sacrificio mediante guillotina, el capilar se llenó entre el 70-80%. Posteriormente se tapó un extremo del capilar con plastilina y se colocó el capilar sobre la plataforma del cabezal de la microcentrífuga para micro hematocrito, observando que el extremo ocluido quede adherido al reborde externo de la plataforma. Los capilares se centrifugaron por 5 minutos entre 10'000-12'000 rpm, en la Ilustración 26 se observa el proceso de centrifugación hasta la obtención del plasma y el paquete eritrocitario en el tubo capilar.

La lectura se realizó mediante el uso de una regla con medidas del sistema métrico decimal, midiendo el total de la sangre colocada en el tubo y la medida que corresponde al paquete eritrocitario, se divide la cantidad de eritrocitos entre el total medido y se obtiene la proporción de hematocrito que hay en sangre.

Ecuación 2. Cálculo de índice de hematocrito en porcentaje.

$$\text{Índice de Hematocrito (IHC\%)} = \frac{\text{cm fracción eritrocitaria}}{\text{cm totales (plasma y fracción eritrocitaria)}} * 100$$

ANEXO 6. Metodología para la tinción de pulmón de ratón Balb/c

Se separaron 2 ratones de cada grupo con la finalidad de realizar un proceso llamado perfusión que consiste infundir soluciones para limpiar de manera eficiente los órganos a teñir.

El animal se anestesió con 100 μ L de pentobarbital sódico, se esperó a que el animal quedara inmóvil y no pudiera enderezarse al ponerlo boca arriba en una superficie plana. Las cuatro patas del animal se fijaron en una reja de metal que está sobre un recipiente en donde caerán los líquidos (sangre, solución salina y paraformaldehído). Se abrió al animal dejando expuesto el corazón, posteriormente se insertó la aguja del perfusor con un flujo de 1 mL/min en el equipo masterflex con solución salina isotónica en el ventrículo izquierdo del corazón del ratón cortando la aurícula derecha para que la sangre comenzara a drenar, pasando 50 mL de ésta con la finalidad de limpiar al organismo de la sangre, finalmente se pasaron entre 150 y 200 mL de paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 para fijar al organismo, como se ve en la Ilustración 28.



Ilustración 28. Inserción de la aguja del perfusor en el corazón del ratón.

Una vez fijado el ratón (los órganos claros, la cola y patas blancas), se procedió a tomar el lóbulo superior del pulmón derecho. La muestra se colocó en un frasco de plástico con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 por 72 horas para asegurar que el órgano este totalmente fijado. Estas muestras se incluyeron en parafina en un equipo histoquinet, el cual puede verse en la Ilustración 21, el proceso inició con la deshidratación pasando los órganos a las siguientes soluciones de metanol-agua cada hora y media: 60:40; 70:30; 80:20; 90:10; 96:4, respectivamente, etanol absoluto en dos tiempos diferentes. Posteriormente, empezó el proceso de aclarado pasando las muestras a las soluciones de etanol-xilol (1:1) y dos de xilol absoluto, por una hora y media cada una. Finalmente, se embebió en parafina (40°C) en dos tiempos de una hora cada uno. Se colocaron en los moldes correspondientes y se dejó enfriar, como se observa en la Ilustración 29.



Ilustración 29. Equipo histoquinet para inclusión en parafina y muestras de órganos enfriadas después de incluirlas en parafina.

Este molde se cortó en un micrótopo de 5 μ m de espesor una vez que el corte no tiene ondulaciones y el tejido se observó entero para colocarlo en los portaobjetos, colocando tres

cortes por lámina como se aprecia en la Ilustración 30, así mismo se puede observar el uso del micrótom.

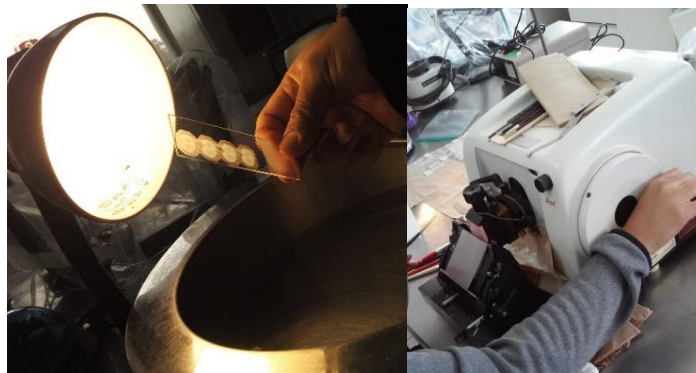


Ilustración 30. Cortes de pulmón incluido en parafina en un micrótom a 5 micrómetros de espesor.

Los portaobjetos se prepararon para la tinción, extrayendo la parafina usando xilol (10 min dos cambios), se rehidrató con alcohol absoluto por 5 min, posteriormente se cambió cada 5 min a etanol al 95 y 70%, finalmente en agua 100% por 5min.

Los cortes fueron teñidos con hematoxilina sumergiendo lo cortes por 10 min, enjuagados con agua destilada 30 segundos y se pasa a alcohol ácido, se lava nuevamente con agua. Se sumerge 30 segundos en eosina, se pasa nuevamente por una serie de alcoholes 20 segundos en etanol al 70, 95% y 100% para deshidratar la muestra y se deja remojar 10 min en xileno, antes de realizar el montaje final en medio de montaje (Cytoseal), para verse al microscopio. Las soluciones se colocan en contenedores de vidrio con un volumen para cada uno de 200 mL.

La hematoxilina es un colorante catiónico (presenta cargas positivas), por lo que tiene afinidad por los ácidos nucleicos (ADN y ARN), teñirá la cromatina del núcleo y las agregaciones ribosomales del citoplasma, como las que se dan en el retículo endoplasmático rugoso, tiñe de azul los núcleos. La eosina es un colorante aniónico, siendo afín al citoplasma y matriz extracelular tiñéndolos de rosa o rojo, los glóbulos rojos se tiñen de rojo un poco anaranjado y las fibras musculares de rojo o fucsia.

ANEXO 7. Desarrollo de la metodología para cuantificar teofilina en suero de ratón

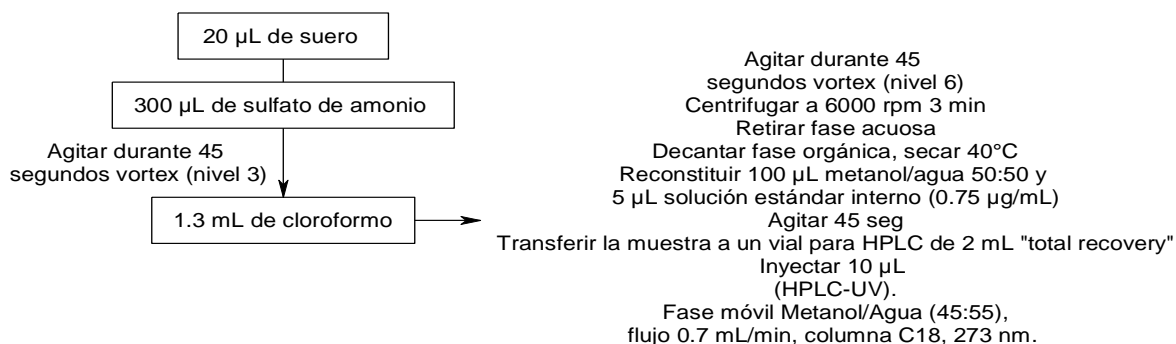


Ilustración 31. Metodología de extracción de suero para equipo HPLC-UV.

Inicialmente la metodología de la Ilustración 31 en HPLC-UV había presentado tendencia a la linealidad, sin embargo, al empezar el proceso de validación la limpieza de la muestra, el límite de cuantificación y la selectividad no eran las esperadas. Se puede observar una gran cantidad de respuestas provenientes del suero (Tabla 63), así mismo, posterior a la inyección de cuatro muestras de suero de ratón procesadas se presentaba un acarreo, lo cual impedía que los picos subsiguientes se definieran y que el blanco presentara una respuesta, lo cual se puede observar claramente en la ilustración 32.

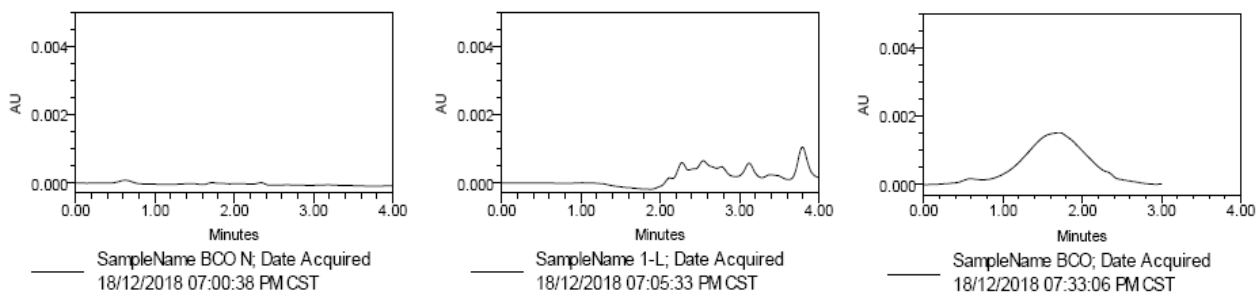


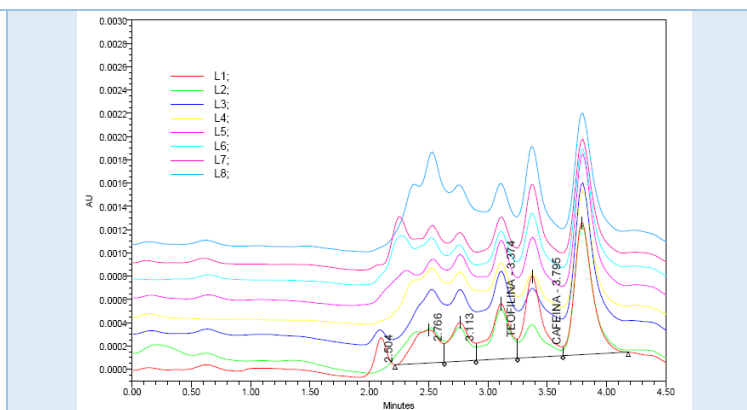
Ilustración 32. Cromatograma de extracciones (a), blanco de disolventes MeOH/H₂O 45:55 (b) y extracciones posteriores al blanco (c), posterior a la corrida cromatográfica de extracciones de suero en MeOH/H₂O 45:55, 0.1mL/min, columna C18.

Tabla 63. Cromatogramas de la curva de calibración obtenido mediante la metodología de extracción en HPLC-UV.

METODOLOGÍA

CROMATOGRAMAS

Vol. Suero: 20 µL
Precipitante: Sulfato de amonio saturado
Disolvente de extracción: Cloroformo.
Prueba: Curva de calibración
 Tr teofilina= 3.374 min; Tr cafeína= 3.795 min



Debido a lo anterior, se hicieron pruebas en otros equipos tales como, Cromatografía Líquida de Ultra alta Resolución acoplado a Masas/Masas (UPLC-MS/MS, siglas en inglés) esperando disminuir las interferencias de la muestra y aumentar el límite de cuantificación.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A MASAS.

Las concentraciones probadas para esta curva de calibración en suero de ratón se diseñaron con respecto a la concentración máxima esperada en ratón de 100 ng/mL al administrar una dosis de 5 mg/kg, estas se pueden ver en la Tabla 64.

Tabla 64. Curva de calibración 1 para modelo animal (ratón Balb/c).

| CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | µL Solución 10 µg/mL | AFORO (mL) | CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | µL Solución 10 µg/mL | AFORO (mL) |
|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------|------------|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------|------------|
| CC1 | 1 | 20 | 20 | 10 | CC6 | 100 | 2000 | 2000 | 10 |
| CC2 | 5 | 100 | 100 | 10 | PC1 | 3 | 60 | 60 | 10 |
| CC3 | 25 | 500 | 500 | 10 | PC2 | 40 | 800 | 800 | 10 |
| CC4 | 50 | 1000 | 1000 | 10 | PC3 | 80 | 1600 | 1600 | 10 |
| CC5 | 75 | 1500 | 1500 | 10 | | | | | |

CC1: punto 1 de la curva de calibración; CC2: punto 2 de la curva de calibración; así consecutivamente. PC1: Punto control 1 para la curva de calibración; así consecutivamente.

Se realizó un screening con diferentes metodologías en el equipo UPLC-MS fase móvil metanol/ácido fórmico 0.1% 0.1 mL/min, inyectando 10 µL (Ilustración 33) usando la concentración de CC4 = 50 ng/mL, las metodologías con acetonitrilo frío/ácido fórmico 1%/cloroformo; acetonitrilo frío/ diclorometano y sulfato de amonio/diclorometano, mostraron las respuestas más altas, pero no repetibles como puede verse en la Tabla 65. Sin embargo, al retar las técnicas con la curva de calibración, éstas no eran lineales, presentando una meseta, es decir, solo se extraía la respuesta del blanco.

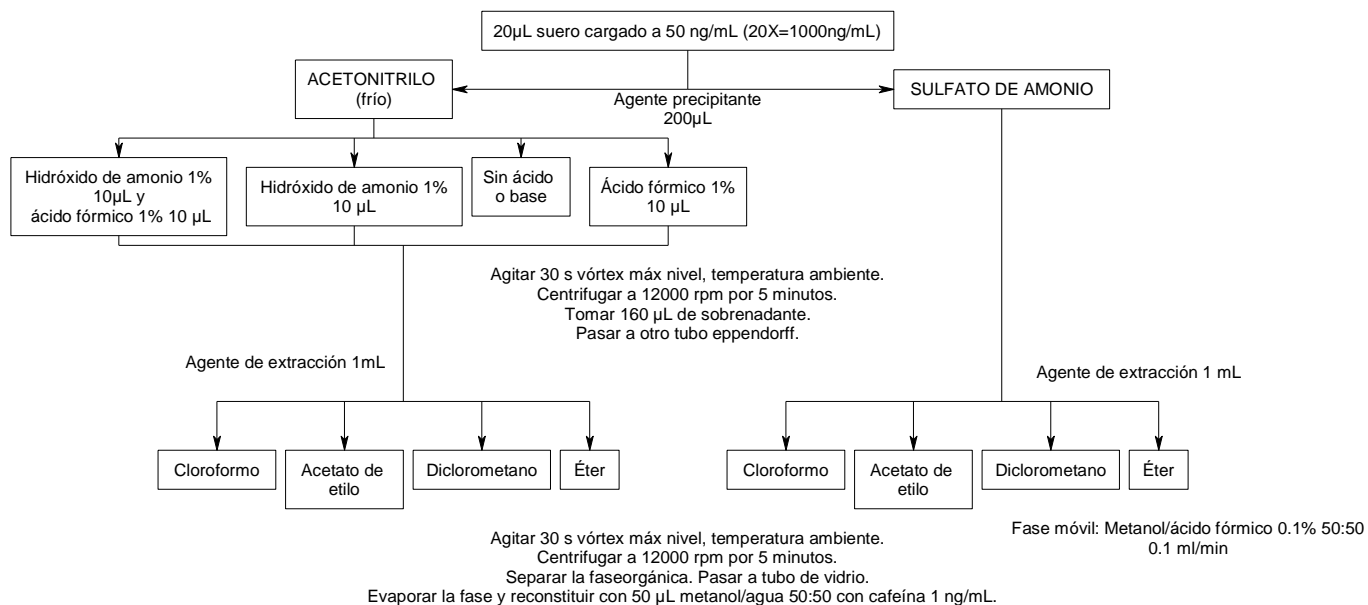


Ilustración 33. Diagrama del screening de metodologías de extracción en UPLC-MS para las muestras de ratón.

Tabla 65. Respuestas del screening de metodologías de extracción.

| MUESTRA | RT (min) | ÁREA TEOFILINA | ÁREA ESTÁNDAR INTERNO | RESPUESTA | OBSERVACIONES |
|-----------------------------------------------------------|-----------|------------------|-----------------------|-------------|--------------------------------------------------------|
| Acetonitrilo-Acetato de etilo | 1.57±0.01 | 2787.57±634.06* | 6020.34±476.46 | 46.22±9.06 | Una sola fase |
| Acetonitrilo-Cloroformo | 1.58±0.02 | 1185.22±462.64* | 3500.35±1101.06 | 33.40±4.33 | Una sola fase |
| Acetonitrilo-Diclorometano | 1.57±0.01 | 4806.03±1990.54* | 9467.49±1995.42 | 49.10±11.86 | Fase acuosa arriba |
| Acetonitrilo-éter | 1.57±0.01 | 1993.04±1335.54 | 2991.38±1734.79 | 61.35±13.99 | Una sola fase |
| Acetonitrilo-hidróxido de amonio-cloroformo | 1.58±0.02 | 2533.12±274.35* | 4984.16±593.85 | 50.87±0.72 | Fase acuosa arriba |
| Acetonitrilo-ácido fórmico-cloroformo | 1.57±0.01 | 4776.73±847.46* | 6507.54±1343.24 | 73.73±3.17 | Fase acuosa arriba |
| Acetonitrilo-ácido fórmico-hidróxido de amonio-cloroformo | 1.56±0.03 | 2878.59±1047.09 | 5862.11±2287.99 | 50.16±7.40 | Fase acuosa arriba |
| Sulfato-Acetato de etilo | 1.57±0.01 | 2318.17±1425.83 | 2815.35±1623.76 | 81.25±2.90 | Fase acuosa abajo |
| Sulfato -Cloroformo | 1.55±0.04 | 1385.48±1267.31 | 2940.40±2470.46 | 49.86±17.09 | Fase acuosa arriba |
| Sulfato -Diclorometano | 1.56±0.02 | 2208.99±585.08* | 4011.58±921.74 | 54.86±6.45 | Fase acuosa arriba |
| Sulfato -éter | 1.57±0.01 | 1188.08±261.13* | 2251.17±718.26 | 53.66±5.52 | Fase acuosa abajo, precipitado después de reconstituir |

*menor variación en el área de teofilina; *respuestas más grandes, pero con mayor variación. Fase acuosa, agua en el suero y/o no miscible con los solventes orgánicos usados.

Al observar todos los problemas presentados, se decidió hacer una curva de disolventes, haciendo una dilución con: 950 µL de fase móvil con 50 µL de solución oral 20X y tomando 20 µL de esta dilución para la extracción, con esto nos dimos cuenta de que no era lineal a partir del CC1 (1 ng/mL), presentó una respuesta similar a la del blanco, por ello, se modificó la curva ver la Tabla 66.

Tabla 66. Curva de calibración 2 para modelo animal (ratón Balb/c).

| CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | μL Solución 10 μg/mL | AFORO (mL) | CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | μL Solución 10 μg/mL | AFORO (mL) |
|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------|------------|-----|-----------------------|---------------------------|----------------------|------------|
| CC1 | 5 | 100 | 100 | 10 | CC6 | 80 | 1600 | 1600 | 10 |
| CC2 | 10 | 200 | 200 | 10 | CC7 | 100 | 2000 | 2000 | 10 |
| CC3 | 20 | 400 | 400 | 10 | PC1 | 15 | 300 | 300 | 10 |
| CC4 | 40 | 800 | 800 | 10 | PC2 | 30 | 600 | 600 | 10 |
| CC5 | 60 | 1200 | 1200 | 10 | PC3 | 75 | 1500 | 1500 | 10 |

CC1: punto 1 de la curva de calibración; CC2: punto 2 de la curva de calibración; así consecutivamente. PC1: Punto control 1 para la curva de calibración; así consecutivamente.

Los resultados aún no fueron los esperados, no había una tendencia visible en las curvas con las nuevas concentraciones, se pensó que el precipitante aún no era el adecuado, por lo que, se probó cambiándolo por acetona repitiendo la extracción a la concentración CC4 = 40 ng/mL, para evaluar su repetibilidad usando como agente de extracción cloroformo y acetato de etilo, sin embargo, esta metodología presentaba el mismo problema, la respuesta era la misma a las diferentes concentraciones. Así mismo, se observó que la teofilina presentaba una respuesta muy baja, por lo que quizá la ionización se estaba alterando por el pH de la solución posterior a la reconstitución o bien, la teofilina se quedaba unida a la albúmina y al precipitar las proteínas, se quedaban con una gran cantidad de teofilina. Se probó una metodología ácido-base y una por hidrólisis enzimática para extraer una mayor cantidad de teofilina por desnaturalización de proteínas y por amortiguar el pH, usando una nueva curva con concentraciones más altas y un volumen de plasma mayor (1mL), como se puede ver en la Tabla 67. En cuanto al estándar interno, inicialmente la cafeína presentaba variaciones, por lo que, se utilizó acetaminofén, los dos estándares internos (cafeína y acetaminofén) se probaron para evaluar cual era el que daba menor variación.

Tabla 67. Curva de calibración 3 concentraciones altas.

| CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | μL Solución 10μg/mL | AFORO (mL) |
|-----|-----------------------|---------------------------|---------------------|------------|
| CC1 | 250 | 5000 | 50 | 10 |
| CC2 | 500 | 10000 | 100 | 10 |
| CC3 | 1000 | 20000 | 200 | 10 |
| CC4 | 2000 | 40000 | 400 | 10 |
| CC5 | 4000 | 80000 | 800 | 10 |
| CC6 | 6000 | 120000 | 1200 | 10 |

CC1: punto 1 de la curva de calibración; CC2: punto 2 de la curva de calibración; así consecutivamente.

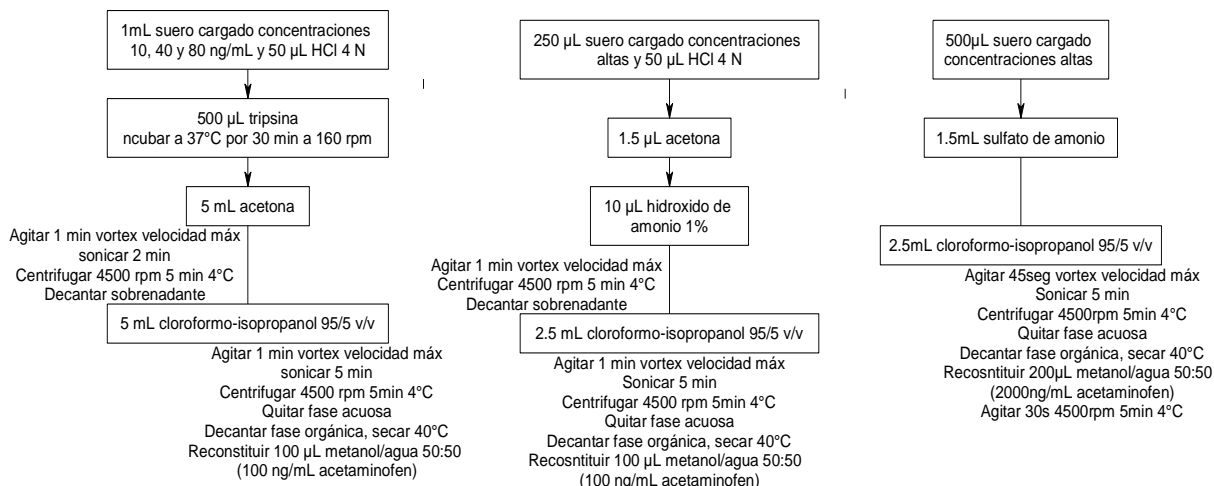


Ilustración 34. Metodologías de extracción: enzimática, cambio de pH y sulfato de amonio.

La metodología enzimática no mostró linealidad, además de ser más larga y complicada, pocos puntos de la curva entraban en la recta, la metodología con cambios de pH mostraba una respuesta similar, pocos puntos entraban. Se decidió probar con concentraciones altas la metodología usada en HPLC-UV, para evaluar si se pudiese hacer modificaciones y limpiar la muestra, mezclando ambos pasos que daban una tendencia, pero no se llegaba a la linealidad; esta metodología se afinó de tal manera que dio una respuesta lineal a concentraciones altas. En el análisis se observó que el blanco siempre tenía una respuesta basal muy alta, debido a que la dieta humana está llena de xantinas. Por ello, se probó la metodología final en proporción para 20 µL de plasma de rata cargado a las concentraciones de la curva de la Tabla 67 (el alimento del bioterio no contiene xantinas), expuesta en el capítulo de metodología. Los resultados de la curva dieron lineales, por lo que, se retó con muestras de ratón que dieron el perfil esperado, se reajustó la curva a las concentraciones de la Tabla 68 y se extrajeron las muestras de ratón, como describe el método de la Ilustración 34. Debido a no contar con cantidades grandes de plasma de rata se cargaron las muestras de la siguiente manera: 190 µL plasma más 10 µL de solución 20X se agitaron por 30 segundos.

Tabla 68. Curva de calibración usada para la cuantificación de teofilina en suero de ratón.

| CCX | CONCENTRACIÓN (ng/mL) | CONCENTRACIÓN 20X (ng/mL) | µL Solución | AFORO (mL) |
|-----|-----------------------|---------------------------|------------------|------------|
| CC1 | 10 | 200 | 200 µL (10µg/mL) | 10 |
| CC2 | 50 | 1000 | 1000µL (10µg/mL) | 10 |
| CC3 | 100 | 2000 | 2000µL(10µg/mL) | 10 |
| CC4 | 250 | 5000 | 50µL (1mg/mL) | 10 |
| CC5 | 500 | 10000 | 100µL (1mg/mL) | 10 |
| CC6 | 750 | 15000 | 150µL (1mg/mL) | 10 |
| CC7 | 1000 | 20000 | 200µL (1mg/mL) | 10 |

CC1: punto 1 de la curva de calibración; CC2: punto 2 de la curva de calibración; así consecutivamente.

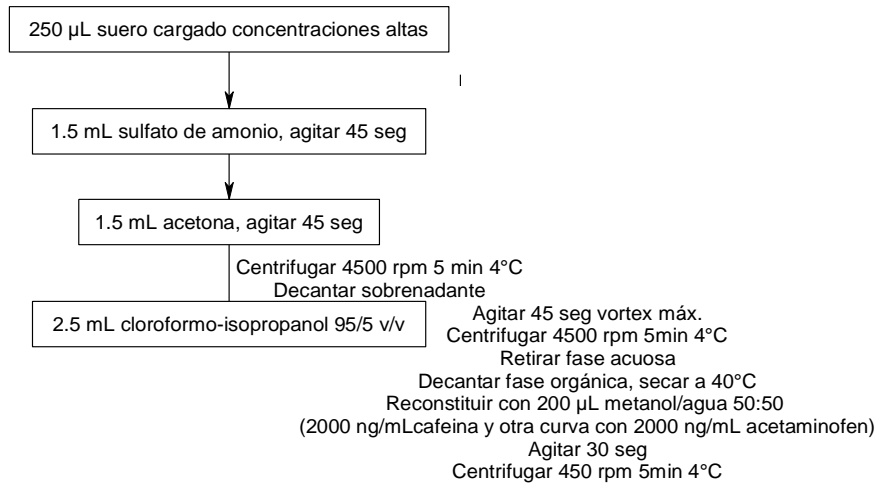


Ilustración 35. Metodología final de extracción antes de ajustarla a los 20µL de la muestra de ratón.