

50524
102



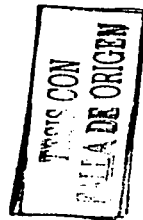
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

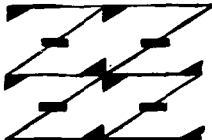
INFLUENCIA DEL 17-BETA ESTRADIOL SOBRE LA
FARMACOCINETICA DE ETOPOSIDO EN RATAS
SPRAGUE DAWLEY

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

VIRTO AGUILAR JORGE



DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA GARCIA LOPEZ



LOREMANO
E.S.
DENUPSTBA REFLEXION

MEXICO, D. F.

FEBRERO 2003

A



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACION

DISCONTINUA

*A mi familia
Por su infinito apoyo y por estar ahí
siempre que los necesito.*

*Padre gracias por hacerme fuerte,
por enseñarme a trabajar y a saber que
puedo levantarme de mis errores.*

*Madre gracias por todo el amor que me has dado
por transmitirme tu nobleza y por hacerme
mas humano.*

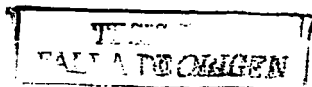
*Alma y Ana gracias por ayudarme a crecer,
por darme tanto cariño y confianza.*

*Abuelos gracias por sus consejos, su cariño
Y por darme la familia que tengo.*

**TESIS CON
TALLA DE ORIGEN**

*A la Dra. Patricia García López
Por haberme dado la oportunidad de trabajar
bajo su tutela.*

*A mis sinodales:
Q. Ma. Teresa Mendoza Mata
Q.F.B. Valentín Islas Pérez
Q.F.B. Consuelo Bautista Aragón
Q.F.B. Guadalupe A. Aceves Rosas
Por su tiempo y sus valiosas críticas.*



*A mi universidad, profesores y amigos
por haberme formado, por enseñarme,
por darme su amistad.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D

I. RESUMEN.	1
II. CONCEPTOS BÁSICOS	3
1. Farmacología	3
1.1 Farmacodinamia	3
1.2 Farmacocinética	4
2. Cáncer	8
2.1 Tipos de cáncer	8
2.2 Características de una célula cancerosa	8
2.3 Carcinogénesis	9
2.4 Mecanismo de la carcinogénesis	9
2.5 Terapéutica	9
3. Etopósido	11
3.1 Mecanismo de acción	11
3.2 Farmacocinética	11
3.3 Interacciones farmacológicas	13
3.4 Efectos secundarios y tóxicos	13
4. Estradiol	15
4.1 Hormonas estrogénicas	15
4.2 Hormonas estrogénicas y cáncer	16
5. Cromatografía	17
5.1. Técnicas cromatográficas	17
5.2. Cromatografía de líquidos	18
5.3. Detección electroquímica	19
6. Validación	21
6.1. Validación de métodos analíticos	21
6.1.1. Linealidad	21

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.1.2. Precisión.	21
6.1.3. Exactitud.	22
6.1.4. Especificidad.	22
6.1.5. Estabilidad de la muestra.	22
6.1.6. Limite de cuantificación.	22
6.1.7. Limite de detección.	22
III. ANTECEDENTES	23
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
V. OBJETIVOS	26
1. Objetivo general	26
2. Objetivos particulares	26
VI. HIPÓTESIS	27
VII. EQUIPO, REACTIVOS Y MATERIAL.	28
VIII. METODOLOGÍA	31
1. Diseño experimental	31
2. Diagrama de flujo	32
3. Procedimientos generales.	34
IX. RESULTADOS	36
1. Implementación y validación del método analítico	36
1.1. Implementación del método	36
1.1.1. Proceso de extracción.	36
1.1.2. Condiciones cromatográficas	36
1.2. Validación del método.	37
1.2.1. Criterios de aceptación.	37
1.2.2. Linealidad del sistema.	37
1.2.3. Precisión del sistema.	39

1.2.4. Especificidad del método	40
1.2.5. Linealidad del método	42
1.2.6. Precisión del método.	43
1.2.6.1. Repetibilidad	43
1.2.6.2. Reproducibilidad	43
1.2.7. Exactitud	44
1.2.8. Estabilidad	45
1.2.9. Limite de detección	46
1.2.10. Limite de cuantificación	46
2. Farmacocinética de etopósido después de la administración de 17- β Estradiol	47
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	50
XI. CONCLUSIONES	55
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	56

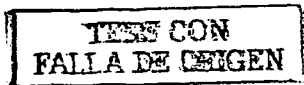
TESIS CON
FOLIO DE PRESEN

I. RESUMEN

El etopósido es un agente antineoplásico derivado de la epipodophyllotoxina, el cual se ha utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Este compuesto, detiene el crecimiento celular inhibiendo a la enzima topoisomerasa II del ADN. Por otro lado, existen evidencias de que las hormonas esteroideas, presentan interacciones farmacocinéticas cuando son administradas en combinación con agentes anticonvulsivantes y antibióticos. El mecanismo de acción, se ha atribuido a la inducción de enzimas hepáticas por los estrógenos. Sin embargo, a la fecha se desconoce si las hormonas esteroideas pueden también presentar alguna interacción farmacocinética con fármacos antineoplásicos.

En este trabajo, se investigó la influencia del estradiol sobre la farmacocinética de etopósido en ratas Sprague-Dawley. Primero se desarrolló y validó un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar las concentraciones sanguíneas de etopósido en micro muestras (100 μ L) de sangre total, obteniéndose un método sencillo de realizar y que cumple con los parámetros de validación. En la segunda parte del trabajo, se realizó la farmacocinética de etopósido administrado por vía oral en ratas hembras ovariectomizadas sometidas a un tratamiento previo con 17- β -estradiol y se comparó contra su grupo control al cual se le administró solo el vehículo (aceite vegetal).

En ambos grupos, las muestras sanguíneas se recolectaron durante 8 horas a diferentes intervalos de tiempo y se determinó la concentración sanguínea de etopósido con el método propuesto, a



partir de la realización de las curvas de concentración sanguínea de etopósido contra tiempo se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: la concentración máxima (C_{max}), tiempo máximo (t_{max}), área bajo la curva (AUC) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la absorción de etopósido dada por AUC y la C_{max} disminuyen en el grupo tratado con 17- β -Estradiol con respecto al grupo control. Sin embargo, la eliminación dada por el $t_{1/2}$ parece estar incrementada en el grupo tratado comparado con el grupo control. Nuestros datos demuestran que las hormonas estrogénicas modifican la farmacocinética de etopósido, y aunque éstos no pueden ser extrapolados directamente a situaciones clínicas, se sugiere investigar dichas interacciones, no sólo a nivel farmacocinético sino también a nivel farmacodinámico.

TESIS CLIN
FALLA IV ORIGEN

II. CONCEPTOS BÁSICOS

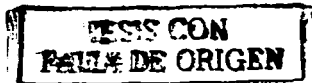
1. FARMACOLOGÍA.

Es la ciencia que estudia la interacción fármaco individuo, se divide en dos ramas: la farmacodinamia y la farmacocinética.

1.1. FARMACODINAMIA.

Los fármacos actúan modificando procesos celulares, éstos pueden ser estimulados o inhibidos, para esto se debe estimular primero a un receptor celular. Los receptores son macromoléculas celulares generalmente proteicas, capaces de reaccionar con un fármaco y producir una respuesta constante, específica y previsible; este mecanismo puede ser por activación de un sistema enzimático produciendo una cascada de reacciones o asociado a un canal iónico. Las dos características básicas de un receptor farmacológico, son la afinidad (capacidad de un fármaco de fijarse a un receptor) y la especificidad, gracias a la cual pueden diferenciar una molécula de otra aún cuando sean parecidas estructuralmente.

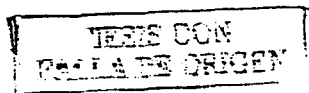
En algunas ocasiones el receptor no está en la membrana, sino en el citoplasma o núcleo, en este caso los fármacos tienen que atravesar la membrana celular para ejercer su efecto farmacológico. Muchos fármacos no tienen un receptor específico, su acción es inespecífica sobre algún componente. También existen fármacos que no actúan sobre estructuras celulares, ejercen su efecto interaccionando fisicoquímicamente sobre el medio.



La actividad intrínseca, es la capacidad del fármaco para iniciar su acción tras su unión con el receptor, es frecuente que muchos fármacos tengan afinidad por un mismo receptor, en este caso se da un fenómeno de competencia. Los fármacos pueden funcionar como agonista (fármaco que además de afinidad tiene actividad intrínseca), antagonista (fármaco que se une al receptor pero no posee actividad intrínseca), o como agonista parcial (fármaco que tiene afinidad por un receptor, pero que posee un grado menor de actividad intrínseca; este puede actuar como agonista o antagonista). El fármaco antagonista impide que un fármaco agonista se una al receptor (antagonismo competitivo), por ejemplo, un fármaco A (agonista que presenta afinidad y actividad intrínseca) y un fármaco B (antagonista competitivo puro que presenta afinidad y actividad intrínseca nula), la relación entre la presencia del fármaco B y el incremento de la concentración del fármaco A es necesario para mantener el nivel de respuesta; si disminuye la cantidad de fármaco A que se une al receptor disminuirá el efecto total (*Hardman y colaboradores 1996; Goth y colaboradores 1984*).

1.2. FARMACOCINÉTICA.

Comprende una serie de procesos denominados L. A. D. M. E (Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación). Todos los fármacos pasan por estos procesos, las formas farmacéuticas intravenosas son las únicas que no tienen proceso de liberación y absorción ya que van directo a la circulación sanguínea (*Girdwood, 1992, Goth, 1984*).



ABSORCIÓN.

Es el proceso mediante el cual, el fármaco pasa del sitio de aplicación a la circulación sanguínea, de aquí se deriva el término de biodisponibilidad que se refiere a la cantidad de fármaco que llega a circulación sanguínea para ejercer su efecto farmacológico y a que velocidad ocurre esto.

La absorción depende de varias características que pueden ser las relacionadas con el fármaco, el preparado farmacéutico o el organismo. Para el fármaco tenemos la liposolubilidad, grado de ionización, peso molecular, estructura y forma de la partícula, entre otras. La biodisponibilidad depende del tipo de medicamento aplicado, en una escala de mayor a menor tenemos: Soluciones intravenosas (iv) – soluciones – suspensiones – cápsulas – tabletas. Por último, las relacionadas con el organismo son: la edad, el sexo, la raza, las condiciones alimenticias, etc. (*Hardman, 1996, Goth, 1984*).

DISTRIBUCIÓN.

Es el paso del fármaco de circulación sanguínea a otros compartimentos. La forma de distribución de los fármacos depende de factores fisiológicos y de ciertas propiedades fisicoquímicas de éstos. Puede distinguirse una fase inicial de distribución determinada por el gasto cardíaco y la circulación sanguínea, la segunda fase de distribución de un fármaco, también esta limitada por el flujo sanguíneo e involucra una fracción de la masa corporal mucho más grande que la primera fase. La difusión en el compartimento intersticial; se produce rápidamente debido a la gran permeabilidad de las membranas endoteliales capilares. Los fármacos que no son

CON
A DE ORIGEN

liposolubles y que atraviesan poco las membranas tienen una distribución restringida y, por ende, también son restringidos sus sitios de acción. La distribución puede estar también limitada por la unión del fármaco a proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina para fármacos ácidos y a la glucoproteína α_1 para los fármacos básicos. Un fármaco que se une totalmente y con firmeza no tiene acceso a los sitios celulares de acción, ni puede metabolizarse ni eliminarse. Los fármacos pueden acumularse en los tejidos a concentraciones mayores que las esperadas de acuerdo con el equilibrio de difusión, como resultado de gradientes de pH, unión con constituyentes intracelulares o disolución en la grasa (*Hardman y colaboradores 1996*).

METABOLISMO.

Son los cambios bioquímicos que se realizan en el organismo por los cuales los fármacos se convierten en formas más fácilmente eliminables. El metabolismo junto con la excreción constituyen los procesos de eliminación. En la eliminación por metabolismo, primero se lleva a cabo la inactivación de la molécula por medio de reacciones de oxidación y reducción, hidrólisis y descarboxilación, dando lugar a metabolitos que pueden ser inactivos o activos. Los metabolitos se conjugan con un sustrato endógeno, como el ácido glucurónico o el sulfato y son excretados en la bilis. Los sistemas enzimáticos que intervienen en la transformación de muchos fármacos están ubicados principalmente en el retículo endoplasmático liso hepático, estas enzimas también están presentes en otros órganos como el riñón y epitelio gastrointestinal. Los fármacos absorbidos en el intestino son expuestos al efecto del primer paso, éste presenta la acción

combinada de enzimas epiteliales gastrointestinales y hepáticas metabolizadoras que pueden evitar la aparición de un fármaco en la circulación después de la administración oral. Las enzimas microsomales catalizan las conjugaciones de glucurónidos y casi todas las oxidaciones de los fármacos. Las reacciones de reducción e hidrólisis son catalizadas por enzimas microsomales y no microsomales. La liposolubilidad es un requerimiento importante, pero no el único, para que un fármaco sea metabolizado por los microsomas hepáticos, esta propiedad favorece la penetración del fármaco en el retículo endoplasmático y su unión al citocromo P450, componente primario del sistema de enzimas oxidativas (*Hardman y colaboradores 1996; Goth y colaboradores 1984; Girdwood y colaboradores 1992*).

ELIMINACIÓN.

Los fármacos se eliminan del organismo sin modificarse (excreción directa en orina) o bien como metabolitos (metabolismo). Los órganos excretores eliminan con mayor eficacia compuestos polares que sustancias de gran liposolubilidad. Por esto los fármacos liposolubles no se eliminan fácilmente hasta que se metabolizan a compuestos más polares (metabolismo). La excreción renal del fármaco y metabolitos en orina implican tres procesos: filtración glomerular, secreción biliar activa y reabsorción tubular pasiva. La cantidad de fármaco que penetra a la luz tubular por filtración, depende de su unión fraccional a proteínas del plasma y de su tasa de filtración glomerular. (*Hardman y colaboradores 1996; Girdwood y colaboradores 1992*).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. CÁNCER.

Es un padecimiento que se origina a partir de la alteración de una de las muchas células del organismo, las cuales empiezan a dividirse en forma autónoma, dando lugar a millones de células como ella, capaces de auto replicarse e invadir el organismo (*Clarysse y colaboradores 1976*).

2.1. TIPOS DE CÁNCER.

Existen unos 200 tipos de células distintas en nuestro organismo, y si bien en principio cualquiera de ellas puede potencialmente originar un cáncer, en realidad el 90% de estos padecimientos son generados por células epiteliales (carcinomas). Los otros tipos mayoritarios de cánceres son derivados de células del tejido conectivo o muscular (sarcomas), de la sangre (leucemias, linfomas, mielomas), o de células del sistema nervioso (neuroblastomas, gliomas) (*Cortinas y colaboradores 1990; Pardo 1988*).

2.2. CARACTERÍSTICAS DE UNA CÉLULA CANCEROSA.

Estas células alteradas se pueden identificar por:

1. Su morfología.
2. Las modificaciones de su membrana externa, que alteran su comunicación con el exterior y le confieren propiedades inmunológicas específicas.
3. Su proliferación autónoma.
4. Las alteraciones tanto de su material genético, como la expresión de la información contenida en él.

(*Cortinas y colaboradores 1990; Pardo 1988*).

2.3. CARCINOGENESIS.

Es el proceso secuencial a través del cual una célula normal, sometida a un control riguroso de su proliferación, ubicación territorial y expresión genética, se transforma en una célula que expresa en forma inadecuada genes que alteran su proliferación y su patrón de diferenciación, lo que la lleva a invadir el organismo (*Cortinas y colaboradores 1990; Bruce 1990*).

2.4. MECANISMO DE LA CARCINOGENESIS.

El desarrollo del cáncer puede comenzar con una breve exposición (unas cuantas horas o días) a una forma activa del carcinógeno, sin que se requiera la presencia de este como tal. La breve exposición al carcinógeno no produce una célula cancerosa, sino una célula iniciada que puede ser estimulada diferencialmente a dividirse para formar un foco proliferativo bajo la acción del promotor. La población celular resultante presenta a su vez, un mayor riesgo de sufrir un segundo evento raro, a partir del cual se genera una nueva población dotada de un crecimiento autónomo y que puede considerarse como el comienzo real de la neoplasia, fase conocida como progresión tumoral (*Cortinas y colaboradores 1990; Bruce 1990*).

2.5. TERAPÉUTICA.

La etapa en la que se detecte el cáncer es importante para saber el tamaño del tumor, lo extenso de las células cancerosas y si ha diseminado a otros órganos. El tratamiento para el cáncer puede ser a

partir de cirugía, terapia hormonal, quimioterapia y/o terapia de radiación; el grado o la etapa del cáncer determinará el tipo de tratamiento. En la cirugía se extrae el tumor y/o órganos afectados en caso de que haya diseminado. La terapia hormonal (en el cáncer de mama), consiste en disminuir la concentración de hormonas circulantes. La quimioterapia, es un tratamiento a base de fármacos que detienen el crecimiento tumoral. Y por último, la terapia con radiación detiene el crecimiento de células cancerosas al reducir su capacidad para reproducirse (*González y colaboradores 1998; Bruce 1990*).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3. ETOPÓSIDO.

El etopósido es un derivado semisintético de la epipodophyllotoxina, extraída de la planta de la mandrágora. Se conoce como VP-16, se utiliza en el tratamiento de cáncer de testículo, contra los carcinomas de células pequeñas de pulmón, la enfermedad de Hodgkin y los linfomas no Hodgkin, la leucemia no linfocítica aguda, el carcinoma de mama y el sarcoma de Kaposi asociado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (*Duncan y colaboradores 1986*).

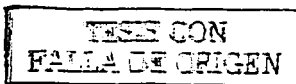
3.1. MECANISMO DE ACCIÓN.

El etopósido inhibe la síntesis de ADN a nivel de la fase S tardía y G-2 del ciclo celular, provoca un rompimiento por-interrupción de la ADN topoisomerasa II.

Las topoisomerasas del ADN son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del ADN durante los procesos de replicación y traslación del material genético. Los fármacos anticancerosos que ejercen su acción a este nivel estimulan y estabilizan los complejos ADN-enzima provocando la escisión mantenida de la cadena (*Hardman y colaboradores 1996; Bruce 1990*).

3.2. FARMACOCINÉTICA.

La administración oral de etopósido resulta en una absorción de aproximadamente el 50 % del fármaco. Después de su inyección intravenosa, se observan concentraciones plasmáticas máximas de 30



$\mu\text{g/mL}$; existe un patrón bifásico de depuración, con vidas medias de 3 y 12 horas. Alrededor del 30 al 45 % de una dosis administrada es excretada por orina, dos tercios en forma de fármaco inalterado y un tercio como metabolitos, el principal metabolito detectado es el hidroxido ácido (4'-demethylepipodophyllilic acid-9-(4,6,-o-ethylidene-beta-D-glucopyranoside)), existen otros que también se han reportado como el cis(picro)lactone, aglicone y los productos derivados de la oxidación del anillo dimetoxifenol y por último están los que se forman por conjugación del fármaco con el ácido glucurónico y el sulfato. La concentración de etopósido en el líquido cefalo raquídeo (LCR) oscila entre 1 y 10 % de los valores plasmáticos. El etopósido se metaboliza en el hígado por citocromo P450 isoforma 3 A 4, y un 15 % es recuperado en las heces (*Henwood y colaboradores 1990; Hardman y colaboradores 1996; Lo y colaboradores 1999*).

En la Tabla 1 se presentan las características farmacocinéticas de etopósido administrado por vía oral en una dosis de 200 mg/m^2 en niños (*Clark y colaboradores 1987; Sinkule 1984*).

PARAMETRO	VALOR
Biodisponibilidad (%)	52 ± 17
$t_{1/2}$ (hrs)	7.2 ± 1.9
Volumen de distribución (L / m^2)	15.2 ± 6.3
Eliminación (min. mL / m^2)	24 ± 8.7

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de etopósido administrado por vía oral en una dosis de 200 mg/m^2 (*Clark y colaboradores 1987*).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

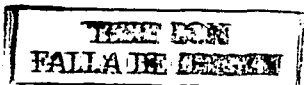
3.3. INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS.

Se ha comprobado un sinergismo del VP-16 con adriamicina, cisplatino y vinblastina y con la 4-hidroxiperoxiciclofosfamida. En el tratamiento de la leucemia linfática aguda se ha observado una acción sinérgica con ciclosporina A, sin embargo se produce una gran toxicidad sobre el SNC y el hígado. Investigaciones recientes indican que el verapamilo aumenta la toxicidad del VP-16 al inhibir su salida de la célula. Se ha demostrado que el tamoxifén inhibe la eliminación de etopósido, provocando toxicidad sobre el SNC (*González y colaboradores 1998; Burgio y colaboradores 1998*).

Se sabe que la absorción de etopósido es errática y por ende presenta baja biodisponibilidad; en un estudio realizado se comprobó que una dieta rica en flavonoides podría aumentar la absorción de etopósido, esto se atribuye a que los flavonoides modulan la actividad de una proteína denominada P-glicoproteína (Pgp) que de forma normal se encuentra presente en el tracto gastrointestinal, y que esta relacionada con la baja absorción de etopósido (*Lo y colaboradores 1999*).

3.4. EFECTOS SECUNDARIOS Y TÓXICOS.

La neutropenia es la toxicidad más frecuente y a la vez la limitante de la dosis, tiene un intervalo de tiempo de 10 y 14 días, con una recuperación entre 16 a 21 días. Se ha observado, que las dosis únicas semanales son más mielotóxicas que las dosis iguales fraccionadas durante la semana. Aparece alopecia leve en un 90% de los casos, que es reversible incluso durante el tratamiento. En un tercio de los enfermos, y sobre todo tras la administración por vía



oral, aparecen náuseas y vómitos. Menos frecuentes son la diarrea y la anorexia. Aunque raros, también se describen: estreñimiento, disfagia, dolor cólico y sabor metálico, así como estomatitis. Se han descrito también, leves disfunciones hepáticas reversibles, consistentes en hiperbilirrubinemia y elevación de las fosfatasas alcalinas. Si las administraciones intravenosas son rápidas, pueden aparecer casos de hipotensión y reacciones de hipersensibilidad, con escalofríos, fiebre, eritema generalizado, prurito, broncoespasmos y taquicardia. Como consecuencia de la rápida lisis de las células neoplásicas, puede aparecer hiperuricemia. Algunas veces los pacientes pueden quejarse de neuropatía periférica, pero es raro y de carácter leve. Se han descrito reacciones anafilácticas en el 1-2% de los casos. Son muy raros el prurito, dolor en el lugar de la inyección y la flebitis (*González y colaboradores 1998; PLM 1999*).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. ESTRADIOL.

4.1. HORMONAS ESTROGÉNICAS:

El ovario es capaz de convertir acetato en colesterol y posteriormente a otros esteroides. La formación de estrógenos por los folículos ováricos está regulada por la hormona foliculoestimulante (FSH). Los efectos de esta gonadotropina están mediados por la formación y acción posterior de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico). Mientras que la unión de este nucleótido cíclico resulta en un incremento de la cadena lateral del colesterol, llevándolo a pregnenolona. Los estrógenos se forman en definitiva con androstenediona o testosterona como precursores inmediatos. De los estrógenos humanos principales, el 17- β estradiol es el más potente y el principal producto secretorio del ovario, se oxida fácilmente a estrona, que a su vez puede hidratarse y pasar a estriol. Estas transformaciones tienen lugar principalmente en el hígado, donde hay interconversión libre entre la estrona y el estriol, y se excretan por la orina como glucuronidos y sulfatos. El etinilestradiol, es un derivado estrogénico de importancia que se usa como anticonceptivo, este estrógeno después de una ingestión oral se absorbe en un 40 a 50 %, pasa a la circulación sistémica con una variación interindividual del 10 al 75 % y el resto es metabolizado por el efecto del primer paso, se hidroliza y se conjuga con el ácido glucurónico a través del citocromo P450 isoforma 3 A 4 (Hardman y colaboradores 1996; Weisberg 1999).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.2. HORMONAS ESTROGÉNICAS Y CÁNCER.

El concepto de hormonodependencia, inicialmente intuitivo, ha abierto una vía nueva de tratamiento para ciertas neoplasias. De este modo, la hormonoterapia se ha constituido como una parte importante del tratamiento estándar de algunos tumores malignos, como el carcinoma de mama, de próstata y endometrio. A finales del siglo pasado se empezaron a practicar ooforectomias a mujeres premenopáusicas con cáncer de mama avanzado, observándose mejorías clínicas en algunas, de igual manera, en 1941 se practicó la orquiectomía para tratar el cáncer de próstata dando resultados en un porcentaje elevado (*González y colaboradores 1998*).

Evidencias, tanto experimentales como clínicas han demostrado que determinadas hormonas desempeñan un papel importante en la inducción de la proliferación de algunas neoplasias, tras su unión con un receptor citoplasmático. La hormonoterapia, actúa interfiriendo esta acción inductora del crecimiento tumoral. También, existen los tratamientos hormonales farmacológicos, que consisten en la administración de fármacos (hormonas exógenas) que modifican la homeostasis hormonal del tumor y así inhiben su crecimiento, este tipo de tratamiento puede ser a su vez, aditivos (estrógenos, andrógenos, progestágenos, corticosteroides), competitivos (antiestrógenos, antiandrógenos, antiprostágenos) e inhibidores (análogos de la LHRH, inhibidores de la aromatasas como la aminoglutetimida y los inhibidores de la androgénesis como el ketoconazol) (*González y colaboradores 1998*).

ESTE CON
FALLA DE ORIGEN

5. CROMATOGRFÍA.

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación, en la que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una estacionaria, de gran desarrollo superficial, y otra móvil, que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria. Cuando se introduce en el sistema una mezcla de sustancias, se genera una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, generalmente de distinta magnitud para cada componente de la mezcla, por lo que cada uno de ellos se desplazará con diferente velocidad a lo largo del sistema (Miller 1988).

5.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

Existen diferentes técnicas cromatográficas que se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y del tipo de fase estacionaria. En el Figura 1, se muestra la clasificación simplificada de diferentes técnicas cromatográficas, de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y la estacionaria.

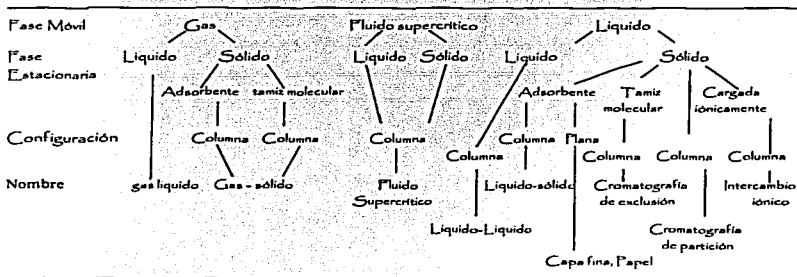


Figura 1. clasificación de las diferentes técnicas cromatográficas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (high performance liquid chromatography, HPLC) no está limitada por la volatilidad o por la estabilidad térmica de la muestra, es capaz de separar compuestos iónicos, sustancias polímeras y una gran variedad de productos polifuncionales de alto peso molecular. La separación cromatográfica en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre los compuestos de la muestra, la fase móvil y estacionaria. Como ya se mencionó anteriormente la cromatografía de líquidos consta de una fase estacionaria (contenida en la columna) y una fase móvil, esta última es suministrada a la columna mediante un sistema de bombeo, capaz de trabajar en un amplio intervalo de presiones y flujos. La introducción de la muestra se realiza por medio de un simple inyector de muestras líquidas. Se utilizan sistemas de válvulas para situar la muestra en el flujo de la fase móvil, justo en la cabeza de la columna de separación. Si es posible, se disuelven las muestras en una porción de la fase móvil para eliminar el innecesario pico del disolvente. La columna cromatográfica consiste en un tubo recto de pared gruesa encamisado interiormente con vidrio o tubo de acero inoxidable, para resistir las altas presiones y la acción química de la fase móvil. La mayoría de las separaciones en HPLC se realiza en columnas con diámetro interior de 4 a 5 mm y longitudes que oscilan entre 10 y 30 cm. La fase estacionaria se retiene normalmente en el interior de la columna insertando discos de acero inoxidable poroso en sus extremos. Entre las distintas variedades de relleno se pueden citar las sílices para cromatografía de adsorción, las fases enlazadas para cromatografía líquido-líquido, los grupos funcionales de intercambio iónico enlazados al soporte estacionario para cromatografía de intercambio iónico, los geles de porosidad específica para cromatografía de exclusión, o cualquier otro relleno exclusivo para un método de separación en particular. La columna puede

ser calentada en el interior de un horno. El detector, conectado a la salida de la columna, se selecciona en base a la sustancia que se quiere analizar (Miller 1988; Scott 1994; Zinder 1979).

En la figura 2, se pueden ver el diagrama de un equipo HPLC, el equipo consta de un controlador, una bomba, un inyector, un detector, la fase móvil (reservorio), la fase estacionaria (contenida en la columna) y el equipo puede o no estar conectado a una computadora, el equipo también puede tener un horno por si es necesario mantener la columna a cierta temperatura.

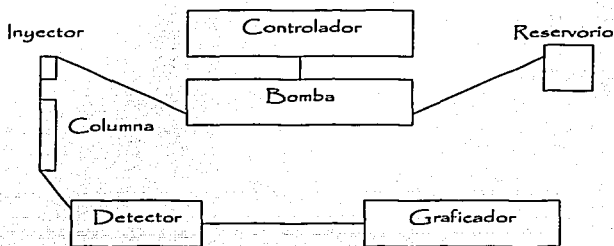


Figura 2. Esquema de los componentes del equipo HPLC

5.3. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA.

Las reacciones electroquímicas, como las reacciones químicas de oxidación - reducción, son reacciones de intercambio de electrones, producidas en la interfase de disolución. En efecto una reacción química redox o de intercambio de electrones es la que se produce entre un reductor de un sistema y un oxidante de otro en el seno de una disolución dando lugar al equilibrio. Una reacción

química de oxidación-reducción se produce mediante el contacto de un oxidante y un reductor de diferentes sistemas, siempre que la termodinámica y la cinética de los mismos sean favorables para la reacción.

En la Figura 3, se muestran los componentes necesarios para llevar a cabo una reacción de electrólisis (Sánchez 1981).

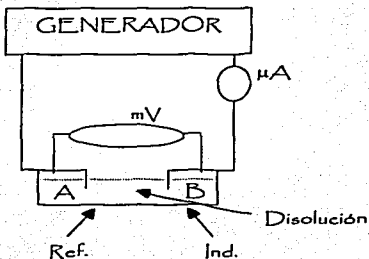


Figura 3. Montaje simplificado en el proceso de electrólisis (Sánchez, 1981).

Los componentes son:

- 1.- La celda de electrólisis con la disolución a electrolizar.
- 2.- Los electrodos.
- 3.- Aparatos de medida: milivoltímetros, microamperímetros, etc.
- 4.- Un generador eléctrico, que constituye la fuente de intensidad o de tensión necesaria para la realización de la electrólisis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. VALIDACIÓN.

Es la evidencia documentada mediante la cual se asegura que un proceso o método cumple eficientemente el objetivo para el que fue creado (*USP 23 1995, Gonigle 1998, Taylor 1986, CIPAM 1990*).

6.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Es el proceso mediante el cual se asegura en forma documentada que un método analítico cumple con el fin para el que fue creado. La validación de un método analítico debe cumplir con los parámetros que a continuación se describen.

6.1.1. LINEALIDAD.

Es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos o los que se obtienen por una transformación matemática son proporcionales a la cantidad de sustancia.

6.1.2. PRECISIÓN.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales y se divide en:

- a) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizada bajo las mismas condiciones.
- b) Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizada bajo condiciones diferentes.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

6.1.3. EXACTITUD.

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

6.1.4. ESPECIFICIDAD.

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés.

6.1.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

6.1.6. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Es la mínima cantidad de sustancia que puede ser cuantificada con precisión y exactitud bajo las condiciones establecidas.

6.1.7. LIMITE DE DETECCIÓN.

Es la mínima cantidad de sustancia que puede ser detectada (y no necesariamente cuantificada) bajo las condiciones establecidas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. ANTECEDENTES

Se ha reportado, que las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas, administradas como terapia de reemplazo disminuyen cuando se administran en combinación con agentes antibióticos; el mecanismo se ha atribuido principalmente a una competencia por la misma vía metabólica del citocromo P450 isoforma 3 A 4 (CYP 3 A 4). En mujeres embarazadas (6 de cada 18) que toman ampicilina por tres días, la concentración de estradiol urinario decrece en más de un 35% (*González y colaboradores 1998*). Estudios en animales indican que la concentración sanguínea de etinilestradiol disminuye significativamente por la influencia de la ampicilina, neomicina y tetraciclina (*Weisberg, 1999*). Por el contrario el cotrimoxazole (trimetoprin-sulfametoxazol) produce un aumento significativo en la concentración plasmática de etinilestradiol, por inhibición de la oxidación del estrógeno (*Weisberg, 1999*).

También, se ha demostrado una interacción entre anticonvulsivantes y anticonceptivos orales, por inducción de las enzimas hepáticas y alteración en la unión a proteínas plasmáticas, la mayoría de los anticonvulsivantes se elimina por vía metabólica, reacciones catalizadas por el citocromo y uridina difosfato glucotransferasa. Estos medicamentos inducen la isoenzima hepática (CYP 3 A 4) acelerando la hidroxilación del estrógeno a metabolitos inactivos; esto causa disminución en la concentración plasmática de los anticonceptivos orales. Así por ejemplo, en un estudio realizado a 31 mujeres caucásicas de 20-27 años a las cuales se les administró felbamate (anticonvulsivante de segunda generación que se metaboliza por CYP 3 A 4) por vía oral, bajo la influencia de

anticonceptivos orales (etinilestradiol /gestodene), se demostraron cambios en las concentraciones plasmáticas y área bajo la curva de gestadone en un -16% y -42% respectivamente, también para el etinilestradiol se obtuvieron valores inferiores en AUC (-30%) (Wilbur y colaboradores 2000).

En otro estudio realizado en mujeres de 19-26 años a las que se les administró oxcarbazepina, que se metaboliza por CYP 3 A 4, en combinación con anticonceptivos orales (etinilestradiol y levonorgestrel) se observó que no hubo diferencia significativa en concentración de estos últimos, pero si en la biodisponibilidad, la cual disminuye en un 32% y 48% respectivamente. También se evaluaron 12 mujeres de 20 a 39 años a las cuales se les administró topiramato junto con anticonceptivos orales (etinilestradiol y norentindrone) se observaron cambios significativos en la eliminación del norentindrone la cual aumenta en un 20% y la concentración en plasma del etinilestradiol disminuye en un 18-25% (Wilbur y colaboradores 2000).

Por otro lado, recientemente se ha descrito la participación de la P-glicoproteína (Pgp) en las interacciones fármaco-fármaco y se ha propuesto que ésta puede modificar la biodisponibilidad en una gran cantidad de fármacos que se metabolizan por CYP 3 A 4, como antineoplásicos, hormonas, antibióticos etc. (K Yu D; 1999, Lo YL, 1999). La Pgp es una proteína que se encuentra distribuida ampliamente tanto en tejidos normales (gastrointestinal, renal, hepático y sistema nervioso central) como en células tumorales. La función principal que desempeña esta proteína en la excreción de xenobióticos (Tanigawara Y; 2000, Burgio y colaboradores; 1998).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que algunos fármacos como los agentes anticonvulsivantes y antibióticos presentan interacción farmacocinética cuando se administran en combinación con anticonceptivos orales; estas interacciones se deben principalmente a una competencia por la misma vía metabólica (citocromo P450 del isoforma 3 A 4).

También, se ha observado que la Pgp (P-glicoproteína involucrada en la detoxificación de las células) puede interaccionar con el etopósido y las hormonas estrogénicas modificando su absorción, distribución y eliminación. Sin embargo, se desconoce si la administración sistémica de agentes antineoplásicos y hormonas estrogénicas pueden presentar interacción farmacocinética.

**TESE COM
FALLA DE ORIGEN**

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la influencia del 17- β -estradiol en la farmacocinética de etopósido en ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

Implementar y validar un método cromatográfico para determinar etopósido en micro muestras de sangre total.

Determinar la farmacocinética de etopósido en ratas ovariectomizadas después de la administración de 17- β -estradiol.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VI. HIPÓTESIS

Si el etopósido y el 17- β -estradiol se metabolizan a través de la misma vía metabólica del citocromo P450 isoforma 3 A 4, entonces los parámetros farmacocinéticos del etopósido determinados a partir de una administración oral en ratas ovariectomizadas se verán alterados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VII. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

EQUIPO.

HPLC marca Waters, con detector electroquímico marca BAS.

Millipore Simplicity 185.

Centrífuga marca HETTICH ZENTRIFUGUEN Universal 32.

Balanza SCIENTECH SA-210.

Bomba de vacío GAST mod. DOA-PI04-AA.

Potenciómetro CORNING pHmeter 430.

Refrigerador REVC0 mod. REF 1617A14.

Baño de agua.

REACTIVOS.

Etopósido Lemery.

17-β Estradiol Sigma Lot. 71K1101.

Agua biodestilada Técnica Química Lot. 113.

Metanol grado HPLC EM Science Lot. MX0488-1.

Acetonitrilo grado HPLC EM Science Lot. AX0142-1.

Acetato de sodio JT BAKER Lot. GO1456.

Cloruro de Metileno EM Science Lot. DX0831-1.

Éter etílico Reactivos y productos químicos finos Lot. 4419-C.

Ácido acético JT BAKER Lot. K10480.

Hidróxido de sodio JT BAKER T27C52.

2-acetaminofenol SIGMA.

Nitrógeno gaseoso AGA UNO 1066.

Heparina SIGMA Lot. 120K1138.

Ketamina Sector salud Lot 2A54.

Xilacina Bayer Lot AE7222.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Yodo al 5%.

Soluciones amortiguadoras marca PGC SCIENTIFICS.

pH 10 Lot. 3008.

pH 7 Lot. 1049.

pH 4 Lot. 1069.

MATERIAL.

Material para disección.

Jaula.

Tabla de disección.

Cánula de polietileno calibre PE90 y PE10.

Jeringa de insulina.

Guantes.

Gasas.

Cinta adhesiva.

Lámpara.

Cubre bocas.

Cofia.

Bata.

Cronómetro.

Bitácora.

Papel destraza.

Tubos eppendorf de 1.5 mL.

Micropipetas de 100, 200, 25 y 1000 μ L.

Espátula.

Matraz ErlenMeyer.

Matraz Kitazato.

Filtro para fase móvil.

Papel filtro de 0.45 micras.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Matraz aforado de 5, 10, 50, 100 mL.

Pipetas graduadas de 5 mL.

Vaso de precipitados.

Termómetro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. METODOLOGÍA

1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

En la primera parte del estudio, se implementó un método por HPLC para cuantificar etopósido en 100 μ L de sangre total de rata y posteriormente el método fue validado.

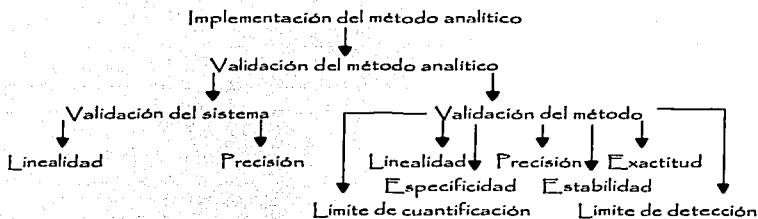
En la segunda parte, se trabajó con ratas hembras Sprague - Dawley con un peso de 200-300 g, de 8 a 10 semanas.

A las 12 ratas, se les realizó una ovariectomía bilateral, y se dividieron en 2 grupos ($n = 6$). Al grupo 1 se le administró una dosis diaria de 17- β -estradiol (10 μ g/kg de peso) disuelto en aceite vegetal por vía subcutánea durante 7 días. El grupo 2 se utilizó como control y solo se le administró el vehículo (aceite vegetal), bajo las mismas condiciones que el grupo tratado. Después de transcurrido este tiempo se procedió a realizar la farmacocinética de etopósido administrado por vía oral a una dosis de 20 mg/kg de peso.

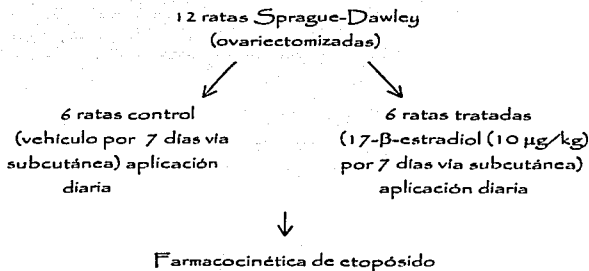
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. DIAGRAMA DE FLUJO.

A. Implementación y validación del método analítico.

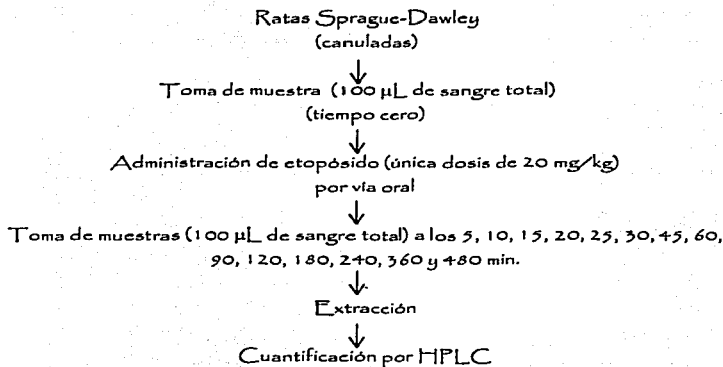


B. Estudio de la interacción farmacocinéticas de etopósido en ratas tratadas y no tratadas con 17- β -estradiol.

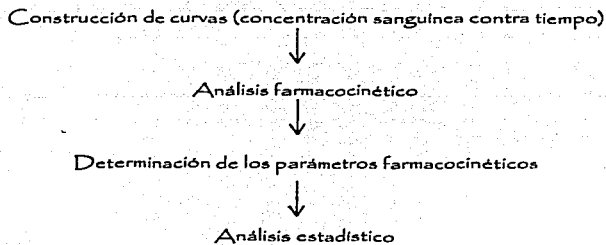


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C. Farmacocinética de etopósido.



D. Análisis de resultados.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. PROCEDIMIENTOS GENERALES.

Anestesia.

Para el procedimiento de ovariectomía, se aplica una dosis i.m. de una mezcla de ketamina (77.5 mg/kg de peso) y xilacina (12.5 mg/kg de peso).

Para la canulación de la arteria caudal, con el fin de obtener muestras de sangre, las ratas se anestesiaron con éter etílico, lo necesario para que se mantuvieran anestesiadas.

Procedimiento de ovariectomía.

Bajo condiciones de anestesia la rata fue rasurada en la parte anterior bilateralmente y se aplicó solución de yodo al 5%. Se expuso el aparato reproductor, se ligó el oviducto y se disecaron las venas y arterias que se conectan al ovario. Posteriormente se retiró el ovario completo y finalmente se suturó la piel con puntos simples.

Administración de etopósido.

El alimento se retiró 12 horas antes de administrar el etopósido. Para la administración por vía oral, el fármaco se administró mediante una cánula orogástrica.

Toma de muestras sanguíneas.

El animal se colocó en decúbito dorsal y se canuló la arteria caudal con una cánula de polietileno aproximadamente a 3 cm de la base de la cola con fin de facilitar la toma de muestras sanguíneas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de las concentraciones sanguíneas de etopósido.

Para la obtención de muestras sanguínea de etopósido, la primera muestra se tomó inmediatamente antes de administrar el fármaco y a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 y 480 minutos. El volumen de cada muestra fue de 100 μL de sangre total. El etopósido se determinó con el método desarrollado (objetivo 1 del trabajo). Se explica brevemente a continuación. A las muestras de 100 μL de sangre total se le adicionó 100 μL de 2-acetaminofenol (STD interno) a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las muestras se extrajeron con 1 ml de solución extractora (éter:cloruro de metileno 2:1), la fase orgánica se separó y se transfirió a un tubo cónico de vidrio donde se evaporó hasta sequedad en un baño de agua a 45°C bajo corriente de nitrógeno gaseoso. El residuo seco se reconstituyó en fase móvil y se inyectaron 50 μL al sistema cromatográfico. A partir de las curvas individuales de concentración sanguínea contra tiempo se determinó la concentración máxima (C_{max}), el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima (t_{max}), el área bajo la curva (AUC) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), utilizando el programa Winnolin profesional versión 2.1.

Análisis estadístico.

Para calcular la diferencia estadísticamente significativa de los parámetros farmacocinéticos entre el grupo tratado y el grupo control, se utilizó una prueba t-student. Una p menor o igual a 0.05 se considera estadísticamente significativa. Esto se realizó con ayuda del programa SigmaStat para Windows (versión 2.03).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

IX. RESULTADOS

1. IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

1.1. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO.

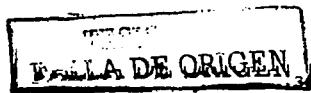
1.1.1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.

A 100 μL de sangre total, se les adicionó 100 μL de STD interno (2-acetaminofenol a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente se agregó 1 mL de solución extractora (éter etílico : cloruro de metileno) en una proporción de 2 a 1, se agitó por un minuto en un vortex y se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Se separó el sobrenadante y se evaporó en un baño maría bajo una corriente de nitrógeno gaseoso a 45°C. El residuo se resuspendió en fase móvil y se inyectaron 50 μL al sistema cromatográfico.

1.1.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Se utilizó un equipo HPLC que consistió en un controlador marca waters, una bomba de liberación de solventes marca waters, un inyector manual rheodyne y un detector electroquímico marca BAS a un AppE de 0.900 v; la fase móvil consistió en una solución de acetato de sodio 75mM pH 4.6 y Acetonitrilo (75:25) a un flujo de 0.8 mL/min. y una columna symetry C18 3.9x150 mm.



1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

1.2.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

En la Tabla 1b, se pueden observar los criterios de aceptación para la validación del método analítico (*Duncan y colaboradores 1986, Fleming y colaboradores 1991, CIPAM 1990*).

	Criterio de aceptación
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0,98$ $m \approx 1$ $b \approx 0$
Precisión del sistema	C. V. < 3 %
Linealidad del método	$r^2 \geq 0,98$ $m \approx 1$ $b \approx 0$
Repetibilidad	C. V. < 11 %
Reproducibilidad	C. V. < 11 %
Exactitud	85 al 115 %
Especificidad	Ninguna otra sustancia debe interferir en la determinación de etopósido y estándar interno
Estabilidad	C. V. < 11 %
Límite de cuantificación	0.2 µg/mL
Límite de detección	0.05 µg/mL

Tabla 1b. Criterios de aceptación para la validación del método analítico.

1.2.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Procedimiento.

Se realizó una curva con concentraciones conocidas de etopósido (0.2, 0.5, 2, 4 y 10 µg/mL), preparadas a partir de una solución stock 100 (µg/mL), cada determinación se realizó por triplicado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados.

En la Figura 4, se muestran los cromatogramas típicos obtenidos al inyectar estándar interno (2 acetaminofenol) (A), etopósido (B) y fase móvil (C), al sistema cromatográfico. Obteniéndose un tiempo de retención para el estándar interno de 2.25 minutos y para el etopósido de 7.25 minutos.

En la Gráfica 1, se muestra la linealidad del sistema, se grafica la relación de alturas del pico de etopósido entre el pico del STD interno contra la concentración de etopósido en un rango de 0.2 a 10 $\mu\text{g/mL}$, cada punto representa el promedio de tres determinaciones, \pm el error estándar (e.e). La Tabla 2 muestra los valores teóricos y los obtenidos experimentalmente del coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). El sistema es lineal ya que los valores obtenidos experimentalmente cumplen con los valores teóricos.

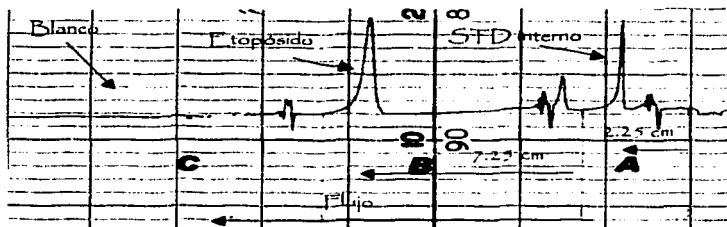
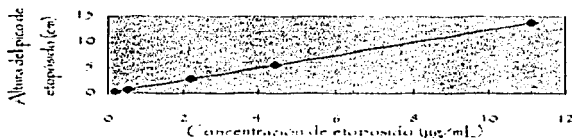


Figura 4. Cromatogramas obtenidos al inyectar 2-acetaminofenol (A), etopósido (B) y fase móvil (C).



Gráfica 1. curva de calibración para el sistema, se grafica la relación de alturas del etopósido/STD interno contra concentraciones crecientes de etopósido. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones ± e.e.e.

Parámetro	Valor teórico	Valor obtenido
r^2	≥ 0.98	0.9997
m	≈ 1	1.2249
b	≈ 0	0.0555

Tabla 2. Valores teóricos y los obtenidos experimentalmente para el coeficiente de determinación, pendiente y ordenada al origen.

1.2.3. PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Procedimiento.

Se realizaron determinaciones independientes de muestras con concentraciones conocidas (los valores obtenidos deben ser semejantes entre si con un coeficiente de variación menor o igual al 3%).

Resultados.

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos para cada determinación individual de etopósido, se utilizaron 5 niveles de concentración y la respuesta se manejo en relación de alturas (altura del pico de etopósido entre la altura del pico del STD interno) en cm.

**TESIS CON
FILA DE ORIGEN**

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	C. V. (%)
10	0
4	1.7699
2	1.0561
0.5	0
0.2	0

Tabla 3. Coeficiente de variación obtenidos para cada nivel de concentración de etopósido con una $n = 3$.

1.2.4. ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.

Procedimiento.

Se prepararon dos muestras, la primera con las sustancias de interés (etopósido y STD interno), la segunda sin las sustancias de interés, el análisis se realizó por triplicado y ninguna otra señal se detectó en el tiempo de retención del etopósido y STD interno.

Resultados.

En la Figura 5, se muestra el cromatograma típico para la mezcla de etopósido y estándar interno (2-acetamonifeno) obtenidos a partir de una extracción en sangre total con un tiempo de retención de 2.25 minutos para el estándar interno y 7.25 minutos para el etopósido (Figura 5A); y un blanco, también obtenido de una extracción de sangre total, sin la adición de sustancias de interés (Figura 5B). Se puede observar que ninguna señal interfiere en la determinación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

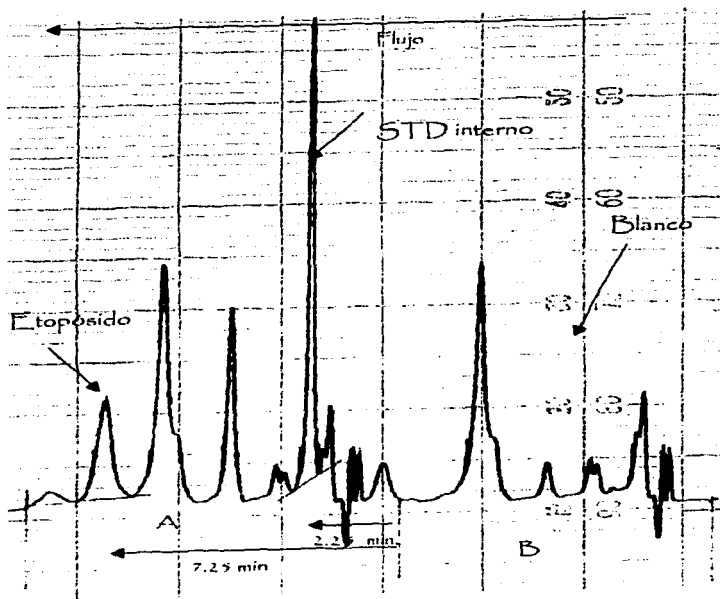


Figura 8. Cromatogramas obtenidos al inyectar una mezcla de etoposido y 2-acetaminofenol extraída a partir de sangre total (Figura 8A) y un blanco sin la adición de sustancias de interés (Figura 8B).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

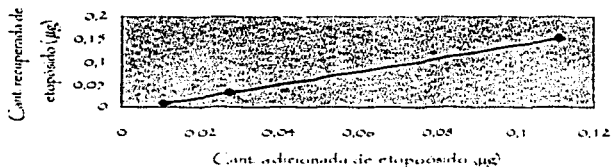
1.2.5. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Procedimiento.

Se determinó construyendo una curva con concentraciones conocidas de etopósido. Utilizando el método a validar, las determinaciones se realizaron por duplicado y se graficó la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada.

Resultados.

En la Gráfica 2, se observa la curva promedio de 2 determinaciones \pm el e.e., se puede observar que la recta pasa por todos los puntos. En la Tabla 4, se pueden observar los valores obtenidos para el coeficiente de determinación, la pendiente y la ordenada al origen.



Gráfica 2. curva promedio (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) $n = 2 \pm$ e. e.

Parámetro	Valor teórico	Valor obtenido
r^2	≥ 0.98	0.9998
m	≈ 1	1.4329
b	≈ 0	-0.0074

Tabla 4. Valores teóricos y los obtenidos experimentalmente para el coeficiente de determinación, la pendiente y la ordenada al origen.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.2.6. PRECISI3N DEL M3TOD0.

1.2.6.1. Repetibilidad.

Procedimiento.

Se realiz3 la determinaci3n de 5 niveles concentraci3n de etop3sido por sextuplicado, bajo las mismas condiciones de operaci3n y con el mismo analista.

Resultados.

En la Tabla 5, se muestran los resultados obtenidos para la repetibilidad del m3todo, se manejaron concentraciones en un intervalo de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ - 10 $\mu\text{g/mL}$ de etop3sido y el coeficiente de variaci3n se obtuvo a partir de la relaci3n de alturas (altura del pico del etop3sido entre altura del STD interno) en cm.

Concentraci3n ($\mu\text{g/mL}$)	C. V. (%)
10	10.6874
4	10.0367
2	3.6195
0.5	9.3438
0.2	5.69442

Tabla 5. Coeficiente de variaci3n obtenidos para cada nivel de concentraci3n de etop3sido, con una $n = 6$.

1.2.6.2. Reproducibilidad.

Procedimiento.

Se realiz3 la determinaci3n por cuadruplicado de una muestra con concentraci3n conocida de etop3sido, bajo diferentes condiciones de operaci3n y con diferente analista.



Resultados.

En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos para la reproducibilidad del método, se manejaron concentraciones teóricas de 2 µg/ml de etopósido y el coeficiente de variación se obtuvo a partir de la relación de alturas (altura del pico del etopósido entre altura del STD interno) en cm.

Concentración (µg/mL)	C. V. (%)
0.2110	0.7882

Tabla 6. Resultados obtenidos para reproducibilidad del método, n = 4

1.2.7. EXACTITUD.

Procedimiento.

Se realizó la determinación de cinco concentraciones de etopósido por sextuplicado, el promedio se consideró como el 100 %. Por último, se calculó el intervalo de exactitud en % para cada concentración de etopósido, a partir del promedio obtenido al inicio.

Resultados.

En la Tabla 7, se muestran los resultados obtenidos para la exactitud del método, manejando un intervalo de concentración de 0.2 – 10 µg/mL.

Concentración (µg/mL)	Exactitud (%)
10	94.9 – 107.6
4	88.9 – 109.0
2	96.8 – 106.0
0.5	85.0 – 103.3
0.2	92.6 – 113.5

Tabla 7. Intervalo de concentración obtenida para las diferentes concentraciones de etopósido con una n = 5.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.8. ESTABILIDAD.

Procedimiento.

Se determinó por comparación de la relación de alturas (altura del pico del etopósido entre altura del pico del STD interno) de cuatro niveles de concentración almacenados a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una semana, contra el promedio de cuatro niveles que se determinaron el mismo día.

Resultados.

En la Tabla 8, se pueden observar los resultados para estabilidad, se compara la relación de alturas en cm de cuatro niveles de concentración sometidos a condiciones de almacenamiento (relación 2) contra el promedio de la relación de otros cuatro niveles de concentración que no están sometidos a dicho almacenamiento (relación 1). En la Gráfica 3, también se observan las curvas (concentración contra relación de alturas) de los niveles de concentración sometidos a estabilidad y el promedio de los no sometidos; Se puede ver que las curvas no presentan variación.

Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Relación 1 (cm)	Relación 2 (cm)	C. V. (%)
10	1.7934	1.9667	6.5153
4	0.7967	0.8252	2.4917
2	0.3841	0.3700	2.6474
0.5	0.0779	0.0708	6.7567
0.2	0.0381	0.0354	5.3326

Tabla 8. Se muestran los resultados del coeficiente de variación para los niveles de concentración sometidos a estabilidad (relación 2) y no sometidos a estabilidad (relación 1).

TRCIS CON
FALLA DE ORIGEN

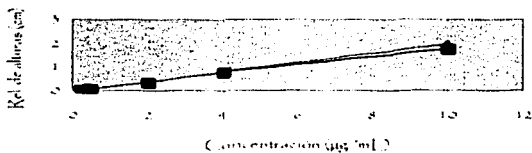


Gráfico 5. Resultados de estabilidad de las concentraciones sometidas a -5°C durante una semana (▲), comparadas con muestras tratadas sin condiciones de almacenamiento (■).

1.2.9. LIMITE DE DETECCIÓN.

Procedimiento.

Se realizaron diluciones a la mitad de una muestra determinada, hasta obtener la mínima cantidad detectable.

Resultados.

La mínima cantidad que se puede detectar es de $0.05 \mu\text{g/mL}$.

1.2.10. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Procedimiento.

Se comprobó si la mínima cantidad detectable es cuantificable con precisión y exactitud. Como no fue así, se incrementaron las concentraciones al doble hasta obtener la mínima cantidad cuantificable con precisión y exactitud.

Resultados.

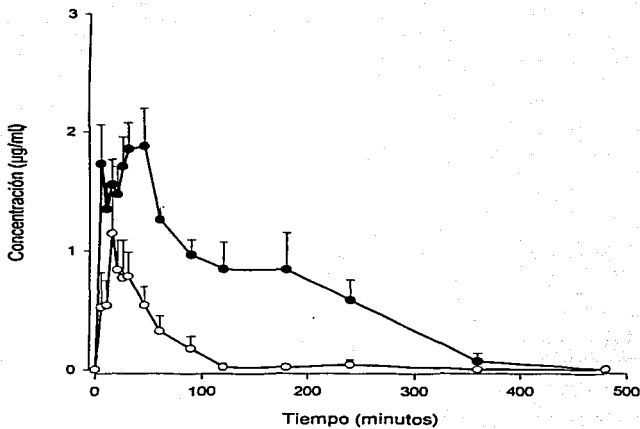
La mínima cantidad cuantificable con precisión y exactitud es de $0.2 \mu\text{g/mL}$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. FARMACOCINÉTICA DE ETOPÓSIDO DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 17- β -ESTRADIOL.

En la Gráfica 4, se muestran el promedio las curvas de concentración sanguínea de etopósido contra tiempo. Se puede observar que las concentraciones circulantes de etopósido del grupo tratado previamente con 17- β -Estradiol disminuyen con respecto al grupo control. En la Tabla 9, se observan los parámetros farmacocinéticos (área bajo la curva (AUC), tiempo máximo (t_{max}), concentración máxima (C_{max}) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$)) obtenidos a partir de la gráfica 4 para el grupo control y el grupo tratado. De acuerdo con estos valores el AUC, C_{max} y $t_{1/2}$ disminuyen significativamente en el grupo tratado con 17- β -estradiol, y no hubo cambios en t_{max} .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 4. Concentraciones sanguíneas de etopósido vs tiempo después de una administración p.o. de 20 mg/kg en ratas ovariectomizadas control (●) y ratas sometidas a tratamiento con 17-β-estradiol (○). Cada punto representa la media ± e.e. de 6 animales.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Parámetro	Grupo control	Grupo tratado	P
AUC (µg·min/mL)	141 ± 22	28 ± 4 *	P < 0.001
t _{max} (min)	29 ± 6	23 ± 5	P = 0.44
C _{max} (µg/mL)	1.109 ± 0.1	0.6 ± 0.1 *	P = 0.05
t _{1/2} (min)	89 ± 17	21 ± 5 *	P = 0.004

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de etopósido en ratas sometidas a un tratamiento previo de 7 días con 17-β-estradiol y en ratas control.

* Diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con respecto al grupo control; los datos representan el promedio ± e.e. de 6 animales después de la administración p.o. de etopósido.

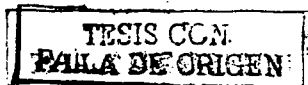
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El método obtenido es lineal en un intervalo de concentración de 0.2 - 10 $\mu\text{g/ml}$. Este rango se seleccionó debido a que todos los valores de etopósido obtenidos experimentalmente están dentro de dicho intervalo. El método también es específico ya que no hay otra sustancia que interfiera en la determinación de etopósido y estándar interno; es decir si comparamos el blanco con una muestra, las dos extraídas y analizadas bajo las mismas condiciones, observaremos que no se detecta en el blanco de reactivos ninguna otra señal que interfiera con el tiempo de retención del etopósido (7.25 minutos) ni con el estándar interno (2.25 minutos).

Con respecto a la precisión observamos que el método es reproducible ya que el coeficiente de variación fue de 0.7882 %, cuando el procedimiento se realiza por diferentes analistas y en diferentes días. Sin embargo la concordancia entre determinaciones (repetibilidad) es de 5.6944 - 10.6874 %, pero, si tomamos como referencia los valores obtenidos por otros investigadores que manejan muestras de fluidos biológicos como plasma, sangre u orina veremos que su límite es hasta un 15 % y con base en esto podemos considerar que estos valores están dentro del rango (*Duncan y colaboradores 1987, Fleming y colaboradores 1997*). La exactitud del método es variable pero de igual manera si tomamos en cuenta los métodos ya reportados esta también está dentro del rango (15 %) (*Duncan y colaboradores 1987, Fleming y colaboradores 1997*).

Con lo que respecta a la estabilidad se puede decir que la curva sometida a condiciones de almacenamiento, no varía en comparación con las analizadas el mismo día (*Gráfica 3, pag. 46*), por lo tanto las muestras son estables mantenidas a - 5°C al menos durante una semana; esta



temperatura y este intervalo de tiempo se tomó por fines prácticos, ya que es un periodo adecuado para realizar el procesamiento de muestras.

El límite de sensibilidad del método es de $0.2 \mu\text{g/mL}$ de etopósido en muestras de sangre total, cabe considerar que si las muestras fueran soluciones acuosas u orgánicas, sin implicar extracciones en sangre total o plasma, la sensibilidad aumenta considerablemente, igual que todos los demás parámetros (exactitud, precisión, linealidad, etc.), y por último el límite de detección es de $0.05 \mu\text{g/mL}$.

También, es importante considerar que las inyecciones se realizaron manualmente, en la cuantificación se tomaron alturas de los picos en vez de áreas bajo la curva; ya que no se contaba con un método adecuado para calcular esta. Además de que el detector electroquímico es muy sensible, y presenta variaciones si hay cambios de temperatura en el medio ambiente, voltaje o por movimientos. Todo lo anterior interfiere en la determinación de etopósido y es por esto que es importante cuantificar el etopósido con la ayuda de una curva estándar realizada por duplicado y bajo las mismas condiciones de operación.

En resumen, consideramos que el método es estable, específico, y reproducible para determinar etopósido en $100 \mu\text{L}$ de sangre total, esto nos permite realizar la farmacocinética de etopósido en un solo animal de experimentación, lo que se traduce en una menor variabilidad de datos.

Con lo que respecta a la interacción entre el etopósido y el $17\text{-}\beta$ Estradiol podemos observar que los resultados obtenidos de los parámetros farmacocinéticos de etopósido como C_{max} , AUC y $t_{1/2}$, disminuyen cuando hay un tratamiento previo con $17\text{-}\beta$ -Estradiol. El AUC nos indica de la cantidad de fármaco biodisponible, ya sea para ejercer su efecto farmacológico, distribuirse o metabolizarse. El $t_{1/2}$ nos indica el tiempo en el cual se ha eliminado el 50 % de fármaco y con esto una idea general de la eliminación. Y la C_{max} , es importante para saber si se alcanza un nivel terapéutico.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Por lo tanto, los resultados obtenidos los consideramos importantes ya que es posible que el etopósido no alcance una concentración terapéutica, además de que permanece menos tiempo en el organismo para ejercer su efecto farmacológico.

Estos resultados pueden ser explicados por la competencia por la misma vía metabólica ya que se ha reportado que al administrar concomitantemente estrógenos con otros fármacos (antimicrobianos y anticonvulsivantes) que se metabolizan por la misma vía (citocromo P450 isoforma 3 A 4 (CYP 3A4)) se sugiere competencia y por lo tanto cambios farmacocinéticos en alguno de los fármacos participantes (*Weisberg E y colaboradores 1999, Wilbur K y colaboradores 2000*). En otros estudios se ha demostrado, que algunos anticonceptivos orales como el etinil estradiol y la gestadona pueden modular la actividad del citocromo CYP 3A4 y con esto modificar la eliminación de la nifedipina y el midozolan (*Balogh A. y colaboradores 1998, Palovaara S. y colaboradores 2000*).

También se ha reportado que el estradiol puede activar la expresión de otras isoformas del citocromo, como por ejemplo el CYP 3 A 9; ya que en estudios realizados en microsomas hepáticos de ratas hembras se demostró que esta isoforma de citocromo esta expresada 10 veces mas que en machos (*Wang H. y colaboradores 1997*)

En otro trabajo se ha reportado que el etinil estradiol influye en el metabolismo de la ciclosporina A (fármaco utilizado en transplantes de órganos); es este estudio se trabajo con ratas hembras Sprague-Dawley, a las cuales se les trato con etinil estradiol por 5 días, después se evaluó el metabolismo de la ciclosporina A en microsomas hepáticos por formación de metabolitos primarios (AM1, AM9, AM4N) y uno secundario (AM1c). Los resultados indican que el etinil estradiol aumenta la formación de metabolitos de ciclosporina A. Se sabe que la ciclosporina A, se metaboliza principalmente por citocromo P450 isoforma 3 A 4; sin embargo para comprobar si el etinil estradiol activa otras isoformas de

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

citocromo, se realizó un ensayo de RT-PCR para identificar a las isoformas del citocromo (CYP 3 A) que se expresan en presencia de etinil estradiol, los resultados indicaron que el etinil estradiol aumenta la expresión de la isoforma 3 A 9 que es la responsable de los metabolitos AM9 y AM1c (Jäger W. y colaboradores 1999). Por lo tanto, sabemos que el etinil estradiol aumenta la expresión de otras isoformas del citocromo, como por ejemplo la 3 A 9, y es por esto que proponemos que el etopósido además de estar siendo metabolizado por el CYP 3 A 4, también podría participar la isoforma CYP 3 A 9.

Por otro lado la Pgp (P-glicoproteína) que esta ligada al fenómeno conocido como MDR (resistencia a drogas) en quimioterapia, esta proteína previene la acumulación intracelular y el efecto citotóxico de fármacos anticancerosos ya que activamente los remueve del interior al exterior de la célula, sin que alcancen su blanco intracelular; esta proteína esta presente sobre la superficie luminal de los hepatocitos, en la mucosa del intestino delgado y grueso, en el tubulo proximal renal, entre otros. También se ha reportado que esta proteína puede ser inhibida por el 17- β estradiol; este estrógeno activa al enzima Pgp ATPasa y con esto actua indirectamente sobre la Pgp (Subrahmanyeswara R. U. y colaboradores 1994). Con base en esto sugerimos que si la proteína Pgp se inhibe por el 17- β Estadiol, se daría lugar a que el etopósido permaneciera mas tiempo en los hepatocitos y así estuviera en contacto con el citocromo para que sea metabolizado.

También, es posible que el 17- β Estradiol modifique condiciones gástricas (pH, secreción de moco, motilidad), así como la difusión pasiva, el transporte activo y el facilitado por acarreadores. El pH participa en la absorción de fármacos, se sabe que el fármaco disociado o ionizado no se absorbe o lo hace en una pequeña cantidad; también la secreción de moco y la motilidad gástrica pueden influir en la absorción, por lo tanto si aumenta la motilidad el fármaco recorre más rápido el sistema gastrointestinal y a medida que aumenta la secreción de moco hay menos

contacto del fármaco sobre las membranas. El transporte activo y el facilitado por acarreadores son mecanismos por los cuales los fármacos poco liposolubles penetran las membranas, aquí el estrógeno pudiera influir en la unión fármaco acarreador o actuar sobre la bomba de sodio y potasio, también podría modificar la presión osmótica en la difusión pasiva, y con todo esto modificar la absorción del fármaco.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

XI. CONCLUSIONES

- 1.- Se implementó y validó un método cromatográfico para cuantificar etopósido en 100 μL de sangre total.
- 2.- El método es lineal en un intervalo de concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$ - 10 $\mu\text{g/mL}$, es específico y estable almacenado a una temperatura de -5°C durante una semana.
- 3.- Con el método se puede realizar una farmacocinética completa en una sola rata y con esto disminuir la variabilidad.
- 4.- La cuantificación de etopósido se debe realizar con ayuda de una curva estándar y bajo las mismas condiciones de operación.
- 5.- Los parámetros farmacocinéticos (AUC, $t_{1/2}$ y C_{max}) de etopósido en ratas Sprague-Dawley se ven afectados bajo la influencia de 17- β Estradiol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Allen, L., M., Marks C., Crearen P., J., "4'-demethyl-epipodophyllic acid-9(4,6, o-ethylidene-beta-D-glucopyranoside), the major urinary metabolite of VP16-213 in man". Proceedings of the American Association of Cancer Research. 17: 6, (1976).
- 2.- Balogh A., Gessinger S., Svarovsky U., y colaboradores., "Can oral contraceptives steroids influence the elimination of nifedipine and its primary pyridine metabolite in humans?" Eur J Clin Pharmacol 1998 Nov-Dec; 54 (9-10): 729-34.
- 3.- Burgio E. D., Gosland P. M., Mcnamara J. P. "Effects of P-glycoprotein Modulators on Etoposide Elimination and Central Nervous System Distribution" The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 287: 911-917, (1998).
- 4.- Chabner A. B., Collins M. J., Cancer Chemotherapy: Principles y Practice Ed. J. B. Lippincott Company EUA (1990).
- 5.- Clark, L. Slevin M. "The Clinical Pharmacology of Etoposide and Teniposide" Clinical Pharmacokinetics 12: 223-252 (1987).
- 6.- Clarysse A., Kenis Y., Mathe G., Cancer Chemotherapy Ed. Springer-Verlag Alemania (1976).

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

- 7.- Cortinas de Nava C., Espinosa A. J., Cancer y Ambiente, bases epidemiológicas para su investigación y control. Centro panamericano de ecología y salud Programa de salud ambiental.
- 8.- Duncan G. F., Farnen K. H., Movahhed S. H., Pittman K. A., "High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Etoposide in Plasma Using Electrochemical Detection" Journal of Chromatography 380; 357-365 (1986).
- 9.- Fleming A. R., Stewart F. C. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Etoposide in Plasma" Journal of Liquid Chromatography 14 (7); 1275-1283 (1991).
- 10.- Girdwood H. R., Petrie C. J. Terapéutica Médica Ed. El Manual Moderno S. A. de C. V. México D. F. (1992).
- 11.- Gonigle M. C. "Validation of Analytical Methods" Chemical Institute of Canada; 18: 211-215 (1998).
- 12.- González Baron M., Ordóñez A., Feliú J., Zamora P., Espinosa E., De Castro J., Oncología Clínica Fundamentos y Patología General Segunda Edición Ed. McGraw-Hill Interamericana (1998).
- 13.- Goth A., Vesell S. E. Farmacología Médica Principios y Conceptos Ed. Doyma España (1984).

TESIS CLINICA
FALLA DE ORIGEN

- 14.- Hardman G. J., Limbrid E. L Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics Ninth Edition International Edition McGraw-Hill EUA (1996)
- 15.- Henwood M. J., Brogden N. R. "Etoposide a Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Combination Chemotherapy of Cancer" *Drugs* 39 (3); 438-490 (1990).
- 16.- Jäger W., Correia A. M., Bornheim M.L. "Ethinylestradiol-Mediated Induction of Hepatic CYP3A9 in Female Rats Implication for Cyclosporine Metabolism" *Drug Metabolism and Disposition* 27 (12); 1505-1511 (1999).
- 17.- Lo YL, Huang JD. "Comparison of effects of natural or artificial rodent diet on etoposide absorption in rats" *In vivo* 13 (1); 51-55 (1999).
- 18.- Lunn G., Schmuft N., HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis Ed. A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons EUA (1997).
- 19.- Miller M. J., Chromatography: Concepts and Contrasts Ed. A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons EUA (1988).

TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 20.- Palovaara S, kivisto kt, y colaboradores., "Effect of an oral contraceptives preparation containing ethinylestradiol and gertadione on cyp3A4 activity as measured by midazolam 1'-hidroxilation. J Clin Pharmacol 2000 Oct; 50 (4): 333-7.
- 21.- Pardo M. F., Anatomía Patología General y Especial Ed. Científica Médica España (1988).
- 22.- Sánchez B. P., Química Electroanalítica Fundamentos y Aplicaciones Ed. Alhambra España (1981).
- 23.- Schinkel AH., "Pharmacological Insights from P-glycoprotein Knockout Mice" Int J Clin Pharmacol Ther 36: 9-13 (1998).
- 24.- Scott P. W. R., Liquid Chromathography for the Analyst Ed. Marcel Dekker, INC EUA (1994).
- 25.- Secretaria de Salubridad y Asistencia, Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Manual de Validación CIPAM, México 1990.
- 26.- Snyder R. L., Kirkland J. J. Introduction to Modern Liquid Cromatography Second Edition Ed. A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons EUA (1979).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ESTA TESIS
DE LA R...

- 27.- Sinkule J., Hutson P., Hayes FA., Etcubanas E., Evans W., "Pharmacokinetics of etoposide (VP-16) in Children and Adolescents With Refractory Solid Tumors" *Cancer Research* 44: 3109-3113 (1984).
- 28.- Subrahmanyeswara R. U., Fine R. L., Scarborough G. A., "Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein" *Biochem Pharmacol* 19;48 (2): 287-292 (1994).
- 29.- Tanigawara Y., "Role of P-Glycoprotein in Drug Disposition" *Therapeutic Drug Monitoring* 22; 137-140 (2000).
- 30.- Taylor J. "Validation of Analytical Methods" *Analytical Chemistry* 1983; 55 (6).
- 31.- Wang H., Strobel H. W. "Regulation of CYP 3-A 9 Gene Expression by Estrogen and Catalytic Studies Using Cytochrome P450 3 A 4 Expressed in *Escherichia coli*" *Arch. Biochem Biophys* 344; 365-372 (1997).
- 32.- Weisberg E. "Interaction Between Oral Contraceptives and Antifungals/ Antibacterials" *Clin. Pharmacokinetics* 36 (5); 309- 313 (1999).
- 33.- Wilbur K., Ensom H. H. M. "Pharmacokinetic Drug Interactions Between Oral Contraceptives and Second-Generation Anticonvulsants". *Clin. Pharmacokinetics* 38 (4); 355-365 (2000).

- 34.- Yost R., W., Ettre L., S., Practical Liquid Chromatography An Introduction Perkin-Elmer EUA (1980).
- 35.- Yu K. Dale "The Contribution of P-glycoprotein to Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions" J Clin Pharmacol 39: 1203-1211 (1999).
- 36.- Zhang Y., Hsieh Y., Izumi T., Lin T. E., Benet Z. L., "Effects of Ketoconazole on the Intestinal Metabolism, Transport and Oral Bioavailability of K02, a Novel Vinylsulfone Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitor and a P450 3A, P-Glycoprotein Dual Substrate, in Male Sprague-Dawley Rats" The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 287; 246-253 (1998).
- 37.- USP 23 NF 18 United States Pharmacopeial Convention INC EUA (1995).
- 38.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 45 Ediciones PLM México (1999).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**