



00563

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FARMACOCINÉTICA DE LA LIBERACIÓN Y  
BIODISPONIBILIDAD DE FORMULACIONES DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL Y  
ESTRADIOL-COLESTEROL EN DIFERENTES PROPORCIONES EN CONEJOS MACHOS  
NUEVA ZELANDA.**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.B.P. ERNESTO ORTEGA ESCAMILLA

TUTOR: M en F. MA TERESA FRANCISCO DOCE.



AÑO:2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

A Dios, a mi familia, a todos mis compañeros de CAFET S.A. involucrados con el proyecto microesferas, con especial agradecimiento al Sr. Jean Claude Savoir, principal promotor de este proyecto.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del CENTRO A.F. DE ESTUDIOS TECNOLÓGICOS S.A. ubicado en la calle de Nicolás San Juan 1024 Col . Del Valle México D.F. C.P. 03100.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ERNESTO ORTEGA  
ESCAMILLA

FECHA: Mar 26, 2004

FIRMA: Ernesto Ortega E.

## INDICE GENERAL

Página

<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	<b>4</b>
<b>CAPITULO 2: GENERALIDADES.</b>	<b>5</b>
<b>2.1 MONOGRAFÍA DE ESTRADIOL</b>	<b>6</b>
<b>2.1.1.DESCRIPCIÓN.</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2. NOMBRES QUÍMICOS.</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3. FORMULA CONDENSADA.</b>	<b>6</b>
<b>2.1.4. FORMULA DESARROLLADA.</b>	<b>6</b>
<b>2.1.5. PESO MOLECULAR.</b>	<b>7</b>
<b>2.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1. DESCRIPCIÓN.</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2. SOLUBILIDAD.</b>	<b>7</b>
<b>2.2.3. SÍNTESIS.</b>	<b>7</b>
<b>2.2.4. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>	<b>9</b>
<b>2.2.4.1.ESPECTRO DE ABSORCIÓN AL ULTRAVIOLETA.</b>	<b>9</b>
<b>2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.</b>	<b>10</b>
<b>2.3.1. PROPIEDADES FISIOLÓGICAS.</b>	<b>10</b>
<b>2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN.</b>	<b>11</b>
<b>2.3.3. USOS TERAPÉUTICOS.</b>	<b>11</b>
<b>2.3.4. NIVELES FISIOLÓGICOS.</b>	<b>12</b>
<b>2.3.5. REACCIONES ADVERSAS.</b>	<b>12</b>
<b>2.3.6. INTERACCIONES Y CONTRAINDICACIONES.</b>	<b>14</b>
<b>2.4. FARMACOCINÉTICA.</b>	<b>14</b>
<b>2.4.1. ABSORCIÓN.</b>	<b>14</b>
<b>2.4.2. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN.</b>	<b>14</b>
<b>2.4.3. DISTRIBUCIÓN.</b>	<b>14</b>
<b>2.4.4. UNION A PROTEÍNAS.</b>	<b>15</b>
<b>2.4.5. BIOTRANSFORMACIÓN.</b>	<b>15</b>
<b>2.4.6. ELIMINACIÓN.</b>	<b>15</b>
<b>2.5. METODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR ESTRADIOL EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS.</b>	<b>16</b>
<b>2.5.1. INMUNOENSAYOS</b>	<b>16</b>
<b>2.5.2. CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS</b>	<b>17</b>
<b>2.5.3. CROMATOGRAFICA DE GASES</b>	<b>17</b>

	Página
2.6 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA O MODIFICADA.	18
2.7. CARACTERÍSTICAS QUE HACEN ADECUADA A UNA FORMA FARMACÉUTICA DE TIPO PARENTERAL DE FÁRMACOS SOBRE OTRO TIPO DE FORMAS FARMACÉUTICAS.	20
2.8. MECANISMOS DE CONTROL EN LA LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.	21
2.8.1. FORMAS FARMACÉUTICAS CON RECUBRIMIENTO.	21
2.8.2.FORMAS FARMACÉUTICAS POR MATRICES.	22
2.8.3.FORMAS FARMACÉUTICAS EMPLEANDO COLOIDES HIDROFÍLICOS.	23
2.8.4. FORMAS FARMACÉUTICAS EMPLEANDO POLÍMEROS INTERCAMBIADORES DE IONES.	24
2.8.5. FORMAS FARMACÉUTICAS POR EROSIÓN.	25
2.8.6. FORMAS FARMACÉUTICAS POR SISTEMAS OSMÓTICOS.	28
2.8.7. FORMAS FARMACÉUTICAS PARENTERALES TIPO DEPOT.	28
2.9. CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA	29
2.10. ÉSTERES DE ESTRADIOL UTILIZADOS EN DIFERENTES TERAPIAS.	30
2.11. FASES DEL CLIMATERIO.	33
2.11.1. LA PREMENOPAUSIA.	33
2.11.2. EL CLIMATERIO Y LA PERIMENOPAUSIA.	34
2.11.3. MENOPAUSIA Y POSTMENOPAUSIA.	34
2.11.4. TERAPIAS DE REEMPLAZO HORMONAL.	35
 CAPITULO 3: PARTE EXPERIMENTAL	 37
3.1. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL, ESTRADIOL-COLESTEROL	38
3.1.1. REACTIVOS Y EQUIPO.	38
3.1.2. FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS	39
3.1.3. DISEÑO DEL ESTUDIO	39
3.1.4. ASIGNACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS A LOS ANIMALES DE ESTUDIO	40
3.1.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40
3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	42
3.3. MÉTODO DE ANÁLISIS	44
3.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE RIA	46

	Página
<b>3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO ANTES DEL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD</b>	47
3.5.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS NIVELES BASALES DE ESTRADIOL EN UNA MEZCLA DE PLASMAS.	47
3.5.2. LINEALIDAD.	47
3.5.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN	48
3.5.4. ESPECIFICIDAD	49
3.5.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE.	50
3.5.6. LÍMITE DE DETECCIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE.	50
3.5.7. PARALELISMO	51
3.5.8. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO.	51
3.5.9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A CICLOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN.	52
3.5.10. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA SOBRE LA MESA DE TRABAJO.	52
3.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS	52
3.7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	53
<b>CAPITULO 4: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>4. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD.</b>	<b>56</b>
4.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	56
4.1.1. LINEALIDAD.	56
4.1.2. EXACTITUD Y PRECISIÓN.	57
4.1.3. ESPECIFICIDAD.	60
4.1.4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE.	62
4.1.5. LÍMITE DE DETECCIÓN O CONCENTRACIÓN MINIMA DETECTABLE.	63
4.1.6. PARALELISMO.	63
4.1.7. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO.	65
4.1.8. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN.	67
4.1.9. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO.	70
4.2. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD.	73
4.2.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD.	73

	Página
CÁLCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS	74
ANÁLISIS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y ESTRADIOL-COLESTEROL EN DIFERENTES PROPORCIONES RESPECTO A UNA SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL	74
ANÁLISIS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL	76
ANÁLISIS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y ESTRADIOL-COLESTEROL (70:30) Y (80:20).	79
ANÁLISIS DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURAS Y ESTRADIOL-COLESTEROL (40:60) Y (60:40).	81
ANÁLISIS DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURAS Y ESTRADIOL-COLESTEROL 10:90 Y 20:80.	85
ANÁLISIS GLOBAL DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS Y MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL EN LAS DIFERENTES PROPORCIONES.	89
SECCION DE TABLAS DE RESULTADOS Y PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL Y ESTRADIOL-COLESTEROL	96
CAPITULO 5: CONCLUSIONES.	103
BIBLIOGRAFÍA.	105
APÉNDICE 1. FORMULAS PARA EL CÁLCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.	110

INDICE DE TABLAS	Página
TABLA 1. NIVELES DE ESTRADIOL EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA VIDA REPRODUCTIVA	12
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE FORMAS FARMACÉUTICAS DEL TIPO LIBERACIÓN CONTROLADA O MODIFICADA	20
TABLA 3. TRATAMIENTOS HORMONALES A BASE DE ESTRADIOL PARA TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL Y CONTINUACIÓN.	35 Y 36
TABLA 4. PRODUCTOS DE PRUEBA A UTILIZAR EN EL ESTUDIO	39
TABLA 5. ASIGNACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO A LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN	40
TABLA 6. CONCENTRACIONES DE LOS CALIBRADORES DE ESTRADIOL PARA EL MÉTODO DE RADIOINMUNOANÁLISIS ( CURVA PATRÓN)	44
TABLA 7. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PLASMÁTICAS PARA LA VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO POR RIA.	46
TABLA 8. RESULTADOS DE LAS CURVAS PATRÓN PREPARADAS DURANTE LA VALIDACIÓN.	56
TABLA 9. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD DE CURVAS PATRÓN	56
TABLA 10. RESULTADOS DE LA EXACTITUD INTERDIA DE ESTRADIOL	58
TABLA 11. RESULTADOS DE LA EXACTITUD INTRADIA DE ESTRADIOL	58
TABLA 12. RESULTADOS DE LA PRECISION INTERDIA DE ESTRADIOL.	59
TABLA 13. RESULTADOS DE LA PRECISION INTRADIA.	59
TABLA 14. RESULTADOS DE ESPECIFICIDAD.	61
TABLA 15. RESULTADOS DE LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN O CONCENTRACIÓN MINIMA CUANTIFICABLE	62
TABLA 16. RESULTADOS DE PARALELISMO.	64
TABLA 17. RESULTADOS DE ESTABILIDAD A LARGO PLAZO.	65
TABLA 18. RESULTADOS DE ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACION DESCONGELACIÓN.	68
TABLA 19. RESULTADOS DE ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO.	71
TABLA 20. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL	97

	Página
TABLA 21. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, FORMULACIÓN DE ESTRADIOL Y COLESTEROL (10:90) Y (20:80).	98
TABLA 22. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, FORMULACIÓN DE ESTRADIOL Y COLESTEROL (70:30) Y (80:20).	99
TABLA 23. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, FORMULACIÓN DE ESTRADIOL Y COLESTEROL (40:60) Y (60:40).	100
TABLA 24. RESULTADOS GLOBALES DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS MICROESFERAS DE ESTRADIOL, ESTRADIOL-COLESTEROL Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL.	101
TABLA 25. RESULTADOS GLOBALES DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS MICROESFERAS DE ESTRADIOL, ESTRADIOL-COLESTEROL Y SOLUCION OLEOSA DE ESTRADIOL (CONTINUACIÓN).	102

INDICE DE FIGURAS	Página
FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ESTRADIOL	6
FIGURA 2. RUTAS DE BIOSÍNTESIS DEL ESTRADIOL Y ESTRÓGENOS.	8
FIGURA 3. ESPECTRO ULTRAVIOLETA DEL ESTRADIOL.	10
FIGURA 4. GRÁFICA COMPARATIVA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE DOSIFICACIÓN	19
FIGURA 5. FORMAS FARMACÉUTICAS CON RECUBRIMIENTO.	22
FIGURA 6. FORMAS FARMACÉUTICAS POR MATRICES MECANISMO DE LIBERACIÓN	23
FIGURA 7. FORMA FARMACÉUTICA CON COLOIDES HIDROFÍLICOS.	24
FIGURA 8. FORMA FARMACÉUTICA CON INTERCAMBIADORES DE IONES.	25
FIGURA 9. FORMA FARMACÉUTICA POR EROSIÓN.	26
FIGURA 10. FORMA FARMACÉUTICA POR SISTEMAS OSMÓTICOS.	28
FIGURA. 11 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL BENZOATO DE ESTRADIOL	31
FIGURA. 12 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VALERATO DE ESTRADIOL	32
FIGURA. 13 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ESTRADIOL DIPROPIONATO.	32
FIGURA. 14 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL CIPIONATO DE ESTRADIOL	33
FIGURA 15. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 60 pg/mL	65
FIGURA 16. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 300 pg/mL	66
FIGURA 17. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 1080 pg/mL	66
FIGURA 18. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 2160 pg/mL	67
FIGURA 19. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN 60 pg/mL	68
FIGURA 20. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN 300 pg/mL	69
FIGURA 21. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN 1080 pg/mL	69
FIGURA 22. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN 2160 pg/mL	70
FIGURA 23. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 60 pg/mL	71
FIGURA 24. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 300 pg/mL	72

FIGURA 25. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 1080 pg/mL	72
FIGURA 26. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 2160 pg/mL	73
FIGURA No. 27 GRÁFICO PROMEDIO DE COMPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN OLEOSA Y LAS MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL EN LAS DIFERENTES PROPORCIONES PROBADAS DOSIS 5 mg	75
FIGURA No. 28 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL DOSIS 5mg.	76
FIGURA No. 29 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL (semilogaritmica) DOSIS 5 mg.	77
FIGURA No. 30 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 70:30 Y 80:20 DOSIS 5 mg.	79
FIGURA No. 31 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 70:30 Y 80:20. (semilogaritmica) DOSIS 5 mg.	80
FIGURA No. 32 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 40:60 Y 60:40 DOSIS 5 mg.	83
FIGURA No. 33 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 40:60 Y 60:40 (semilogaritmica) DOSIS 5 mg.	84
FIGURA No. 34 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, MICROESFERAS DE ESTRADIOL COLESTEROL 10:90 Y 20:80 DOSIS 5 mg	86
FIGURA No. 35 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, MICROESFERAS DE ESTRADIOL COLESTEROL 10:90 Y 20:80 (semilogaritmico) DOSIS 5 mg	87
FIGURA No. 36 GRÁFICO COMPARATIVO DE $C_{m\acute{a}x}$ DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL	90
FIGURA No. 37 GRÁFICO COMPARATIVO DE ABC A 29 DIAS DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL	91
FIGURA No. 38 GRÁFICO COMPARATIVO DE VIDA MEDIA DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL	92
FIGURA No. 39 GRÁFICO COMPARATIVO CONSTANTE DE ELIMINACION DE MICROESFERAS ESTRADIOL- COLESTEROL	93
FIGURA No. 40 GRÁFICO COMPARATIVO DE TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE MICROESFERAS ESTRADIOL- COLESTEROL	94

## GLOSARIO

DESCRIPCIÓN	ABREVIATURA
Terapia de reemplazo hormonal	TRH
Hormona luteinizante	HL
Adenosin monofosfato cíclico	AMP cíclico
Hormona Folículo estimulante	HFE
Nanometros	nm
Acido ribonucléico mensajero	RNA <sub>m</sub>
Picogramos	pg
Radioinmunoanálisis	RIA
Nanogramos	ng
Liberación Modificada/controlada	MR/CR
Liberación extendida	ER
Concentración plasmática máxima	C <sub>máx</sub>
Tiempo para obtener la concentración plasmática máxima	t <sub>máx</sub>
Liberación retardada	DR
Liberación lenta	SR
Deposito	Depot
Intramuscular	IM
Intravenoso	IV
Unidades internacionales	UI
Cromatografía gases detección de masas	GC-MS
Cromatografía de líquidos de alta resolución	HPLC
Porcentaje de unión máxima	%B <sub>o</sub>
Area bajo la curva de cero al último punto	ABC <sub>t</sub>
Area bajo la curva de cero al infinito	ABC <sub>INF</sub>
Tiempo de vida media	t <sub>1/2</sub>
Tiempo medio de residencia.	TMR
Constante de eliminación	Kel
pendiente	m
intercepto	a
coeficiente de determinación	r <sup>2</sup>
unión inespecífica	NSB
Coeficiente de variación	CV
Nanomol	nmol
Litro	L
microlitro	μL

DESCRIPCIÓN	ABREVIATURA
Globulina de unión a hormonas sexuales	SHBG
Testosterona	T
Desviación estándar	D.E.
Error estándar	E.E.

**CAPITULO 1**  
**INTRODUCCION Y OBJETIVO**

## INTRODUCCION

En la actualidad con el desarrollo tecnológico y de los sistemas de salud mundial las expectativas de vida se han incrementado en la mayoría de los países desarrollados e incluso en los países en vías de desarrollo, razón por la cual la población mundial se ha incrementado notablemente en ambos tipos de países, aumentando la edad promedio de la población tanto en hombres como mujeres y con esto el aumento de enfermedades que antes sólo eran específicas de los países desarrollados como es el caso de enfermedades como el cáncer o enfermedades del corazón entre otras.

El avance tecnológico y la generación de nuevos conocimientos han permitido entender las enfermedades y proponer alternativas para combatirlas. Las alternativas principales se han dirigido al desarrollo de nuevos protocolos, técnicas quirúrgicas, nuevas técnicas de diagnóstico y terapias para combatir las enfermedades. Destacando el desarrollo de nuevos medicamentos.

El desarrollo de nuevos medicamentos y particularmente sus formas de dosificación, se han mejorado día con día para poder tener mejores resultados. Teniendo como objetivo, lograr la mejor acción más prolongada, que permita el menor número de dosificaciones, de menores efectos adversos y facilitar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

Dentro de los medicamentos que se han desarrollado para lograr estos objetivos, están los medicamentos o productos denominados como de liberación modificada o controlada. Existen una gran variedad de formas de dosificación que tienen dentro de su tecnología el control de la liberación, entre las cuales tenemos a las formas recubiertas, matrices poliméricas, matrices con fármacos embebidos en polímeros hidrofílicos, intercambiadores de iones y formas farmacéuticas erosionables entre otras.

Al desarrollarse este tipo de formas de dosificación se busca mejorar la aceptación de los tratamientos y reducir la frecuencia de dosificación. Los productos desarrollados deben ser evaluados para comprobar lo anteriormente mencionado. Dentro de los procedimientos de evaluación esta la evaluación preclínica que estudia las características de liberación del producto desarrollado, tiene las características de liberación antes de llevar a cabo pruebas en humanos.



Dentro de los productos de liberación controlada o modificada se encuentran aquellos que contienen fármacos con características como : vida media corta, que son altamente metabolizados, que poseen abundantes efectos adversos o de toxicidad cuando no se controla su dosificación.

Entre los grupos de fármacos que poseen estas características se encuentran los esteroides de tipo hormonal como el estradiol y la progesterona. Estos compuestos tienen funciones fisiológicas importantes en el organismo y son útiles en terapias sustitutivas, como anticonceptivos, de corrección de desordenes hormonales, anti cáncer, entre otras. Su empleo es delicado ya que si no es controlada su administración pueden presentarse efectos adversos o bien pueden presentarse casos de incumplimiento del tratamiento.

El presente trabajo es parte de la fase de desarrollo y evaluación preclínica de una nueva propuesta de tecnología de dosificación (microesferas), en la cual se busca evaluar si esta forma de dosificación puede tener un posible uso terapéutico. Este trabajo esta enfocado a la formulación de estradiol, se pretende evaluar su uso como podría ser el anticonceptivo, y en la terapia de reemplazo hormonal comparando sus ventajas respecto a las formas de dosificación existentes de estradiol.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar por medio de un estudio comparativo de biodisponibilidad las características farmacocinéticas y liberación de una nueva forma farmacéutica de estradiol y estradiol combinado con colesterol en diferentes proporciones en forma de microesferas con respecto a una forma farmacéutica ya existente en el mercado, y con base en esas características establecer cual de estas formas farmacéuticas presenta potencial uso en diferentes terapias hormonales ya sean terapia de reemplazo o anticonceptiva.



## **OBJETIVOS PARTICULARES**

-Evaluar la biodisponibilidad de diferentes combinaciones de Estradiol y Estradiol-colesterol en forma de microesferas.

-Calcular los parámetros farmacocinéticos de las diferentes combinaciones de microesferas de estradiol y estradiol-colesterol.

-Por medio de la información farmacocinética obtenida, indicar cuales son las microesferas de Estradiol o Estradiol-colesterol que pueden tener una posible aplicación terapéutica.



**CAPITULO 2**  
**GENERALIDADES**



## 2.1 MONOGRAFIA DE ESTRADIOL (1)

### 2.1.1. DESCRIPCION

El estradiol es la hormona estrogénica más potente, fue extraída por primera vez a partir de 4 toneladas de ovarios porcinos de los cuales se aislaron 12 mg en 1935; su principal uso clínico es la terapia post climaterio o terapia de reemplazo hormonal (TRH) administrado sólo o en combinación con otras hormonas, por diferentes rutas: oral, transdérmica, subcutánea o intravaginal en una gran variedad de formas de dosificación. También es utilizada en la osteoporosis post-menopáusica y carcinoma prostático.

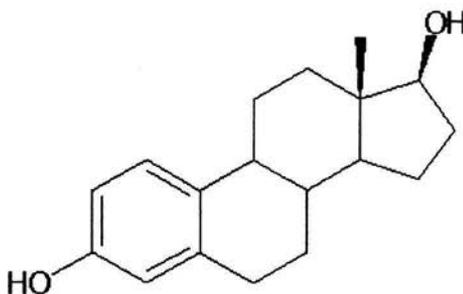
Esta hormona es secretada principalmente por los folículos ováricos por la placenta y la corteza adrenal. Es responsable del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios en las adolescentes y adultos.

### 2.1.2. NOMBRES QUIMICOS

Estra-1,3,5 (10)-triene-3,17 $\beta$ -diol ; 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>); términos obsoletos la incluyen como hormona dihidrofolicular, dihidrofoliculina, dihidrotelina y dihidroxiestrina.

### 2.1.3. FORMULA CONDENSADA: C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>

### 2.1.4. FORMULA DESARROLLADA



**FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ESTRADIOL**



### **2.1.5. PESO MOLECULAR**

272.3 g/mol

## **2.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**

### **2.2.1. DESCRIPCIÓN**

Pequeños cristales o polvo cristalino de color blanco cremoso, inodoro y estable al aire e higroscópico.

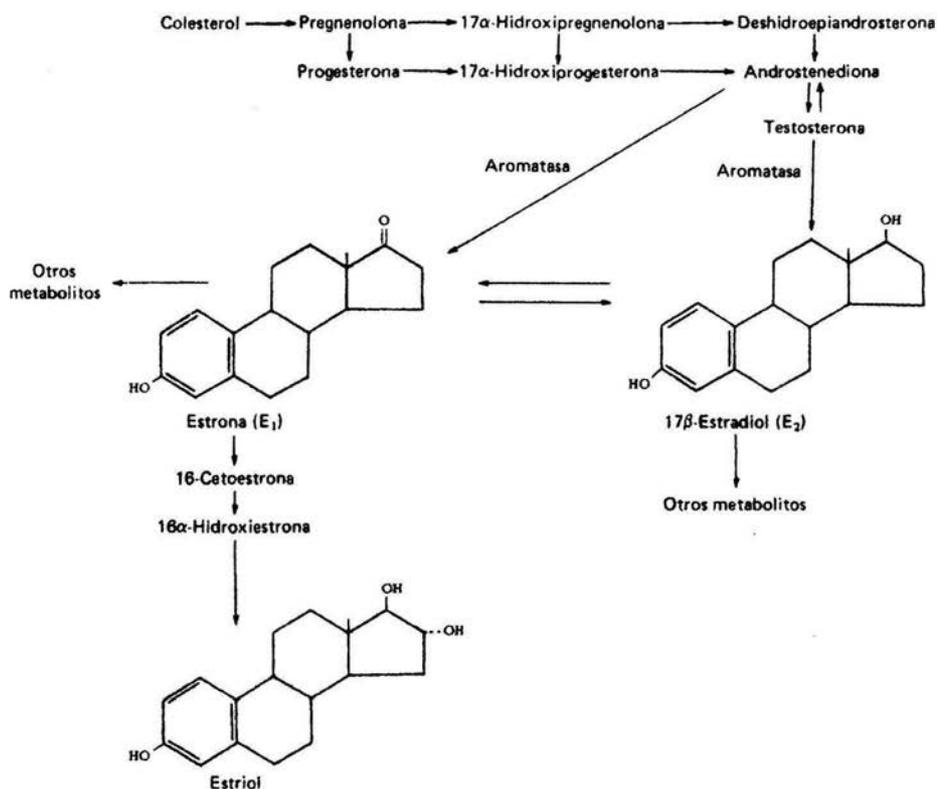
### **2.2.2. SOLUBILIDAD**

Prácticamente insoluble en agua, soluble en alcohol, acetona, dioxano, cloroformo y en soluciones de hidróxidos alcalinos, ligeramente soluble en aceites vegetales.

### **2.2.3. SÍNTESIS (2)**

Aunque la síntesis total de estradiol se ha desarrollado a partir de precursores acíclicos usualmente se prepara por reducción con borohidruro de sodio de la estrona, la cual a su vez es obtenida de la aromatización reductiva de androstenodiona. La biosíntesis del estradiol a partir del colesterol junto con otros estrógenos se expresa en la siguiente figura.





**FIGURA 2. RUTAS DE BIOSÍNTESIS DEL ESTRADIOL Y ESTRÓGENOS**

Los estrógenos son secretados por células de la teca interna y la granulosa de los folículos ováricos, el cuerpo lúteo, la placenta y, en pequeñas cantidades, por la corteza suprarrenal y los testículos. La vía de biosíntesis incluye su formación a partir de los andrógenos, son formados por aromatización de la androstenediona en la circulación. La aromatasa es la enzima que cataliza la conversión de androstenediona en estrona. Así como la conversión de testosterona en estradiol. Las células de la teca interna tienen receptores de HL, y esta hormona actúa por vía del AMP cíclico para aumentar la conversión del colesterol a androstenediona. Algo de androstenediona se convierte en estradiol, el cual entra a la circulación. Las células de la teca interna también suministran androstenediona a las células de la granulosa. Las células granulosa elaboran sólo estradiol cuando



cuentan con andrógenos. Las células granulosas tienen receptores de HFE, y esta hormona facilita la secreción de estradiol actuando por medio del AMP cíclico para incrementar la actividad de la aromatasa de dichas células. Los tejidos del estroma ovárico también pueden elaborar andrógenos y estrógenos, en cantidades insignificantes en las mujeres normales premenopáusicas. El 17-beta Estradiol, el principal estrógeno secretado, está en equilibrio con la estrona en la circulación. Esta última es metabolizada a estriol, probablemente en el hígado en su mayor parte. El Estradiol es el estrógeno más potente de los tres y el estriol es el menos activo.

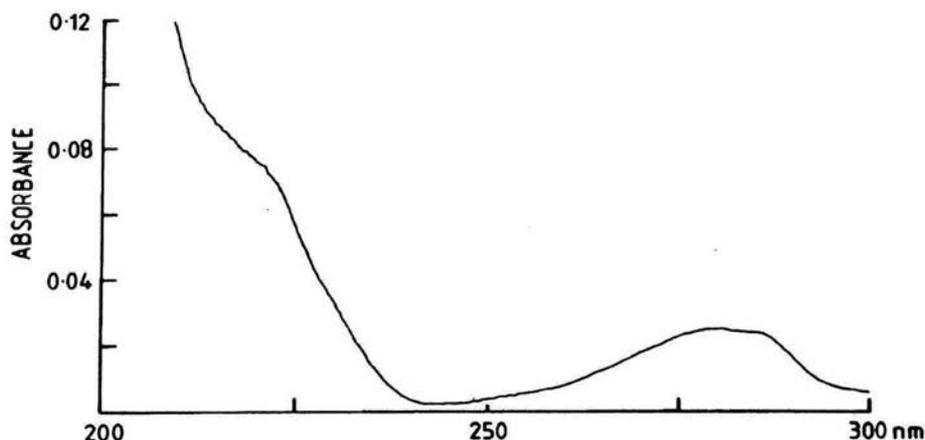
Casi todo el estrógeno proviene del ovario y hay dos máximos de secreción: uno justamente antes de la ovulación y otro durante la fase lútea media. La tasa de secreción de estradiol es de 0.07 mg/día (0.26 micromoles/día) en la fase folicular temprana, de 0.6 mg/día justamente antes de la ovulación y de 0.25 mg/día durante la fase luteínica media. Después de la menopausia, la secreción de estrógenos declina.

## **2.2.4. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS**

### **2.2.4.1. ESPECTRO DE ABSORCIÓN AL ULTRAVIOLETA**

En 2% v/v de metanol el hemidrato de estradiol exhibe una absorción máxima a 221 nm y 280 nm, con un pico a 287 nm con un punto isobéptico a 285.6 nm.





**FIGURA 3. ESPECTRO ULTRAVIOLETA DEL ESTRADIOL**

Conc Estradiol: 2% en metanol

## **2.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS (3,4)**

### **2.3.1. PROPIEDADES FISIOLÓGICAS**

El estradiol circula en el organismo principalmente unido a proteínas plasmáticas. Además de otros estrógenos esteroidales naturales como son estrona, estriol y sus conjugados. Estos son hormonas secretadas principalmente por los folículos de los ovarios y también por los adrenales, cuerpo lúteo, placenta y en los hombres por los testículos. Las hormonas estrogénicas son secretadas en diferentes cantidades durante el ciclo menstrual durante el periodo de actividad ovárica. En el embarazo la fuente principal de estrógenos es la placenta y en la menopausia la secreción de estrógenos de los ovarios disminuye en diferente proporción. Las gonadotrofinas de la pituitaria anterior regulan la secreción de las hormonas ováricas, estradiol y progesterona; el control hipotalámico de la producción de gonadotrofinas a su vez es regulado por las concentraciones de los estrógenos y progesterona en plasma. Este complejo mecanismo de retroalimentación, regula el ciclo de ovulación y menstruación. Uno de sus principales usos ha sido el diagnóstico diferencial de amenorrea y la inducción de la ovulación, así como el mantenimiento de sus niveles en las mujeres en la menopausia sometidas a terapia de reemplazo.



### **2.3.2. MECANISMO DE ACCIÓN (3,4)**

Al igual que otros esteroides, los estrógenos se combinan con un receptor proteínico intracelular y el complejo se fija a DNA, con lo que fomenta la formación de diversos RNAm que, a su vez, dirigen la formación de nuevas proteínas que modifican la función celular. Parece probable que todas las acciones de los estrógenos sean producidas de esta manera, aunque es posible que intervengan otros mecanismos. Los receptores de estrógenos han sido identificados en tejidos del tracto reproductivo, glándulas mamarias, pituitaria, hipotálamo, hígado y huesos en la mujer.

### **2.3.3. USOS TERAPÉUTICOS (3,4,5,6)**

El estradiol tiene diversos usos terapéuticos entre los cuales se encuentran los siguientes:

#### **a) Terapia de reemplazo de estrógenos:**

En mujeres sanas, los estrógenos endógenos mantienen la función del aparato genitourinario y la estabilidad vasomotora. Los estrógenos son usados como terapia de reemplazo para aliviar o prevenir los síntomas causados por la disminución de las cantidades de estrógenos producidos por los ovarios después de la menopausia natural o quirúrgica o en otros estados de deficiencia estrogénica.

#### **b) Prevención de osteoporosis post-menopausia:**

Durante periodos de deficiencia de estrógenos, la velocidad de resorción de hueso por parte de los osteoclastos generalmente excede a la formación de hueso por los osteoblastos. Los estrógenos previenen esta acelerada pérdida de hueso, inhibiendo la resorción de hueso, estableciendo un equilibrio entre la resorción y formación de hueso, sin embargo los estrógenos no reemplazan la pérdida de hueso ni incrementan significativamente la masa ósea.

#### **c) Carcinoma prostático:**

Inhiben la secreción de la hormona luteinizante en la pituitaria produciendo una disminución en las concentraciones de testosterona.



- d) En el tratamiento de atrofia vulval o vaginal.
- e) En el tratamiento de hipoestrogenismo debido a hipogonadismo, castración o falla ovárica primaria.
- f) En el tratamiento de cáncer mamario, solo como paliativo en algunos casos para hombres y mujeres con metástasis.
- g) Como anticonceptivo combinado con progestágenos.

### 2.3.4. NIVELES FISIOLÓGICOS (3,4)

Existen diferentes tratamientos y formas farmacéuticas de administración dependiendo del uso del estradiol que pueden ser: como anticonceptivo, terapia de reemplazo, corrección de ciclos menstruales, terapia paliativa en cáncer prostático.

Los niveles fisiológicos de los estrógenos varían en las diferentes etapas de la mujer, en la Tabla 1 se presentan los valores encontrados y que son los que se espera cubrir por el medicamento sustitutivo.

<b>Etapa</b>	<b>Concentración (pg/mL)</b>
Pre pubertad	4-12
Fase folicular	30-100
Fase preovulatoria	100-400
Fase lútea.	50-200
<b>Post-menopausia</b>	<b>5.8-18</b>

**TABLA 1. NIVELES DE ESTRADIOL EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA VIDA REPRODUCTIVA**

### 2.3.5. REACCIONES ADVERSAS (3,4)

La utilización de terapias con esteroides es delicada, por lo que es necesario tener en cuenta las posibles reacciones adversas que pueden derivar del uso prolongado de este tipo de productos. Entre las reacciones adversas más frecuentes están las siguientes:



- En hombres que reciben estrógenos como parte de la terapia para el cáncer de próstata, se produce edema de pies y piernas, así como aumento de peso debido a la retención de líquidos.
- Incidencia menos frecuente o rara: Amenorrea, menorragia, tumores de seno, obstrucción de vesícula o hepatitis.
- Trombo embolismo o formación de trombos severos y presencia de repentinos dolores de cabeza o repentina pérdida de coordinación, dolores en el pecho, ingles y pantorrillas, dificultades para respirar, hablar, cambios repentinos en la visión y debilidad.
- Los estrógenos pueden producir efectos adversos tales como un crecimiento uterino y sangrado en mujeres.
- Puede haber retención de agua y sodio, ablandamiento y alargamiento de senos, dolor de cabeza y mareos.
- En grandes dosis pueden ocasionar cierre de la epífisis. La mayoría de los estrógenos provocan náusea y vómito.
- Bajas dosis de estrógenos pueden ocasionar el crecimiento de neoplasias malignas de seno, sin embargo a altas dosis pueden inhibir el crecimiento de neoplasias malignas de seno.
- En estudios realizados en hombres que han recibido una terapia crónica de estrógenos para cáncer de próstata, existe una supresión parcial de producción de eritrocitos, resultando en palidez y una anemia normocítica y normocromica, algo similar se ha observado para el caso del uso de progestágenos. En estudios en hombres sanos se ha observado que el empleo de hormonas sintéticas y naturales incrementa la agregación de las plaquetas. Los estrógenos sintéticos modifican la conducta electroforética de las plaquetas, algo similar se ha observado en mujeres que utilizan anticonceptivos orales.
- Los estrógenos incrementan la capacidad de unión de tiroxina en el plasma, los estrógenos pudieron aumentar la unión de yodo a proteínas a niveles que indican una tirotoxicosis.



### **2.3.6. INTERACCIONES Y CONTRAINDICACIONES (3,4)**

Su uso esta contraindicado en los casos de personas que tengan antecedentes de neoplasias malignas de los senos o tracto genital y en aquellas personas que hayan tenido desórdenes trombo embólicos después de un tratamiento con estrógenos.

Debido a los posibles desórdenes trombo embólicos que se pueden producir cuando se usan los estrógenos para inhibir la lactancia puerperal y en mujeres con edades superiores a los 35 años, se debe tener cuidado en su administración, así como en pacientes con adenoma pituitario debido al alto riesgo de producción de hemorragias.

## **2.4. FARMACOCINÉTICA (4)**

### **2.4.1. ABSORCIÓN**

Los estrógenos se absorben completamente a través de la piel, membranas mucosas y tracto gastrointestinal. Cuando se aplican localmente, por lo general pueden producir efectos sistémicos. Cuando se les conjuga con grupos alquilo o arilo para administración parenteral, la velocidad de absorción de las preparaciones oleosas es lenta y la duración de su acción es prolongada, como ejemplo de ello es el caso de una inyección de valerato o cipionato de estradiol que son absorbidos en término de semanas.

### **2.4.2. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN**

Existen en el mercado muchas formas de administración para los productos de estradiol semisintéticos; entre las cuales se encuentran: parches, inyecciones, cremas, anillos vaginales y tabletas. En la tabla 3 se describen algunos ejemplos de estos productos y sus usos terapéuticos.

### **2.4.3. DISTRIBUCIÓN**

El estradiol presenta afinidad a la mayoría de los tejidos corporales, como son tejidos del tracto reproductivo, glándulas mamarias, pituitaria, hipotálamo, hígado, huesos en la mujer y tejidos adiposos.



Una pequeña porción del estradiol en la circulación está libre aproximadamente 3% y el resto se encuentra unido a proteínas, 60% a la albúmina y 37% a la misma globulina que fija testosterona y que es llamada globulina fijadora de esteroides gonadales.

#### **2.4.4. UNIÓN A PROTEÍNAS**

Presenta una unión a proteínas de moderada a alta con la albúmina y la globulina de unión a hormonas sexuales. Se une a receptores específicos de naturaleza proteica formando complejos en tejidos sensibles a estrógenos como tracto reproductivo, glándulas mamarias, pituitaria, hipotálamo, hígado.

#### **2.4.5. BIOTRANSFORMACION**

La biotransformación del estradiol es principalmente hepática, parte del metabolismo también ocurre en los músculos, riñones y en gónadas. Los sitios de metabolismo de todos los estrógenos sintéticos no han sido completamente determinados aunque su metabolismo hepático, es el más importante.

En el hígado los estrógenos son oxidados y conjugados a glucurónido y sulfato. Cantidades apreciables son secretadas en la bilis y reintegradas a la sangre (circulación enterohepática).

#### **2.4.6. ELIMINACION**

Su eliminación es principalmente renal en forma de glucurónidos o sulfatos y en menor grado por vía fecal, recirculación enterohepática, dando lugar a una eliminación prolongada.

Al administrar estradiol por vía oral, del 23 a 68% de la dosis de estradiol puede ser recuperada de la bilis como sulfatos conjugados, los cuales son hidrolizados principalmente por enzimas de la mucosa y la flora intestinal, en el bajo íleon y colon superior; la mayoría del estrógeno libre es principalmente reabsorbido, dejando sólo de 10 a 30% para ser excretado en heces y 50-80% de este se elimina como conjugados en la orina. Debido a la recirculación enterohepática, la eliminación del estradiol se lleva a cabo de 3 a 6 días, la depuración o aclaramiento metabólico en mujeres es de 1300 L/ día. La disminución de los niveles séricos después de una infusión intravenosa indica que la eliminación es bifásica con una vida media de 20 a 70 min.



## 2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR ESTRADIOL EN FLUÍDOS BIOLÓGICOS

Existe una gran variedad de métodos para la cuantificación de estradiol en fluidos biológicos que son muy sensibles debido a las pequeñas concentraciones en que suelen encontrarse en fluidos biológicos, entre los cuales se encuentran los inmunoensayos y la cromatografía de líquidos y gases.

### 2.5.1. INMUNOENSAYOS (7,8)

a) Rodríguez-Espinosa y col. emplean un método inmunológico para detectar estradiol de la casa comercial (Cirrus Diagnostics, Glyn Rhonwy, Reino Unido) que consiste en un sistema de quimioluminiscencia de tipo enzimático (EIA), la prueba consiste de lo siguiente: el estradiol presente en el suero de pacientes y estradiol conjugado con fosfatasa alcalina del estuche comercial, compiten por los sitios de unión de anticuerpos anti-estradiol de tipo policlonal obtenidos por la inmunización de conejos y unidos a una placa de poliestireno. El conjugado estradiol-enzima que no se une es removido por lavados mediante centrifugación, después se agrega un sustrato para la enzima que es quimioluminiscente cuando está unida al estradiol (adamantil dioxietano), y la quimioluminiscencia desarrollada es cuantificada. El equipo de análisis empleado cuantificó estradiol en muestras de hombres, mujeres menstruando y posmenopáusicas. El porcentaje de cuantificación de estradiol en muestras de concentración conocida fue en promedio de alrededor de 102%. El ensayo fue lineal en todo el rango de concentraciones probado. Sólo se presentaron interferencias a altas concentraciones de Estradiol por algunas sustancias, durante la cuantificación de Estradiol.

b) Grenier y col. utilizaron un estuche de inmunoensayo enzimático de la marca comercial (Serono, Serozyme estradiol) que usa placas de poliestireno a las cuales se les adhirió anticuerpos específicos anti-estradiol. Las muestras de plasma obtenidas para el ensayo, fueron extraídas con éter etílico y los extractos se hicieron reaccionar con las placas forradas de anticuerpos anti estradiol, así como con estradiol conjugado a peroxidasa de rábano. Después de 3 horas de incubación a temperatura ambiente, el líquido fue aspirado y la peroxidasa del conjugado estradiol-peroxidasa se hizo reaccionar con el sustrato peróxido de hidrógeno y un cromógeno (o-fenilendiamina), la coloración producida fue cuantificada por una medición de absorbancia a 492 nm. Los resultados para 34 muestras fueron



comparados con los obtenidos con un método por radioinmunoanálisis (RIA). Los resultados de ambos métodos fueron comparados, se realizó una regresión lineal, un histograma para los dos métodos y la distribución de los promedios de los dos en relación con la concentración absoluta. Se encontró que el método enzimático detectó menores concentraciones que el método por RIA (hasta en un 30%) especialmente concentraciones por debajo de 1.5 ng/mL.

### **2.5.2. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS (9)**

Terada-H y col. emplearon un método para cuantificar corticosteroides en alimentos por cromatografía HPLC. Las muestras fueron extraídas con acetonitrilo en un baño de ultrasonido y el extracto fue filtrado. El filtrado fue fraccionado en dos partes, una para cuantificar corticosteroides y estradiol en la fracción denominada (a) y otra para cuantificar testosterona y progesterona, la cual se denominó fracción (b); se empleó extracción en fase sólida usando cartuchos de separación Sep pak C18 y cartuchos Bakerbond spe NH2. Cada fracción fue analizada en una columna (25 cm x 4.6 mm) de Nucleosil 100-5 C18 con acetonitrilo-agua-0.2M de solución amortiguadora de fosfatos a pH 3 (38:57:5 y 50:47:3) respectivamente, con un flujo de 1mL/min y una detección de 230 y 245 nm para la fracción (a) y a 245 nm para la fracción (b). Los recobros fueron de 39.4 a 105.5% para corticosteroides y 67.2 a 95.4% para agentes anabólicos; los coeficientes de variación fueron de 1.7 a 13.1%.

### **2.5.3. CROMATOGRAFIA DE GASES (10)**

Batjoens, P y col. emplearon una técnica de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas, para detectar esteroides anabólicos en el sitio de inyección. En este método las muestras fueron puestas en viales del automuestreador del cromatógrafo y secadas bajo N<sub>2</sub>, posteriormente se agregaron agentes silanzantes como son el N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida/yodotrimetilsilano/DTT (50 µL) y esta mezcla fue calentada a 60°C durante 30 minutos. Una porción de esta mezcla (1 µL) fue analizada por cromatografía de gases (GC) utilizando una columna (25 m x 0.2 mm de diámetro interno) recubierta con una fase estacionaria de ultra-2 (0.11 micrómetros) utilizando un programa de temperatura de 100 a 250 °C a una razón de 15°C/min. Después fue llevada a 320°C y permaneció así por 1.5 min a una razón de 3°C/min y una detección EIMS.



## 2.6. ASPECTOS RELEVANTES SOBRE LAS FORMAS FARMACEUTICAS DE LIBERACION CONTROLADA O MODIFICADA (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18)

Los fármacos que utilizan la tecnología del tipo de control de la liberación, han utilizado durante su desarrollo una gran variedad de materiales con diversas funciones entre las cuales tenemos: encapsulantes, vehículos para acarreo de medicamentos, protección de principios activos durante su paso por el organismo o protección contra la humedad hasta que se da la liberación o control de la liberación del principio activo. Esto es importante, porque permite el control de la liberación de fármacos, especialmente en el caso donde las diferencias de dosificación pueden marcar diferencias entre la cura de un padecimiento o reacciones adversas que puede ser peligrosas. Comúnmente un fármaco es liberado de su forma farmacéutica y alcanza el máximo de concentración, el cual decae posteriormente de manera exponencial hasta la siguiente administración. La ventaja del uso de formas farmacéuticas que controlan la liberación de fármacos comprende la liberación del mismo en el sitio requerido, en la cantidad adecuada con pocas aplicaciones, reduciendo los riesgos de sobredosificación y efectos adversos, y proporcionando ventajas en virtud de la obtención de dosificaciones eficientes, de acuerdo con la terapia prescrita.

Se ha desarrollado una gran variedad de productos que tienen la tecnología del control de la liberación de fármacos. Entre las diversas formas de liberación que se han logrado desarrollar, tenemos las que se mencionan a continuación.

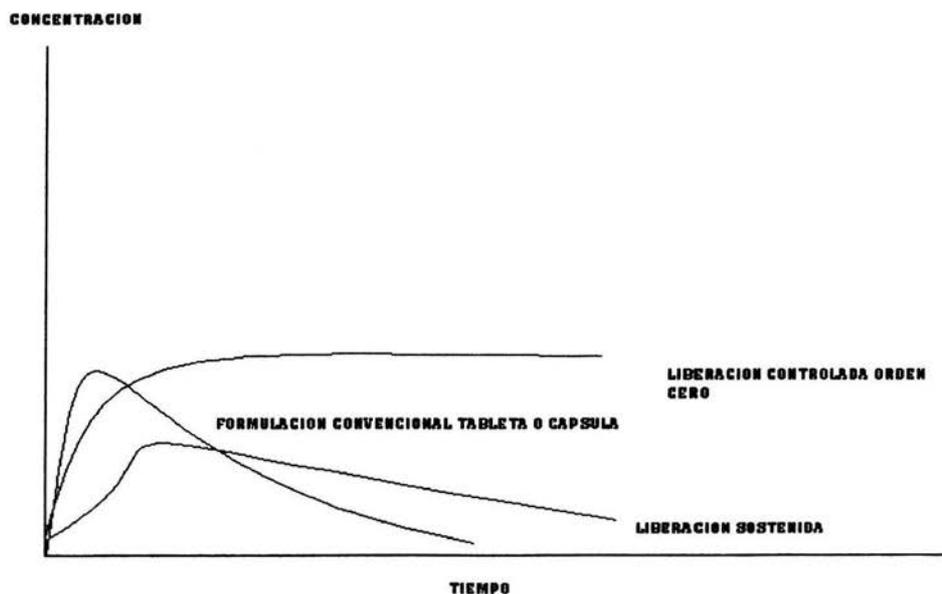
Liberación modificada o controlada (*MR/CR Modified/Controlled release*). Se refiere a formas farmacéuticas en las que características de liberación de la sustancia activa con respecto al tiempo es más lenta y es la adecuada para cumplir terapéuticamente o con objetivos de conveniencia que no ofrecen las formas de dosificación convencionales (ver figura 4).

Liberación extendida (*ER extended release*). Es aquella que permite por lo menos una reducción de frecuencia de administración en dos veces cuando se compara con una formulación de la misma sustancia activa pero en la forma de dosificación convencional. Farmacocinéticamente tienen un C máximo bajo, tienen un t máximo no bien definido, es largo y tienen una vida media de eliminación prolongada.



Liberación retardada (*DR delayed release*). Es aquella que libera el total de la sustancia activa en un sólo tiempo, con un pequeño retardamiento marginal tan pronto es administrado. Farmacocinéticamente presentan un  $C_{\text{máx}}$  sin cambios, un  $t_{\text{máx}}$  con una fase lag, la vida media de eliminación permanece sin cambios.

Liberación lenta (*SR Slow release*). La forma de liberación lenta es considerada como aquella que libera el fármaco de manera más lenta que las formas convencionales y permite realizar una reducción apreciable de la frecuencia de dosificación. Farmacocinéticamente el  $C_{\text{máx}}$  es bajo, el  $t_{\text{máx}}$  se prolonga y la vida media de eliminación permanece sin cambios.



**FIGURA 4. GRAFICA COMPARATIVA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE DOSIFICACION**

En la tabla 2 se encuentra el resumen de las características farmacocinéticas de los diferentes tipos de liberación que se han desarrollado con el advenimiento de las tecnologías de control de la liberación de fármacos.



TIPO	PICO DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA	VIDA MEDIA DE ELIMINACIÓN
<b>Liberación lenta</b>	Bajo $C_{m\acute{a}x}$ . $T_{m\acute{a}x}$ retardado	$T_{1/2}$ sin cambios
<b>Liberación extendida</b>	Bajo $C_{m\acute{a}x}$ , $T_{m\acute{a}x}$ retardado, $T_{m\acute{a}x}$ siempre no bien definido.	Aparentemente el $T_{1/2}$ es más largo que la vida media intrínseca.
<b>Liberación retardada</b>	$C_{m\acute{a}x}$ sin cambios, fase Lag.	$T_{1/2}$ sin cambios.

**TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE FORMAS FARMACÉUTICAS DEL TIPO LIBERACIÓN CONTROLADA O MODIFICADA**

El esquema básico para la guía de pruebas requeridas en la regulación para la aprobación de productos de liberación controlada o modificada son los siguientes:

En estudios de una sola dosis, se piden los estudios que demuestren las características de liberación y biodisponibilidad de la nueva formulación que se está proponiendo como de liberación modificada o controlada. También se documenta sobre posibles agentes que interfieran en la administración como pueden ser alimentos, pH, antiácidos, etc.

En el caso de estudios de dosis múltiple se pide al igual que en los de dosis única, que se demuestren sus características de liberación y biodisponibilidad, además de especificar sus características en el estado estacionario en cuanto fluctuaciones (concentraciones dentro del intervalo terapéutico, posibles problemas de acumulación o de ineficacia terapéutica), así como de estudios clínicos controlados donde se conozcan datos de la relación concentración - efecto.

## **2.7. CARACTERÍSTICAS QUE HACEN ADECUADA A UNA FORMA FARMACÉUTICA DE TIPO PARENTERAL DE FÁRMACOS SOBRE OTRO TIPO DE FORMAS FARMACÉUTICAS (19)**

Cuando se desarrolla una forma de dosificación de tipo convencional para un nuevo fármaco, por lo general se prefiere la administración oral. Una



dosis oral es fácilmente administrada a un paciente, ya que da un control completo al paciente para su administración. Además de que los requerimientos para la fabricación de una forma de dosificación oral son menos rigurosos que para otras formas farmacéuticas, en particular formas de dosificación de tipo parenteral. Sin embargo, un fármaco no puede administrarse por vía oral si éste tiene importante efecto de primer paso en el tracto gastrointestinal como es el caso particular del estradiol. Existen muchos compuestos que no pueden ser administrados oralmente ya que pueden degradarse por medio de enzimas como son los casos de algunos péptidos y proteínas.

Si el fármaco no puede ser administrado por vía oral debido a su pobre biodisponibilidad, entonces la ruta parenteral es una opción.

Otra de las razones importantes para seleccionar la administración parenteral es que cuando una forma de dosificación oral tenga una buena biodisponibilidad, una forma parenteral de larga duración será segura y eficaz por un periodo de tiempo largo (días o meses) lo que puede ser beneficioso si lo que se busca es que el paciente reciba una medicación permanente.

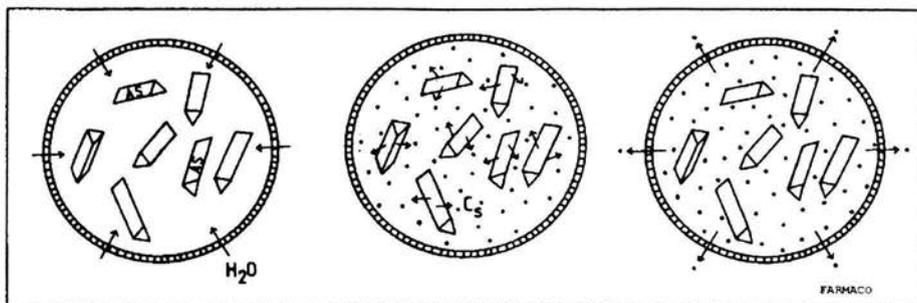
## **2.8. MECANISMOS DE CONTROL EN LA LIBERACIÓN DE FARMACOS (11,20)**

### **2.8.1. FORMAS FARMACÉUTICAS CON RECUBRIMIENTO**

Es la forma más común de las formas de liberación controlada, en éstas, el fármaco está rodeado por una barrera, hay una velocidad de difusión lenta, a partir de la cual se determina la velocidad de liberación y en consecuencia se puede medir la absorción. Los materiales de recubrimiento son usualmente polímeros orgánicos tales como la etil celulosa, el ácido metacrílico, y copolímeros de (etil acrilato-metilmacrilato). Existen algunas formas de dosificación que emplean el uso de compuestos de origen biológico como pueden ser carbohidratos, proteínas, ésteres, etc.



## FIGURA 5. FORMAS FARMACÉUTICAS CON RECUBRIMIENTO



Tomado de referencia 11 As=forma sólida del fármaco, Cs= Fármaco disuelto antes de difundir del recubrimiento

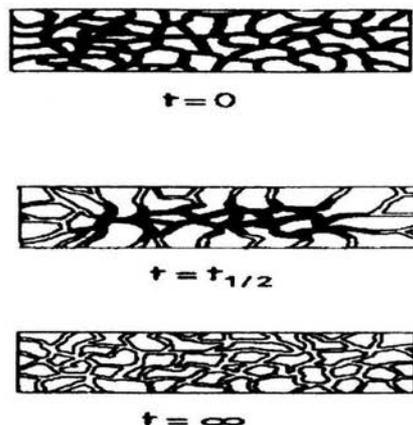
### 2.8.2.FORMAS FARMACÉUTICAS POR MATRICES

Las formas de dosificación controlada que utilizan matrices se caracterizan por sus esqueletos insolubles de tipo poroso, hechos principalmente de grasas y ceras no digeribles o de materiales inorgánicos. La red o esqueleto que va a incluir al fármaco, en algunos casos contiene aditivos solubles que permiten al fármaco ser liberado por difusión, sin embargo, el excipiente no interviene sobre la liberación o la difusión, en este tipo de formas farmacéuticas el principal problema es la estabilidad de las formulaciones. El control de la liberación en estas se maneja por medio de la disposición en el tamaño de los poros.

Las microesferas son consideradas como formas farmacéuticas del tipo monolítico o de matriz, son posiblemente las formas más comunes utilizadas para el control de la liberación de fármacos. Su fabricación es relativamente fácil, cuando se compara con las formas farmacéuticas de depósito, en las cuales hay peligro de liberación accidental de grandes cantidades del fármaco debido a la ruptura de la membrana del depósito de estas formas farmacéuticas. En el caso de las microesferas el principio activo o fármaco está en dispersión entre una matriz de polímeros formada por compresión de una mezcla polímero / fármaco, o por disolución o mezcla de ambos. Las propiedades de liberación de estas formas farmacéuticas son dependientes de las características de solubilidad del fármaco en la matriz polimérica, o en el caso de matrices porosas, la solubilidad entre el poro de la red polimérica de la partícula, el medio de disolución en condiciones de saturación y la tortuosidad de la red. Siendo mayor la permeabilidad del film, dependiendo de sí el fármaco está dispersado o disuelto en el polímero. Para cargas o cantidades bajas del fármaco (0 a 5% peso / volumen) el fármaco se libera por un mecanismo de solución-difusión (en ausencia de poros). A cargas o



cantidades altas (5 a 10 % peso /volumen), el mecanismo de liberación se complica por la presencia de cavidades formadas cerca de la superficie a medida que el fármaco es liberado, tales cavidades se llenan con fluido del medio de disolución incrementando la liberación del fármaco.



**FIGURA 6. FORMAS FARMACÉUTICAS POR MATRICES  
MECANISMO DE LIBERACIÓN**

$t=0$  Concentración del fármaco a tiempo cero,  $t=1/2$  tiempo al cual se ha liberado el 50% del fármaco,  $t= \infty$  tiempo al cual se ha liberado el total del fármaco.

Tomado de referencia 11

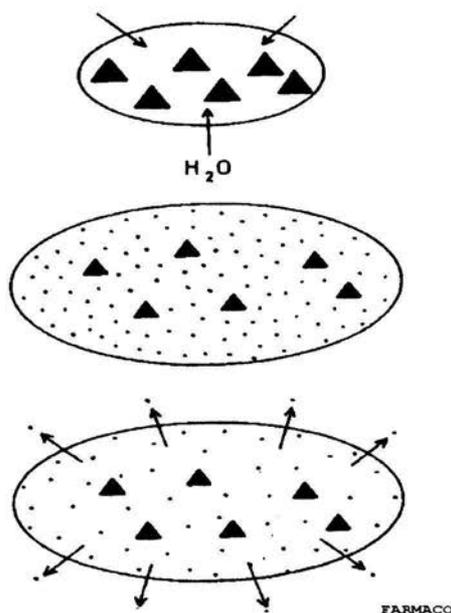
### 2.8.3. FORMAS FARMACÉUTICAS EMPLEANDO COLOIDES HIDROFÍLICOS

Existen formas de dosificación que emplean coloides hidrofílicos, que dependiendo del mecanismo que tengan para liberar fármacos. Se clasifican de dos maneras:

- a) Los coloides que se hinchan al entrar en contacto con agua, resultando altamente viscosos en los cuales la matriz es poco soluble.
- b) Los coloides que se hinchan ligeramente con un bajo nivel de viscosidad y tienden a disolverse rápidamente, lo que ayuda al control de la liberación.



La liberación del fármaco en estos casos va a depender de que tan alta sea la viscosidad de los coloides que tienen características de alta hidrofiliicidad y que provocan alta viscosidad. En este caso el ingrediente activo es liberado dependiendo de la difusión que se logra a partir del gel de la matriz obtenida al entrar en contacto con agua.



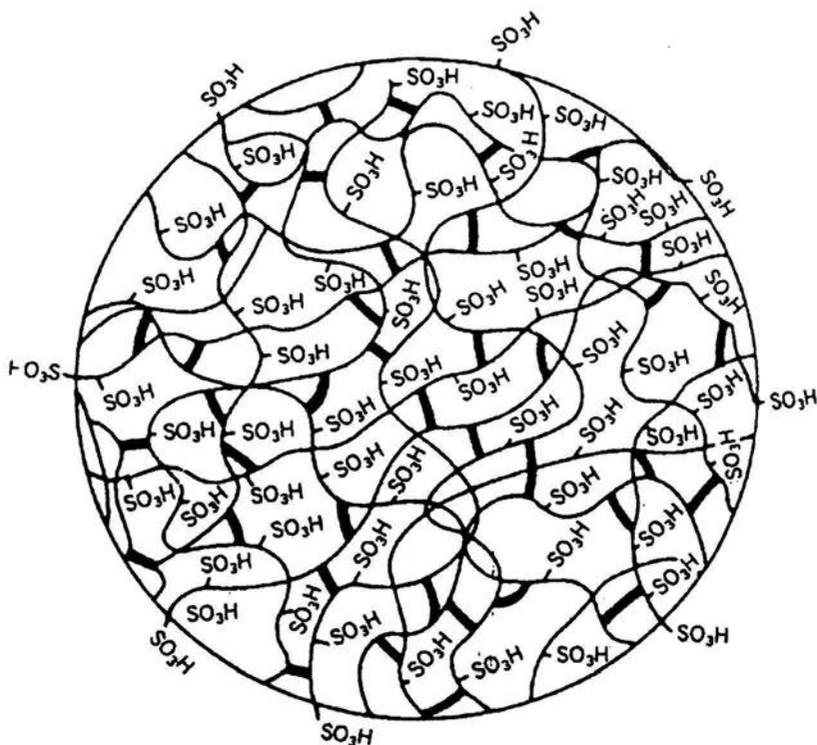
**FIGURA 7. FORMA FARMACÉUTICA CON COLOIDES HIDROFÍLICOS**

Tomado de referencia 11

#### **2.8.4. FORMAS FARMACÉUTICAS EMPLEANDO POLÍMEROS INTERCAMBIADORES DE IONES**

Los polímeros usados principalmente para estos tipos de formas de dosificación, son polímeros entrecruzados con grupos de ácidos sulfónicos unidos a fármacos de carácter básico, los cuales son liberados gradualmente después de formarse un gel por la hinchazón de la matriz. Los ácidos sulfónicos son principalmente utilizados para el retraso de la liberación de los fármacos básicos.





**FIGURA 8. FORMA FARMACÉUTICA CON INTERCAMBIADORES DE IONES**

Tomado de referencia 11

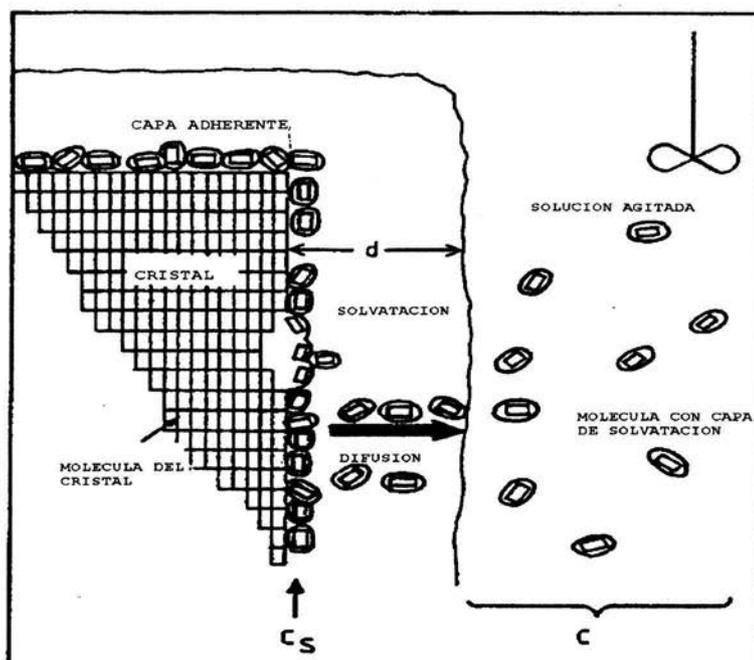
### 2.8.5. FORMAS FARMACÉUTICAS POR EROSIÓN

El empleo de polímeros erosionables como vehículo para la liberación de fármacos es atractivo, ya que no se requieren de cirugías para retirar los dispositivos en los cuales se deposita el fármaco, como es el caso de otras formas farmacéuticas de liberación controlada. Los fármacos pueden ser disueltos o dispersados uniformemente en la matriz, incorporándose como un reservorio erosionable que puede ser parte integral de la cadena polimérica. Estos tipos de sistemas de liberación polimérica pueden ser clasificados químicamente como:



- a) Sistemas de erosión.
- b) Conjugados fármaco polímero.

Los fármacos pueden ser liberados por degradación de la matriz polimérica o por rompimiento de las uniones fármaco - polímero. Incluyendo en este proceso la erosión, degradación y absorción.



### FIGURA 9. FORMA FARMACÉUTICA POR EROSIÓN

Tomado de referencia 11 Cs= cristal de fármaco solvatado.

En este tipo de formas farmacéuticas es importante conocer la proporción entre el fármaco y el excipiente o polímero para conocer el retraso de la liberación.

Los mecanismos de erosión que siguen estas formas farmacéuticas son de tipo químico y físico.

Existen tres mecanismos de erosión propuestos por Heller (21) que son los siguientes:



**Mecanismo I:** Describe la degradación de macromoléculas solubles en agua que están entrecruzadas y unidas para formar redes tridimensionales, mientras más largas son las uniones, las redes permanecen insolubles. La degradación en estos casos puede ocurrir en los entrecruzamientos de las cadenas para formar esqueletos solubles en agua de las cadenas poliméricas, o en las cadenas principales para formar fragmentos solubles en agua.

**Mecanismo II:** Este describe la disolución de polímeros que contienen grupos químicos que son convertidos a polímeros solubles en agua, como resultado de ionización, protonación o hidrólisis de grupos. Con este mecanismo los polímeros no se degradan y su peso molecular permanece esencialmente sin cambios.

**Mecanismo III:** Este mecanismo consiste en la degradación de polímeros insolubles con uniones lábiles, la hidrólisis de estas uniones causa ruptura del esqueleto del polímero formándose por lo tanto moléculas de bajo peso molecular y solubles en agua.

## **EROSIÓN FÍSICA (22)**

Los mecanismos de erosión física pueden ser caracterizados como homogéneos y heterogéneos.

**Erosión heterogénea:** Es la erosión también llamada de superficie, en ésta el polímero sólo se erosiona en su superficie y mantiene su integridad física (ejemplo: forma del dispositivo, peso molecular) y la forma como ésta se degrada. Como resultado su cinética de liberación es predecible y una cinética de orden cero será obtenida.

**Erosión homogénea:** La mayoría de los fármacos sometidos al mecanismo de erosión homogénea por lo general sufren de una hidrólisis produciéndose un gradiente del fármaco a través de la matriz del polímero. Generalmente estos polímeros tienden a ser más hidrofílicos que los que exhiben erosión en la superficie. Como resultado, el agua penetra la matriz del polímero e incrementa la velocidad de difusión del fármaco. En la erosión homogénea hay una pérdida en la integridad de la matriz de polímero.

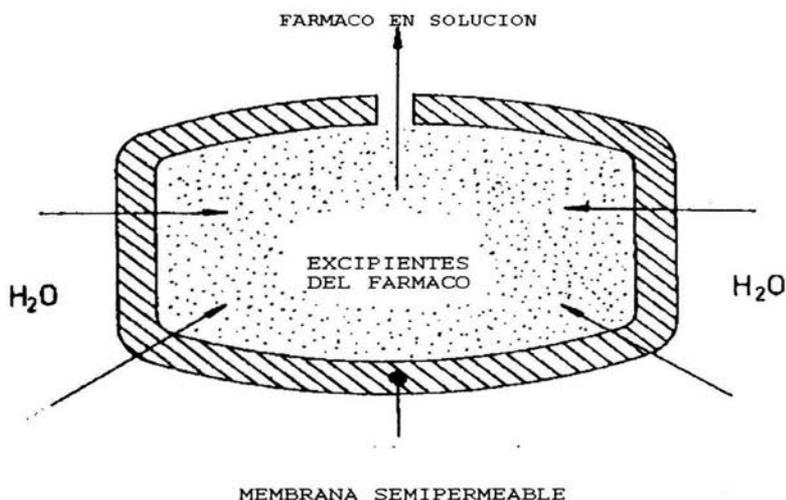
Tanto la erosión homogénea como heterogénea representan los casos extremos en erosión. La mayoría de los sistemas de liberación por erosión, son combinaciones de ambos procesos. Además las características de hidrofiliidad, hidrofobicidad, morfología y secuencia estructural gobiernan



la velocidad de erosión y el tipo de erosión. En algunas regiones cristalinas se excluyen moléculas de agua, con polímeros altamente cristalinos que tienden a comportarse con un mecanismo de erosión heterogénea.

### 2.8.6. FORMAS FARMACÉUTICAS POR SISTEMAS OSMÓTICOS

Este tipo de formas de dosificación consiste en la combinación de sustancias osmóticamente activas que emplean una membrana semipermeable. En éstos la presión osmótica resultante causa que la solución del fármaco pase a través de una salida que contiene la membrana hacia el exterior.



**FIGURA 10. FORMA FARMACÉUTICA POR SISTEMAS OSMÓTICOS.**

Tomado de referencia 11

### 2.8.7. FORMAS FARMACÉUTICAS PARENTERALES TIPO DEPOT (19)

Entre las formas farmacéuticas parenterales que son tipo "Depot" o de depósito tenemos los siguientes tipos:

- 1.-Formas farmacéuticas "Depot" de disolución controlada



En estas formas farmacéuticas la velocidad de absorción está controlada por una lenta disolución de las partículas de fármaco de la formulación o de los fluidos de los tejidos que rodean a la formulación.

#### 2.-Formas farmacéuticas "Depot" de Adsorción

Se componen de formas farmacéuticas que tienen al fármaco unido a un adsorbente. En este caso sólo el fármaco libre está disponible para absorción. Tan rápido como son liberadas las moléculas de fármaco no unido, una fracción de las moléculas de fármaco adsorbidas se liberan para mantener el equilibrio.

#### 3.-Formas farmacéuticas "Depot" de encapsulación

Los fármacos sólidos se encapsulan entre una barrera polimérica permeable o una barrera o matriz de difusión que permite la dispersión de las partículas. Tanto la barrera permeable como la matriz de difusión son macromoléculas biodegradables y bioabsorbibles.

La liberación del fármaco es controlada por la velocidad de permeación y la velocidad de biodegradación de la barrera de macromoléculas.

#### 4. Formas farmacéuticas "Depot" de esterificación

Estas formas farmacéuticas contienen la forma esterificada del fármaco que funciona como una forma bioconvertible de tipo pro-fármaco. La velocidad de absorción se controla por la partición interfacial de ésteres del fármaco del reservorio a los fluidos de los tejidos y la velocidad de biotransformación de los ésteres del fármaco, para generar moléculas de fármaco activo.

### **2.9. CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA (11)**

La caracterización de formas farmacéuticas de liberación modificada o controlada *in vivo*, está basada en el conocimiento tanto terapéutico como farmacocinético de formas farmacéuticas de liberación inmediata.

Se realizan estudios piloto de formas farmacéuticas de liberación controlada o modificada en dosis única o múltiple. Entre los diseños más utilizados están el cruzado, además de comparaciones entre grupos, así como de una cuidadosa estimación del tamaño de muestra.



Basándose en la terapéutica y la farmacocinética de productos de liberación inmediata, un producto con liberación controlada o modificada debe mejorar la tolerabilidad debido a la reducción del número de dosis y así mejorar el cumplimiento por parte del paciente.

La caracterización preclínica de las propiedades de liberación *in vivo* del producto de liberación controlada o modificada dará resultados predictivos al realizar la farmacocinética en humanos. La intención de estos estudios farmacocinéticos es describir el comportamiento *in vivo* de las formas farmacéuticas de liberación controlada o modificada, por medio de un diseño apropiado que permitirá identificar las características farmacocinéticas del producto bajo estudio. La información básica, por lo general, se obtiene de estudios realizados en animales, pero los resultados finales pueden sólo ser obtenidos a partir de estudios en humanos

Los estudios para caracterizar farmacocinéticamente los productos de liberación modificada o controlada se realizan en función de la velocidad con que el fármaco alcanza el compartimiento donde va a tener su efecto. Estas características van a estar determinadas principalmente por las mediciones que se realicen del fármaco activo en el fluido biológico apropiado y la medición del efecto farmacológico.

Cuando no sea posible la evaluación cuantitativa del activo en fluidos biológicos (casos de activos que existen de manera endógena y que son rápidamente metabolizados e incorporados en el organismo lo que dificulta su cinética) o evaluación farmacológica (en el caso de principios activos en que la evaluación farmacológica no depende de medición de la respuesta con instrumentos), entonces es necesario realizar ensayos clínicos para el establecimiento tanto de la efectividad como de la seguridad del fármaco.

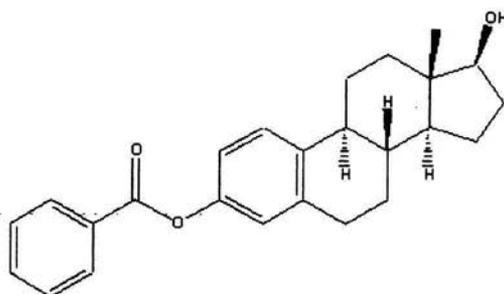
## **2.10. ÉSTERES DE ESTRADIOL UTILIZADOS EN DIFERENTES TERAPIAS (19)**

Los estrógenos que se utilizan en formas farmacéuticas de larga duración son útiles en el tratamiento de deficiencias estrogénicas en mujeres. Se han empleado como profármacos esterificados, en los grupos hidroxilo en 3 y 17, los cuales se ha visto que producen una acción prolongada cuando se administran por vía intramuscular. Se ha encontrado que los ésteres de alquilo y arilo son menos polares conforme aumenta el tamaño de la cadena de los ésteres y por consecuencia, la absorción se retrasa y la duración de la actividad estrogénica es prolongada .



Existen diversas formas farmacéuticas con diferentes ésteres de estradiol entre las cuales se encuentran:

**Benzoato de Estradiol.** Producido por la benzoilación del grupo hidroxilo en 3. Es un éster soluble en aceite del cual el  $17\beta$ -Estradiol (activo) es liberado muy lentamente y provee un nivel terapéutico sostenido (2-5 días).

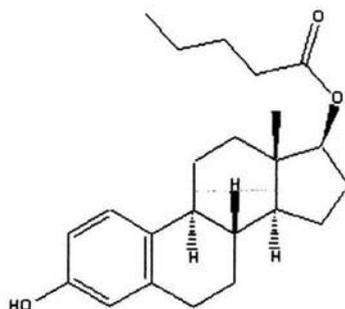


**FIGURA. 11 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL BENZOATO DE ESTRADIOL**

**Valerato de Estradiol.** Obtenido por la esterificación de estradiol en las posiciones 3 y 17 con cloruro de valerilo en piridina y después la remoción del 3 - valerato por el tratamiento con carbonato de potasio en metanol acuoso. Este éster se libera y se absorbe a partir de suspensiones oleosas inyectadas intramuscularmente y provee de niveles terapéuticos con una duración de alrededor de tres semanas.

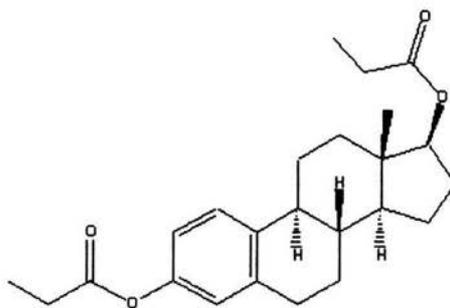
Ha sido administrado junto con fármacos progestacionales en el manejo de amenorrea primaria y secundaria, así como en sangrado uterino funcional.





**FIGURA. 12 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VALERATO DE ESTRADIOL**

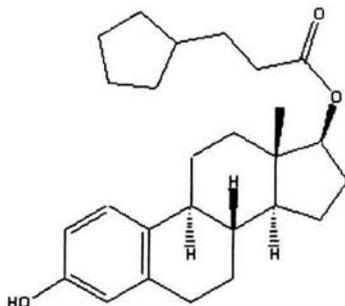
**Dipropionato de Estradiol.** Se prepara por medio de la esterificación en las posiciones 3 y 17 del estradiol con cloruro de propionilo en piridina. Este éster tiene aproximadamente la mitad de la potencia del benzoato de estradiol, tiene una mayor acción que el estradiol 17- valerato cuando se inyecta en solución de aceite vegetal.



**FIGURA. 13 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ESTRADIOL DIPROPIONATO**

**Cipionato de 17-β Estradiol.** Esta molécula se prepara por el mismo método descrito para el valerato, pero usando el cloruro de ciclopentil propionilo como esterificante. Su duración de acción es de 3 a 8 semanas.





**FIGURA. 14 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL CIPIONATO DE ESTRADIOL**

### **2.11. FASES DEL CLIMATERIO (23)**

El climaterio es el periodo de transición de la vida en su fase reproductiva a la etapa de edad avanzada o senil. Se prefiere la palabra menopausia para definir este término, aunque esta palabra no define completamente toda esta etapa, ya que la menopausia es solo un evento (la última menstruación), mientras que el climaterio es una fase que puede durar varios años. El climaterio se compone de varias fases las cuales se definen a continuación.

#### **2.11.1. LA PREMENOPAUSIA (23)**

Este periodo es previo a la menopausia y es asintomático y comienza varios años antes de que se empiecen a manifestar signos propios del climaterio, aunque viene acompañada de cambios endocrinos menores. La premenopausia comienza generalmente alrededor de los 40 y termina en la menopausia.

Aunque los intervalos entre los periodos del ciclo menstrual pueden ser más largos, la longitud de los ciclos disminuye en los años de la premenopausia. La fase folicular se acorta, mientras que la fase lútea permanece casi constante. La razón por la cual la fase folicular es más corta, es por el incremento de la concentración de hormona foliculo estimulante (HFE), especialmente en la primera semana del ciclo. Este incremento es dependiente de la edad, empieza a la mitad de los años 30. El incremento es gradual y llega a ser significativo después de los 40 años. El resultado de la sobreestimulación de los folículos provoca ovulaciones tempranas. Los



niveles de HFE se incrementan debido a que los niveles de estrógenos disminuyen, también disminuye la inhibina, debido a la disminución del número de folículos en los ovarios, en esta etapa la hormona luteinizante (HL) se mantiene sin cambios, ya que los niveles de estrógenos y progesterona todavía son suficientes para mantener el mecanismo de retroalimentación o control de HL. La disminución de inhibina y el aumento de HFE son las primeras manifestaciones significativas de esta etapa.

### **2.11.2. EL CLIMATERIO Y LA PERIMENOPAUSIA (23)**

Los primeros signos y síntomas significativos aparecen a mediados de los 40 años. Los ciclos menstruales se vuelven irregulares, los sangrados se vuelven más prolongados y fuertes. Se presentan los primeros episodios de bochornos, lo cual es uno de los más comunes síntomas del climaterio. Estos son los signos del comienzo de las dos fases del periodo de transición.

El climaterio usualmente comienza alrededor de los 45 años y llega a prolongarse hasta los 65 años.

La perimenopausia también comienza con los síntomas del climaterio, pero finaliza un año después de la menopausia.

En esta se intensifican los cambios endocrinos y tienen un gran efecto sobre el ciclo menstrual, algunos de los ciclos menstruales son muy largos (mayor de 38 días), mientras que otros son muy cortos (menores a 18 días). La ovulación ocurre todavía en los ciclos, pero cerca del 40% de ellos son anovulatorios.

### **2.11.3. MENOPAUSIA Y POSTMENOPAUSIA(23)**

El término menopausia proviene de la palabra griega *mes* y *pausia* o fin de los periodos menstruales. El último periodo generalmente ocurre entre las edades de 45 y 55 años. Este rango cubre la mayoría de las poblaciones humanas que se han estudiado. Otros estudios se han realizado en países industrializados, en estos la menopausia ocurre comúnmente entre las edades de 48 y 52 años, con 51 años como edad promedio.

En la menopausia se disminuye el número de oocitos o folículos en los ovarios. Cuando el número de folículos desciende de manera significativa a un valor mínimo, entonces los ovarios no pueden producir más folículos y hormonas sexuales. Debido a que no hay ovulación no hay formación de cuerpo lúteo y por consecuencia, no se produce progesterona, se elevan



tanto la HFE como HL. La capacidad reproductiva termina con la menopausia que se define como la última menstruación natural.

La post-menopausia, es la última fase del periodo de transición. En el más amplio sentido es una fase del climaterio. Inicia con la menopausia y finaliza cuando empieza la edad senil a la edad de 65 años.

#### 2.11.4 TERAPIAS DE REEMPLAZO HORMONAL

Los tratamientos que utilizan al estradiol para terapia hormonal de reemplazo se describen en la tabla 3

**TABLA 3. TRATAMIENTOS HORMONALES A BASE DE ESTRADIOL PARA TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (24).**

TERAPIA	DOSIS	ESTUDIO (referencia bibliográfica)
Parche 17 -beta transdérmico	Estradiol 0.025, 0.05, 0.1 mg/día	25
Parche y terapia oral	2 mg valerato de Estradiol (días 1-21)+ acetato de ciproterona (días 12-21) Parche 50 mcg/día de Estradiol 2 veces a la semana (3 semanas) y 20 mg de dihidrogesteronona (días 12 al 21) oral.	26
Parche	3.2 mg de 17-beta Estradiol micronizado en parche	27
Transdérmico	0.625 mg/día estrogénos equinos, 0.15 mg/día norgestrel por 12 días *mes. Transdérmico Estradiol (0.05 mg diarios) acetato de noretindrona (0.25 mg por día durante 14 días por un mes).	28

Para el caso de algunos de los productos que se comercializan con Estradiol en nuestro país y en Estados Unidos en la tabla 3 se muestran los siguientes:



**TABLA No. 3 TRATAMIENTOS HORMONALES A BASE DE ESTRADIOL PARA TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (24,29) Continuación.**

PRINCIPIO ACTIVO	FORMA FARMACEUTICA Y VIA DE ADMINISTRACIÓN	APLICACIÓN TERAPEUTICA
<b>Benzoato de Estradiol</b> <b>BENZO GYNESTRYL, Hoechst-</b> <b>Marion Russell</b>	Sol. Inyectable IM. Profunda 5 mg/1mL	Menopausia, ooforectomía, 1 a 4 ampolletas por mes.
<b>Cipionato de Estradiol</b> <b>Pharmacia and Upjohn</b> <b>DEPO ESTRADIOL.</b> <b>Estradiol cypionate.</b> <b>STERIS (GENERIC)</b>	Inyectable suspensión acuosa IM profunda. 5mg/mL	Manifestaciones vasomotoras de la menopausia.
<b>Cipionato de Estradiol/cipionato de testosterona (combinación)</b> <b>DEPOT-ESTRADIOL</b> <b>Pharmacia and Upjohn</b> <b>STERIS (GENERIC)</b>	Inyectable solución oleosa, IM profunda 2mg/50 mg/1 mL	Síntomas vasomotores y vaginales de menopausia. 1 mL /4 semanas, 3-6 meses y suspender.
<b>Valerato de Estradiol</b> <b>STERIS (GENERIC)</b> <b>DELESTROGEN Bristol Myers Squibb</b>	Inyectable. Solución oleosa IM profunda 10, 20 y 40 mg por mL	THR, vaginitis, hipogonadismo femenino, menopausia, ovariectomía, falla ovárica primaria, hiperplasia vulvar, carcinoma prostático (30 mg) por 1 o dos semanas.
<b>Noretindrona acetato y estradiol (ACTIVELLA)</b>	Dosis 1 mg de estradiol y 0.5 de noretindrona acetato.	En síntomas vasomotores de la menopausia, depresión, prevención de osteoporosis postmenopáusica.
<b>Estraderm</b>	Parche 0.05 mg de Estradiol	Síntomas vasomotores, hipogonadismo femenino, para mujeres que han empezado terapia de reemplazo hormonal.
<b>Climara</b>	Parche 0.05 mg/día Estradiol en dimensiones de (6.5, 12.5, 18.75, and 25.0 cm <sup>2</sup> )	Para alivio de síntomas vasomotores (0.05 mg/día), en el caso de prevención de osteoporosis (0.025 mg/día)
<b>Estrógenos conjugados, en tabletas, inyecciones, crema vaginal</b>	Tabletas 1.25 mg diarios para síntomas vasomotores, vaginitis atrofica 0.3 a 1.25 mg diarios, hipogonadismo femenino 2.5 a 7.5 mg diarios por 20 días. Inyección 25 mg IM o IV en sangrado uterino anormal Crema vaginal de 0.5 a 2 g en vaginitis atrofica	Síntomas vasomotores, vaginitis atrofica, hipogonadismo femenino, sangrado uterino anormal.

Fuente: PDR. Generics, 2002 y PLM 2002 y referencia internet: [www. Rxlist.com](http://www.Rxlist.com) (30).



**CAPITULO 3**  
**PARTE EXPERIMENTAL**



### **3.1. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL, ESTRADIOL-COLESTEROL**

#### **3.1.1. REACTIVOS Y EQUIPO**

##### **REACTIVOS**

Estuche para cuantificar estradiol por radioinmunoanálisis en fase sólida " Coat-a-Count", de " Diagnostics Products Cooperation (DPC)" CA EUA. Números de catálogo TKE21, TKE22, TKE25, TKE2X. El cuál constó de lo siguiente:

-Tubos de polipropileno de 12x75 mm, forrados con anticuerpo anti-estradiol.

-Soluciones de calibración (puntos de la curva patrón) que van de 0 a 3600 pg/mL de estradiol.

-Reactivo de estradiol marcado con I-125.

-Tubos de polipropileno de 12x75 mm sin anticuerpo.

##### **EQUIPO**

- Baño de temperatura controlada, VWR Scientific Modelo 1112, No de serie 600673 E.U.A

- Termómetro de -20 a 140 ° C Polyscience No. C96082-T EUA.

-Mezcladores tipo vórtice, Thermolyne, Maxi-Mix II Modelo M37615. No de Serie 37614621 EUA

-Refrigerador, Nieto Modelo REB 008 No. de Serie 250FCC2029 MEXICO.

-Ultracongelador Nuair Modelo NO-6512G No. de serie 50603905 EUA

-Congelador, Ojeda No.Serie 5466-30065-R MEXICO

-Pipeta de descargas múltiples, Eppendorf, Modelo 4780 EUA

-Pipeta automática digital con intervalo de trabajo de 10 a 100 mL Eppendorf. EUA

-Pipeta automática digital con intervalo de trabajo de 200 mL a 1 mL. Finnpiipete EUA

- Pipeta automática digital con intervalo de trabajo de 1 a 5 mL Finnpiipete EUA.



## EQUIPO DE MEDICIÓN

-Equipo contador gamma con las siguientes características:

Contador Gamma, MGM Instruments Modelo Isocomp I, No. de serie 105389 EUA

Automuestreador, MGM Instruments Modelo Isomate 110, No. de serie B106035 EUA

### 3.1.2. FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS

Se desarrollaron una serie de formulaciones de microesferas conteniendo estradiol puro y estradiol-colesterol en diferentes proporciones (10:90, 20:80, 40:60, 60:40, 70:30 y 80:20), los cuales fueron los productos a estudiar en este trabajo y se describen en la siguiente tabla.

**TABLA 4. PRODUCTOS DE PRUEBA A UTILIZAR EN EL ESTUDIO**

<b>PRODUCTO.</b>	<b>DOSIS.</b>
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol puras.	5 mg/mL de estradiol
Solución oleosa de estradiol.	Equivalente 5 mg/mL de estradiol
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol-colesterol (10:90).	5 mg/mL de estradiol
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol-colesterol (20:80).	5 mg/mL de estradiol
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol-colesterol (40:60).	5 mg/mL de estradiol
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol-colesterol (60:40).	5 mg/mL de estradiol
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol-colesterol (70:30)	5 mg/mL de estradiol
Suspensión acuosa de microesferas de estradiol-colesterol (80:20).	5 mg/mL de estradiol

### 3.1.3. DISEÑO DEL ESTUDIO

El diseño experimental del estudio de biodisponibilidad fue el siguiente:



Prospectivo, longitudinal, comparativo, de dosis única, en paralelo y con distribución al azar de los sujetos asignados a los tratamientos. Se utilizaron 6 sujetos (conejos) por grupo.

### 3.1.4. ASIGNACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS A LOS ANIMALES DE ESTUDIO

La asignación de cada una de las formas farmacéuticas a cada uno de los grupos de estudio fue de acuerdo a la siguiente tabla.

**TABLA 5. ASIGNACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO A LOS GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN**

FORMULACIÓN	DENOMINACION DEL GRUPO
MICROESF. 100% ESTRADIOL	A
MICROESF. (10:90) E <sub>2</sub> -COLEST.	B
MICROESF. (20:80) E <sub>2</sub> -COLEST.	C
MICROESF. (40:60) E <sub>2</sub> -COLEST.	D
MICROESF. (60:40) E <sub>2</sub> -COLEST.	E
MICROESF. (70:30) E <sub>2</sub> -COLEST.	F
MICROESF. (80:20) E <sub>2</sub> -COLEST.	G
<b>SOL. OLEOSA DE ESTRADIOL.</b>	H

Las proporciones manejadas corresponden a porcentaje de estradiol y colesterol presentes en la microesfera.

### 3.1.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL (31, 32)

El conejo es uno de los principales animales utilizados en la investigación de riesgos teratogénicos y el metabolismo de fármacos. Además, los conejos comúnmente son usados en la evaluación de formas farmacéuticas de administración tópica, tanto las que se utilizan en piel como las de ojos.

Como animal de laboratorio para estudios de absorción, distribución, metabolismo o excreción, el conejo tiene algunas ventajas sobre otros animales, una de ellas es que es relativamente económico y fácil de conseguir, mantener y si se emplean restrictores de movimiento del animal adecuados, la administración de fármacos, así como la toma de muestras



sanguíneas es más fácil que en otras especies animales comúnmente utilizadas en el laboratorio.

Se utilizaron conejos adultos, machos, clínicamente sanos, libres de ectoparásitos y endoparásitos, raza Nueva Zelanda blanco, con un peso aproximado entre 3 a 4 kg al inicio del estudio. Se alojaron los conejos en jaulas individuales de acero inoxidable con piso perforado de plástico esterilizable. Se utilizaron las siguientes condiciones ambientales en el área de almacenamiento: temperatura 16-22°C, humedad relativa 40-60%, ciclos de luz:oscuridad 12:12 horas tanto en cuarentena como durante el estudio. Se emplearon animales previamente aceptados de una cuarentena. Durante la cuarentena se dio un tratamiento profiláctico contra coccidiosis y se tomaron muestras fecales antes y después del tratamiento para un análisis coproparasitológico para determinar la ausencia de coccidia, así como un tratamiento tópico para prevenir la proliferación de ectoparásitos en las orejas. Los resultados del análisis determinaron la inclusión o rechazo de los animales en el estudio.

Se proporcionó alimento a libre acceso (*ad libitum*) para compensar la pérdida de peso debida a la transportación y adaptación a su nuevo ambiente, con alimento comercial de acuerdo a sus requerimientos nutricionales y libre de contaminantes. Durante el estudio se dio a los animales una ración diaria en materia seca equivalente a un 3% aproximadamente de su peso corporal (115-170 g) y se proporcionó diariamente agua fresca, potable y limpia.

Previo al día de la administración, se pesaron a los conejos y confirmó su identificación, se revisó su estado físico general y rasuró el pelo del cuarto trasero derecho o izquierdo para la administración de las formulaciones.

Se desinfectó la zona de administración. Se reconstituyeron las formas farmacéuticas de prueba, antes de su administración.

A cada grupo (6 conejos) se administró la forma farmacéutica de prueba o referencia, en el cuarto trasero derecho o izquierdo con agujas desechables con calibre No. 20. El volumen a administrar de las diferentes formas farmacéuticas fue el equivalente a una concentración de 5 mg/mL de estradiol; en el caso de la solución oleosa de estradiol, se ajustó el volumen de tal manera que se administró el equivalente a una concentración de 5 mg/mL de estradiol.



## **MUESTRAS SANGUÍNEAS Y PLASMÁTICAS**

Después de la administración intramuscular de los diferentes preparados se tomaron muestras sanguíneas de 1.5 a 2 mL aproximadamente por punción, ya sea de la vena marginal o arteria auricular de las orejas de los conejos. Se obtuvieron las muestras con jeringas equipadas con aguja heparinizada de calibre 21, 22 o 23. La sangre obtenida se colocó en tubos previamente adicionados con 50 UI de heparina .

Se obtuvieron muestras a las 0 (predosis), 1, 4 y 9 horas después de la administración, y cada 24 horas durante los siguientes 14 días. Después del día 14, las muestras fueron obtenidas cada tres días; hasta el día 29 de la administración.

Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Se separó el plasma y se depositó en criotubos perfectamente identificados de acuerdo a un código para hacer ciego el análisis de muestras a la formulación.

Se colocaron todas las muestras plasmáticas en contenedores adecuados y se almacenaron en un ultracongelador a  $-40^{\circ}$  C hasta el momento de realizar su análisis.

### **3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

Para realizar la cuantificación del estradiol que se liberó a partir de las formas farmacéuticas que se probaron en este estudio de biodisponibilidad, se requirió de un método que fuera confiable.

La cromatografía de gases masas (GC-MS) es una técnica sofisticada y costosa. Sin embargo, existen métodos alternativos con una sensibilidad comparable, para cuantificar las concentraciones de estradiol y que son más accesibles en cuanto a costos y rapidez de resultados, como es el caso del radioinmunoanálisis (RIA).

Para la evaluación de hormonas con fines de seguimiento clínico o terapéutico de fármacos, se han desarrollado un gran número de inmunoensayos, siendo éste el método de referencia para la evaluación de hormonas. Existe en la actualidad un gran número de casas comerciales que se dedican a la fabricación de estuches de inmunoensayos del tipo de radioinmunoanálisis para la cuantificación de hormonas con fines clínicos.



Los estuches comerciales que existen en el mercado cumplen con las características de calidad en su desempeño, sólo para la aplicación específica a la cual van a ser utilizados (por ejemplo: en validación, uso clínico, monitoreo de fármacos, etc) no para aplicaciones diferentes, por lo cual se ha implementado su evaluación en condiciones diferentes a su aplicación, como la evaluación de fármacos o compuestos en aplicaciones preclínicas (cuantificación en suero, plasma, sangre total; en especies como pueden ser conejos, ratas, etc).

Existen reportes (33,34,35,36,37) en revistas tanto nacionales como internacionales que especifican los parámetros de calidad a evaluar en los estuches que permiten decidir si los estuches a emplear están funcionando de manera adecuada para el uso que se persigue. Entre los parámetros de validación más importantes del método para cuantificación de estradiol en plasma están:

- Sensibilidad
- Precisión
- Exactitud
- Linealidad
- Especificidad
- Paralelismo

La fase analítica del estudio de biodisponibilidad de las diferentes formas farmacéuticas de estradiol y estradiol-colesterol en forma de suspensión de 5 mg constó de las siguientes actividades descritas en secuencia cronológica.

- a) Validación del método analítico, previa al inicio del estudio de biodisponibilidad (*in-vitro*).**
  
- b) Análisis de muestras de los animales empleados para el estudio de biodisponibilidad, validación del método analítico durante el estudio de biodisponibilidad (*in-vivo*).**



### 3.3. MÉTODO DE ANÁLISIS (35)

#### PREPARACIÓN DE MATERIAL UTILIZADO EN LA PRUEBA

Etiquetar cuatro tubos de polipropileno de 12x75 mm sin anticuerpo anti-estradiol, los cuales serán designados como de cuentas totales y de unión inespecífica por duplicado.

Etiquetar catorce tubos de polipropileno de los forrados con anticuerpo anti-estradiol designados para los de máxima unión A (0 pg/mL) y de B a G por duplicado para las concentraciones de (20 a 3600 pg/mL).

Colocar en cada uno de los tubos 100  $\mu$ L de cada uno de los calibradores. A los tubos marcados con A se les agrega el calibrador de 0 pg/mL, a los tubos del B al G se les coloca los calibradores de 20 a 3600 pg/mL de acuerdo a la siguiente tabla .

**TABLA 6. CONCENTRACIONES DE LOS CALIBRADORES DE ESTRADIOL PARA EL MÉTODO DE RADIOINMUNOANÁLISIS ( CURVA PATRÓN)**

CALIBRADOR	CONCENTRACIÓN (pg/mL)
A	0
B	20.0
C	50.0
D	150.0
E	500.0
F	1800.0
G	3600.0

Para muestras problema de plasma o suero, colocar 100  $\mu$ L de cada una de ellas en cada uno de los tubos de polipropileno forrados con el anticuerpo anti-estradiol.

Adicionar a todos los tubos 1.0 mL de estradiol I-125 y agitar con un agitador tipo vórtice (aproximadamente 10 segundos).

Incubar a 37°C durante 1 hora.



Decantar los tubos en una tarja destinada para verter desechos radiactivos. Escurrir completamente los tubos.

Contar la radiación emitida expresada en cuentas por minuto por 1 minuto en un contador gamma.

#### CALCULOS

Para obtener los resultados en términos de concentración es necesario realizar la construcción de gráficas LOG-LOGIT de las curvas de calibración; primero se calcula para cada par de tubos de cada una de las concentraciones que forman la curva patrón, el valor de cuentas por minuto promedio y se les resta el promedio del valor de cuentas de los tubos de unión inespecífica (NSB) cuentas inespecíficas por minuto.

***Cuentas corregidas = Cuentas promedio - cuentas promedio de los tubos de unión inespecífica (NSB).***

Después se determina el porcentaje de unión de cada par de tubos de cada una de las concentraciones que forman la curva patrón, tomando como porcentaje de máxima unión (%Bo) o 100%, al promedio de las cuentas de los tubos denominados A (0 pg/mL) corrigiendo el valor mediante la resta del número de cuentas de unión inespecífica.

***Porcentaje de unión = (Cuentas corregidas de X tubo / Cuentas promedio de los tubos de máxima unión corregidas) \* 100.***

Se puede realizar la construcción de la gráfica de la curva patrón por medio de papel LOG-LOGIT o por medio de la programación de las formulas anteriores utilizando una hoja de cálculo; graficando en el eje X al logaritmo decimal de la concentración y en el eje Y al valor de LOGIT, el cual se define de la siguiente manera:

***LOGIT = ln [porcentaje de unión / (100 - porcentaje de unión)]***  
***Ln = Logaritmo natural***



### 3.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA VALIDACIÓN DEL METODO DE RIA

#### PLASMA DE CONEJO

Obtener plasma de conejo adicionado de heparina, este se utilizó para la preparación de muestras adicionadas con estradiol a concentraciones conocidas en el estudio de biodisponibilidad y en la validación del método analítico para cuantificación de estradiol.

#### MUESTRAS ADICIONADAS

Preparar muestras plasmáticas adicionadas de estradiol a una concentración conocida, para esto utilizar los calibradores de 150, 500, 1800 y 3600 pg/mL de la curva patrón de los estuches para determinación de estradiol por RIA, los cuales se designan como S1, S2, S3 Y S4 respectivamente. Transferir las alícuotas correspondientes indicadas en la siguiente tabla y llevar a volumen con plasma conejo en matraces volumétricos de 10 mL.

**TABLA 7. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PLASMÁTICAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR RIA**

<b>CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL (pg/mL)</b>	<b>VOLUMEN DE CALIBRADOR (mL)</b>
<b>60.0</b>	(150 pg/mL) (S1) 4
<b>300.0</b>	(500 pg/mL) (S2) 6
<b>1080.0</b>	(1800 pg/mL) (S3) 6
<b>2160.0</b>	(3600 pg/mL) (S4) 6

Depositar las muestras adicionadas en criotubos Corning en alícuotas de 0.5 mL en cada tubo, almacenar a -40°C y descongelar hasta el momento de utilizar.



### **3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO ANTES DEL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD**

Los criterios adoptados para la validación del método analítico fueron los propuestos en la reunión "Analytical methods validation bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies". Realizada en diciembre de 1990 en Washington D.C. y otros artículos relacionados con validación de métodos analíticos, diferentes a los métodos cromatográficos, como es el caso de métodos que utilizan la técnica de radioinmunoanálisis. El método fue evaluado bajo los siguientes parámetros analíticos de validación. (33,34,36,37,38).

#### **3.5.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS NIVELES BASALES DE ESTRADIOL EN UNA MEZCLA DE PLASMAS**

Analizar por triplicado una mezcla de 6 lotes de plasma de conejos machos, la cual se conserva en congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de hacer la determinación. Los plasmas se obtuvieron de animales clínicamente sanos. Esta mezcla se realiza para poder tener una muestra representativa del plasma de los conejos.

En caso de observar sedimentación se centrifugan los plasmas a 3000 rpm durante 10 minutos y se dividen en porciones.

La cuantificación de los niveles basales de estradiol en la mezcla de plasma preparada, se realiza por triplicado y debe cumplir con el siguiente criterio de aceptación.

#### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Las tres réplicas probadas de la mezcla de plasmas no debe tener un coeficiente de variación mayor al 20%, dentro del intervalo de la curva patrón (niveles basales de estradiol). En el caso de que la concentración basal encontrada esté cercana a la menor concentración de la curva patrón, entonces se considerará como máximo un 25% de coeficiente de variación.

#### **3.5.2. LINEALIDAD**

Se procesa la curva patrón por duplicado tal como lo describe en la técnica del proveedor del estuche de RIA, para cada día de evaluación de linealidad.



El experimento de linealidad se lleva a cabo todos los días en que se realicen los experimentos de validación (4 días).

Obtener los parámetros de control de calidad de la curva patrón como son porcentaje de máxima unión (% Bo), porcentaje de unión inespecífica (% NSB), así como el conteo de fondo para I-125 y Co-57, para las curvas patrón. Realizar el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados para cada curva patrón, ordenada al origen (A), pendiente (B), coeficiente de determinación ( $r^2$ ), porcentaje de unión máxima, porcentaje de unión inespecífica, concentración equivalente al 50% de unión, error estándar de la pendiente y coeficiente de variación de la pendiente.

### **CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

Los criterios establecidos para la evaluación de las curvas patrón están dadas por el proveedor del estuche entre las cuales tenemos: un porcentaje de máxima unión de alrededor de 30%, un porcentaje de unión inespecífica de menos del 1%. En cuanto al coeficiente de determinación, este debe de ser mayor a 0.98. Los valores de pendiente y ordenada se determinan dentro de la validación del estuche, así como la concentración equivalente al 50% de unión, los cuales deberán ser reproducibles a lo largo de los días de la validación.

### **3.5.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN**

Para realizar este experimento se utilizan las muestras que se prepararon de acuerdo al punto 3.4 y se evalúa conjuntamente la precisión y exactitud inter e intradía. Realizar durante un periodo de 4 días lo siguiente:

- Exactitud y precisión interdía.- Analizar por triplicado 3 de los 4 días las muestras preparadas dentro del intervalo de trabajo seleccionado.
- Exactitud y precisión intradía.- Analizar durante el cuarto día las muestras preparadas por sextuplicado.
- Obtener la concentración interpolada de las muestras preparadas de acuerdo a su valor de respuesta en la curva patrón.
- Para cada muestra preparada, calcular el porcentaje de desviación absoluta, el promedio para cada concentración probada y coeficiente de variación, interpolando en la curva patrón las muestras preparadas, hacer esto para todos los días de los experimentos de precisión y exactitud.



## **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

En todos los casos el promedio de la exactitud determinada, no debe ser mayor al 20% respecto al valor nominal, excepto las concentraciones que se pruebe que estén cercanas a la concentración mínima cuantificable (menores al segundo punto de la curva patrón) donde será de hasta 25% respecto a la concentración nominal. La precisión evaluada por el coeficiente de variación de las réplicas preparadas no debe ser mayor de 20%. Para las muestras con concentraciones en la concentración mínima cuantificable, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 25%.

### **3.5.4. ESPECIFICIDAD**

Se emplearon los estándares de mayor concentración y de concentración cero de las curvas patrón de los siguientes compuestos con los cuales el estradiol podría tener reacción cruzada y fueron los siguientes:

Testosterona, Hormona Luteinizante, Hormona Folículo Estimulante y Globulina de Unión a Hormonas Sexuales.

Se evaluaron por triplicado cada uno de los compuestos anteriormente mencionados en el sistema de estradiol y se cuantificó la especificidad del estuche expresado como cantidad de estradiol que pudiera reaccionar.

Se obtuvieron los datos de concentración cuantificada de estradiol en los compuestos relacionados. Si se detectaba concentración para alguno de los compuestos relacionados, se calculó el porcentaje de reacción cruzada refiriendo la concentración detectada en el análisis respecto a la concentración probada del compuesto relacionado.

## **CRITERIO DE ACEPTACION**

La reacción cruzada para cualquiera de los compuestos evaluados debe ser menor al 1%.



### **3.5.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE**

Preparar las muestras para la realización de esta prueba a partir de uno de los calibradores de la curvas patrón del estuche de estradiol.

Realizar diluciones seriadas con un factor de dilución de 2, del calibrador de la curva patrón de estradiol 150 pg/mL, empleando el calibrador de concentración de 0 pg/mL de estradiol para diluir, hasta encontrar la concentración en la cual todavía se obtiene una precisión y exactitud adecuadas.

### **CRITERIO DE ACEPTACION**

La cantidad mínima cuantificable es aquella concentración la cual presenta una precisión (un coeficiente de variación máximo de 25%) y exactitud no mayor a  $\pm 25\%$ .

### **3.5.6. LIMITE DE DETECCIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE (35)**

La cantidad mínima detectable se calculó a partir de los resultados obtenidos de las curvas patrón preparadas para las pruebas de linealidad.

Con las respuestas de cada uno de los puntos de concentración cero de cada una de las curvas, se realizaron los siguientes cálculos:

Con los datos de la pendiente e intercepto de cada una de las curvas patrón preparadas se procedió a calcular la concentración mínima detectable empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = 10^{(\text{logit} - A)/B}$$

Donde:

A = Intercepto de la curva patrón.

B = Pendiente de la curva patrón

El cálculo de la función logit se obtiene del cálculo al 95% de unión. El valor de logit se interpola en la gráfica de logaritmo de la concentración contra el logit de la respuesta ó emplear la fórmula anteriormente descrita para obtener la concentración mínima detectable.



### **3.5.7. PARALELISMO**

La prueba de paralelismo se realiza en los métodos inmunológicos para demostrar que no existe efecto de la matriz biológica donde se encuentra el compuesto a cuantificar.

De las muestras preparadas en el punto 3.4 para determinar precisión y exactitud, se utilizó la correspondiente a la concentración de 2160 pg/mL y se prepararon por lo menos cinco diluciones seriadas con la ayuda del calibrador de concentración cero del estuche de Estradiol. Se tuvo la precaución de que las concentraciones se encontraran dentro del intervalo de concentración de la curva patrón, se probó por triplicado cada dilución preparada; con los datos obtenidos, se calcularon los porcentajes cuantificados para cada concentración, así como su desviación absoluta respecto a su concentración nominal y el coeficiente de variación para cada una de las diluciones preparadas.

### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Debe de cumplir con los criterios de la prueba de precisión y exactitud.

### **3.5.8. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO**

Se evaluó la estabilidad a largo plazo de las muestras preparadas en el punto 3.4, que se encontraban en congelación. El tiempo cero fue el correspondiente al primer día de análisis de precisión y exactitud.

Las muestras preparadas y almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  se descongelaron hasta el momento del análisis (30, 60 y 90 días). En cada tiempo de análisis, se obtuvo la concentración interpolada, el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada una de las muestras.

Adicionalmente se hicieron cartas de control para cada nivel de concentración, en las que se construyó la gráfica con la concentración interpolada y el tiempo de análisis.



### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Considerar que las muestras son estables a largo plazo, si la concentración interpolada cumple con los criterios de la prueba de precisión y exactitud.

#### **3.5.9. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A CICLOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN**

Se utilizan las muestras preparadas en el punto 3.4 las cuales se mantuvieron en congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Se realizó el experimento durante tres días, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y nuevamente se congelaron a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Se repitió la operación 3 veces. Una vez terminados cada uno de los ciclos de congelación-descongelación, se procesaron las muestras por triplicado.

### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Considerar que las muestras son estables a ciclos de congelación y descongelación, si la concentración interpolada cumple con los criterios establecidos para la prueba de precisión y exactitud.

#### **3.5.10. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA SOBRE LA MESA DE TRABAJO**

La evaluación de la estabilidad de las muestras preparadas, se realiza en un sólo día. Se descongelan las muestras preparadas en el punto 3.4 y se analizan por triplicado recién descongeladas y después de 5 horas de descongeladas. Para cada muestra se calcula la desviación absoluta y coeficiente de variación que presentaron con respecto a la concentración original determinada (0 horas).

### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN**

Se consideran las muestras estables sobre la mesa de trabajo, si la concentración interpolada cumple con los criterios establecidos para la prueba de precisión y exactitud.

### **3.6. ANALISIS DE MUESTRAS**

Después del estudio de biodisponibilidad, las muestras plasmáticas permanecieron almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su análisis en



donde se descongelaron hasta temperatura ambiente. Se analizaron las muestras plasmáticas de acuerdo al método descrito en el punto 3.3.

Para cada día de análisis de muestras se incluyó una curva patrón por duplicado consistente de seis puntos dentro del intervalo de trabajo (20- 3600 pg/mL) y los puntos control de calidad preparados se analizaron por triplicado, asegurándose así la exactitud y precisión de los resultados obtenidos. Se prepararon puntos control de calidad a 4 niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo (alto medio y bajo), los puntos control se procesaron por triplicado y se insertaron a lo largo de la corrida analítica, cada determinado número de muestras (aproximadamente cada 10 muestras). Las concentraciones de los puntos control de calidad fueron las mismas que se utilizaron durante la validación del método analítico.

Punto control A (PA-E)= 60 pg/mL

Punto control B (PB-E)= 300 pg/mL

Punto control C (PC-E)= 1080 pg/mL

Punto control D (PD-E)= 2160 pg/mL

### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN DE LA CORRIDA ANALITICA**

La concentración de los puntos control de calidad se utilizó como criterio para la aceptación o rechazo del análisis. Este criterio establece que no más de dos puntos control de calidad deberán estar fuera del intervalo de  $\pm 25\%$  del valor verdadero y no más de un punto en una misma concentración debe caer fuera del intervalo de  $\pm 25\%$ , con un coeficiente de variación máximo entre réplicas de cada uno de los niveles de concentración probado no mayor a 25%. En cada día se realizaron mediciones de adecuabilidad del sistema, mediante lecturas del conteo de la radiación de fondo presentada del ambiente y registrada por el equipo contador gamma. Los valores del conteo de fondo para I-125 debieron ser no mayores a 100 cpm con un óptimo de 60 cpm y para el Co-57 un máximo de 200 cpm y un óptimo de 100 cpm.

### **3.7. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Con las concentraciones cuantificadas de estradiol se procedió a realizar también el cálculo de los parámetros farmacocinéticos modelo independiente los cuales se describen a continuación:

Los parámetros farmacocinéticos a determinar fueron los siguientes:



- a) Concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ )
- c) Area bajo la curva de cero al último punto ( $ABC_t$ )
- d) Area bajo la curva de cero al infinito ( $ABC_{INF}$ )
- e) Tiempo en que se alcanza la concentración máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ )
- f) Tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ )
- g) Tiempo medio de residencia. (TMR).
- h) Constante de eliminación ( $K_{el}$ ).

Se empleo para los cálculos farmacocinéticos el siguiente software: Módulo Pharmacokinetics, Sistema Biopak ver. 2.0 y WiNonLin ver 3.3. Las fórmulas utilizadas para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se encuentran en APENDICE 1.

Para poder realizar la determinación de los parámetros farmacocinéticos de las formas farmacéuticas de Estradiol y colesterol evaluadas. Se analizaron los resultados de cada conejo para los 8 grupos por tiempo de muestreo; se calcularon los promedios a cada tiempo de muestreo para cada uno de los grupos de formas farmacéuticas probadas y se eliminaron del cálculo promedio aquellos valores de concentración individuales que eran tres veces mayores al valor de desviación estándar promedio.



**CAPITULO 4**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**



#### 4. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD

##### 4.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

##### 4.1.1. LINEALIDAD

La Tabla 8 presenta los valores de la pendiente (b), intercepto (a) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenidos a partir de los cálculos de regresión lineal para estradiol.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de parámetros de control de calidad de las curvas patrón preparadas en los días de la validación.

**TABLA 8. RESULTADOS DE LAS CURVAS PATRON PREPARADAS DURANTE LA VALIDACIÓN**

RESULTADOS DE CURVAS PATRON DE LA VALIDACIÓN DE ESTRADIOL			
DÍA	PENDIENTE	INTERCEPTO	$r^2$
1	-1.806	4.770	0.9984
2	-1.826	4.844	0.9989
3	-1.817	4.826	0.9984
4	-1.804	4.731	0.9989

**TABLA 9. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD DE CURVAS PATRÓN**

PARÁMETRO	PARÁMETROS DE CONTROL DE LAS CURVAS PATRÓN			
	DÍA			
	1	2	3	4
% DE MÁXIMA UNIÓN	30.78	30.39	30.70	31.87
% DE UNIÓN INESP.	0.25	0.27	0.25	0.28
CONC.EQUIV. AL 50% EN (pg/mL)	437.71	449.56	452.92	419.28

Para el % de máxima unión alrededor de 30%, para unión inespecífica menos de 1%



Las curvas patrón en el intervalo de 20 a 3600 pg/mL presentaron un coeficiente de determinación superior a 0.98, los valores de las pendientes e interceptos de las curvas patrón fueron similares en los diferentes días de la validación tal como se muestra en la tabla 8.

Para el parámetro de porcentaje de unión máxima ( porcentaje máximo que se puede unir del analito marcado al anticuerpo) y unión inespecífica para estradiol (porcentaje de estradiol que adicionado al sistema reacciona de manera inespecífica y no se une al anticuerpo), se obtuvieron resultados de alrededor de 31 y 0.26% respectivamente; estos valores se tomaron como referencia para futuras aplicaciones del método, debido a la consistencia que presentaron durante los días de la validación. Para el parámetro concentración equivalente al 50% de unión se encontró alrededor de 440 pg/mL para estradiol, para todos los días de validación del método, lo cual habla de que la concentración de estradiol obtenida, es equivalente a aquella en la que la reacción de competencia entre el estradiol proveniente de la muestra y el estradiol marcado, están en una relación 1:1. La probabilidad de unión al anticuerpo, fue prácticamente la misma los diferentes días de análisis, lo cual es un parámetro que habla del correcto desempeño del estuche utilizado y de la especificidad del anticuerpo para detectar al estradiol. Estos resultados se muestran en la tabla 9.

La evaluación de estos parámetros obtenidos a partir de las curvas patrón, nos indica la consistencia en el diseño y funcionamiento uniforme de los diferentes estuches al ser utilizados, dan seguimiento a las variaciones lote a lote que se pudieran presentar. Así mismo nos permiten evaluar la integridad y buen funcionamiento de cada uno de los componentes de los estuches como pueden ser los tubos forrados con anticuerpo y el trazador que contiene al analito o compuesto de Interés, estos dos elementos son importantes y requieren que se evalúen durante todo el periodo de la vida útil del estuche, ya que son la parte medular del radioinmunoanálisis.

#### **4.1.2. EXACTITUD Y PRECISION**

En las tablas 10 a 13 se muestran los resultados obtenidos para la exactitud y precisión inter e intradia obtenida para el método.



**TABLA 10. RESULTADOS DE LA EXACTITUD INTERDIA DE ESTRADIOL**

<b>RESULTADOS EXACTITUD INTERDIA ESTRADIOL</b>				
<b>CONC. NOMINAL (pg/mL)</b>	<b>DIA</b>			<b>PROMEDIO (%Error) n=9</b>
	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	
	<b>PORCENTAJE DE ERROR (%E)</b>			
<b>60</b>	0.27	22.78	18.03	
<b>60</b>	4.50	5.68	6.81	
<b>60</b>	6.96	3.26	13.53	<b>9.09</b>
<b>300</b>	1.83	2.11	4.91	
<b>300</b>	2.73	8.56	2.34	
<b>300</b>	24.04	4.63	2.25	<b>5.93</b>
<b>1080</b>	20.36	2.14	4.46	
<b>1080</b>	9.87	8.76	1.62	
<b>1080</b>	8.06	0.16	0.33	<b>6.20</b>
<b>2160</b>	15.66	2.70	8.12	
<b>2160</b>	15.76	9.44	6.91	
<b>2160</b>	12.08	3.04	4.83	<b>8.73</b>

**TABLA 11. RESULTADOS DE LA EXACTITUD INTRADIA DE ESTRADIOL**

<b>RESULTADOS EXACTITUD INTRADIA ESTRADIOL</b>				
<b>REPLICA</b>	<b>CONCENTRACION (pg/mL)</b>			
	<b>60</b>	<b>300</b>	<b>1080</b>	<b>2160</b>
	<b>% DE ERROR RESPECTO A LA CONC. NOMINAL</b>			
<b>1</b>	17.45	5.03	0.61	14.88
<b>2</b>	2.02	5.80	5.56	2.87
<b>3</b>	0.46	1.37	7.28	5.64
<b>4</b>	21.74	0.49	9.66	10.91
<b>5</b>	21.34	1.68	11.06	10.03
<b>6</b>	9.26	10.82	9.31	21.45
<b>PROMEDIO</b>	12.04	4.20	7.25	10.96



**TABLA 12. RESULTADOS DE LA PRECISION INTERDIA DE ESTRADIOL**

<b>RESULTADOS DE PRECISION INTERDIA ESTRADIOL</b>				
<b>CONCENTRACION pg/mL</b>				
<b>DIA</b>	<b>60</b>	<b>300</b>	<b>1080</b>	<b>2160</b>
<b>1</b>	60.159	305.492	1299.908	1821.851
	62.703	308.192	973.419	1819.650
	55.822	372.134	1167.051	1899.139
<b>2</b>	73.670	306.336	1056.866	2101.681
	63.405	325.688	1174.633	2364.006
	61.954	313.893	1078.262	2225.579
<b>3</b>	49.181	314.726	1031.882	1984.708
	55.916	292.987	1097.524	2010.708
	68.119	293.254	1076.400	2055.636
<b>PROMEDIO(pg/mL)</b>	61.214	314.745	1106.216	2031.440
<b>N</b>	9	9	9	9
<b>D.E.</b>	7.189	23.845	95.682	181.214
<b>C.V.</b>	11.74	7.58	8.65	8.92
<b>COEF. DE VARIACION INTERDIA PROMEDIO</b>				9.22

**TABLA 13. RESULTADOS DE LA PRECISION INTRADIA**

<b>RESULTADOS DE PRECISION INTRADIA ESTRADIOL</b>				
<b>CONCENTRACION (pg/mL)</b>				
<b>REPLICA</b>	<b>60</b>	<b>300</b>	<b>1080</b>	<b>2160</b>
<b>1</b>	49.528	315.090	1073.372	1838.636
<b>2</b>	58.790	317.411	1140.011	2098.087
<b>3</b>	59.724	304.107	1001.420	2038.097
<b>4</b>	46.955	301.480	975.673	1924.440
<b>5</b>	47.196	305.031	960.549	1943.339
<b>6</b>	54.446	267.540	979.503	1696.739
<b>N</b>	6	6	6	6
<b>PROMEDIO</b>	<b>52.773</b>	<b>301.776</b>	<b>1021.755</b>	<b>1923.223</b>
<b>D.E.</b>	5.706	17.944	70.310	143.269
<b>C.V.</b>	10.81	5.95	6.88	7.45
<b>COEF. DE VARIACION INTRADIA PROMEDIO</b>				7.77



Las muestras evaluadas de concentración conocida 60, 300, 1080 y 2160 pg/mL, cumplieron con los criterios de precisión y exactitud establecida en la validación. Los resultados referentes a las evaluaciones de precisión y exactitud se describen a continuación.

### **EXACTITUD**

El porcentaje de error de las concentraciones calculadas respecto a la concentración nominal se presenta en las tablas 10 y 11 para cada concentración probada. El porcentaje de error absoluto con respecto a la concentración nominal en los días de las pruebas inter como intradía fueron de aproximadamente 6-9% y de aproximadamente 4-12% respectivamente, cumpliendo con los criterios establecidos para la validación del método, ya que el porcentaje de error máximo permitido es de 25% para estas metodologías.

### **PRECISION**

Para la precisión interdía obtenida de tres días de análisis, realizando tres repeticiones de la cuantificación por concentración, se encontró en un CV 9.22% . Para la precisión intradía obtenida de seis repeticiones de la cuantificación por concentración, se encontró una CV de 7.77% , tal como se indica en las tablas 12 y 13, cumpliendo con los criterios establecidos para la validación del método de permitir un coeficiente de variación máximo de 25%.

#### **4.1.3. ESPECIFICIDAD (39)**

En la tabla 14 se muestran los resultados de la prueba de especificidad de estradiol.



TABLA 14. RESULTADOS DE ESPECIFICIDAD

RESULTADOS ESPECIFICIDAD		
SUSTANCIA	CONC. CUANTIF. ESTRADIOL (pg/mL)	PORCENTAJE DE REACCION CRUZADA
HL 0 mUI/mL	26.003	0
HL 300 mUI/mL	125.544	0.006
T 0 ng/mL	0.283	0
T 16 ng/mL	11.289	0.070
SHBG 0 nmol/L	0.000	0
SHBG 157 nmol/L	936.988	0.007
SHBG 84 nmol/L	405.514	0.005
HFE 0 mUI/mL	0.000	0
HFE 100 mUI/mL	0.000	0
<b>SHBG 157 nmol/L</b>	<b>equivalente a <math>1.41 \cdot 10^7</math> pg/mL de estradiol</b>	
<b>SHBG 84 nmol/L</b>	<b>equivalente a <math>7.56 \cdot 10^6</math> pg/mL de estradiol</b>	
<b>HL 1 mUI/mL</b>	<b>equivale a 7400pg/mL</b>	
<b>REFERENCIA: (39)</b>		

HL: Hormona luteinizante, HFE: Hormona foliculo estimulante, T: Testosterona, SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales.

Para evaluar la reacción cruzada para el método de cuantificación de estradiol, se utilizaron compuestos de naturaleza química similar al estradiol o que tienen una relación fisiológica con este y que pudieran interferir al estar presentes en la misma matriz biológica. Para esto se probaron sustancias como Testosterona (T), Hormona Foliculo Estimulante (HFE), Hormona luteinizante (HL) y globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), a concentraciones conocidas. Se observó en los resultados obtenidos que se presentó reacción inespecífica en algunos de los calibradores de los compuestos que se probaron. La reacción inespecífica se presentó tanto en ausencia del compuesto a probar, como en concentraciones altas del mismo; en el caso de los calibradores de la hormona foliculo estimulante que se probaron no se presentó reacción inespecífica.

En el caso de la testosterona, globulina de unión a hormonas sexuales y hormona luteinizante, que presentaron reacción inespecífica, se investigó en



la literatura sobre posibles equivalencias entre concentraciones de estradiol y los compuestos anteriormente referidos, con la información obtenida se realizaron las transformaciones correspondientes, se calcularon los porcentajes de reacción inespecífica para cada compuesto y se encontró que fue menor al 1%, lo cual está dentro de los criterios establecidos en la validación, que indica que la especificidad del estuche para detectar al estradiol es adecuada.

#### 4.1.4. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE

Los resultados de la prueba de límite de cuantificación se encuentran en la Tabla 15.

**TABLA 15. RESULTADOS DE LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE**

**RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE (LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN)**

<b>NIVEL DE CONCENTRACIÓN (pg/mL)</b>	<b>CONC. CUANTIFICADA (pg/mL)</b>	<b>PORCENTAJE DE ERROR (%E)</b>	<b>PROMEDIO (pg/mL) *(C.V.)</b>
150	161.1	7	
150	176.0	17	168.2
150	167.6	12	*(4.4)
75	77.5	3	
75	85.3	14	78.2
75	71.7	4	*(8.7)
37.5	41.2	10	
37.5	40.0	7	39.8
37.5	38.2	2	*(3.8)
20	19.2	4	
20	16.9	16	18.0
20	17.9	11	*(6.6)
18.75	9.6	49	
18.75	10.0	47	13.3
18.75	20.3	8	*(45.6)

Al realizar las diluciones del calibrador de 150 pg/mL se encontró que las concentraciones obtenidas en las diluciones guardaron una

proporcionalidad, encontrándose en las diluciones de 150 a 37.5 pg/mL una concentración ligeramente superior a la esperada, sin embargo las concentraciones cuantificadas cumplieron tanto con la precisión como exactitud fijada en la validación y se encontró que en la dilución con concentración nominal 20 pg/mL los valores cuantificados fueron ligeramente menores de los 20 pg/mL, pero cumplieron con la precisión y exactitud pedida en la validación. Por debajo de los 20 pg/mL se observó que no se tiene ni buena precisión ni exactitud, por lo cual se estableció como concentración mínima cuantificable o límite de cuantificación.

#### **4.1.5. LÍMITE DE DETECCIÓN O CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE**

Se calculó de acuerdo a la fórmula citada en el punto 3.5.6. y con los datos obtenidos en las curvas patrón se encontró un valor de alrededor de 4.2 pg/mL para estradiol, este valor es detectado y diferenciado de lo que podría ser cuantificado por el fondo natural y las uniones inespecíficas que ocurren en el sistema.

#### **4.1.6. PARALELISMO**

Los resultados de la prueba de paralelismo se encuentran indicados en la tabla 16.



TABLA 16. RESULTADOS DE PARALELISMO

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE PARALELISMO			
NIVEL DE CONCENTRACIÓN (pg/mL)	CONC. CUANTIFICADA (pg/mL)	PORCENTAJE DE ERROR	PROMEDIO (pg/mL) *(C.V.)
2160	1929.5	11	1821.7
2160	1785.0	17	*(5.2)
2160	1750.8	19	
1080	887.1	18	899.7
1080	921.3	15	*(2.1)
1080	890.9	18	
540	474.8	12	448.9
540	425.4	21	*(5.5)
540	446.6	17	
270	281.0	4	289.4
270	297.5	10	*(2.8)
270	289.8	7	
135	120.0	11	123.6
135	132.0	2	*(5.9)
135	118.8	12	
67.5	59.3	12	55.9
67.5	56.3	17	*(6.4)
67.5	52.2	23	

Aunque la muestra de concentración nominal 2160 pg/mL, presentó una concentración menor, lo cual se debió a su manera de preparación, la concentración cuantificada inicial cumplió con los criterios de precisión y exactitud pedidos durante la validación y al realizar las diluciones de esta muestra se observó que las diluciones preparadas guardaron una proporcionalidad en cuanto a la concentración cuantificada y que cumplió tanto con los criterios de precisión como de exactitud. Con esto se demostró que no hubo efecto por parte de los componentes del plasma de conejo que se utilizó para preparar la muestra de 2160 pg/mL que desviaran o modificaran la proporcionalidad de las cuantificaciones realizadas a las diferentes diluciones ensayadas, lo cual es uno de los requisitos que se deben cumplir para considerar que existe paralelismo en el método de análisis y ningún efecto de los componentes de la matriz biológica donde se encuentra el estradiol (definición de paralelismo) (40).



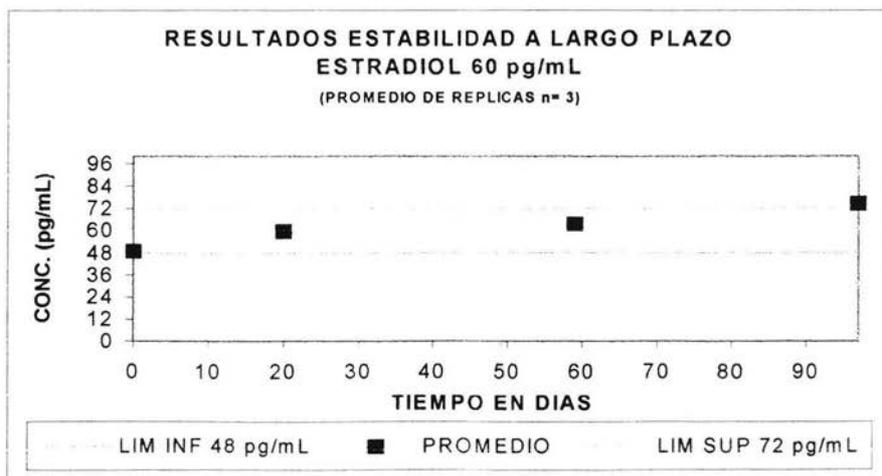
#### 4.1.7. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

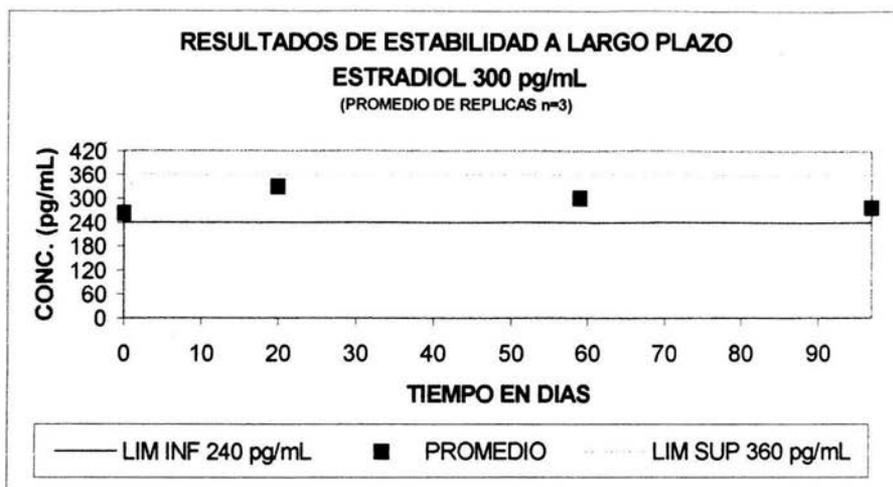
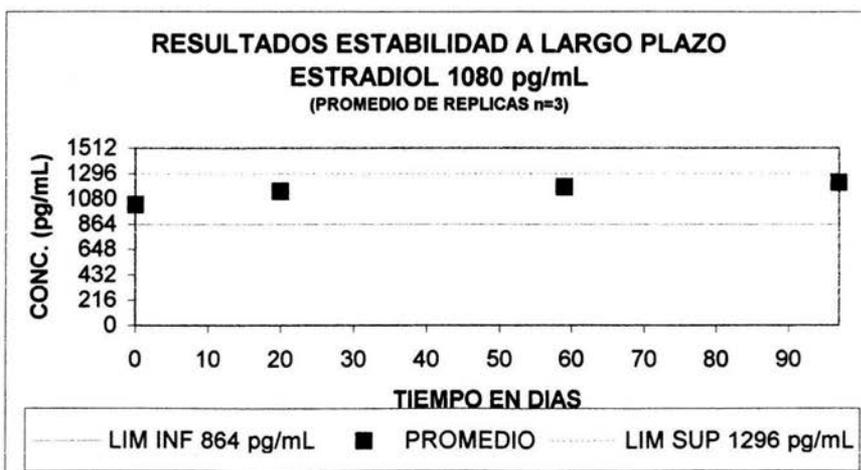
Los resultados de la estabilidad a largo plazo se muestran en la tabla 17 y las figuras 15 a 18

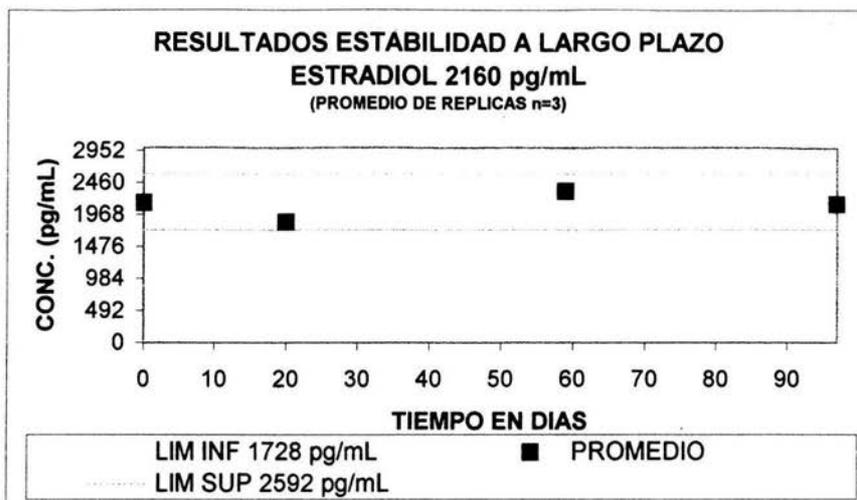
TABLA 17. RESULTADOS DE ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

RESULTADOS DE ESTABILIDAD A LARGO PLAZO ESTRADIOL				
CONC. NOMINAL (pg/mL)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO EN (pg/mL)			
	0 DIAS	20 DIAS	59 DIAS	97 DIAS
60	49.016	59.561	63.436	74.285
300	262.106	328.606	299.678	276.328
1080	1031.925	1146.793	1180.752	1218.751
2160	2146.762	1846.880	2329.995	2126.869
PORCENTAJE DE ERROR CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN NOMINAL				
CONC. NOMINAL (pg/mL)	0 DIAS	20 DIAS	59 DIAS	97 DIAS
60	-18.31	-0.73	5.73	23.81
300	-12.63	9.54	-0.11	-7.89
1080	-4.45	6.18	9.33	12.85
2160	-0.61	-14.50	7.87	-1.53

FIGURA 15. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 60 pg/mL



**FIGURA 16. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 300 pg/mL****FIGURA 17. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 1080 pg/mL**

**FIGURA 18. ESTABILIDAD A LARGO PLAZO 2160 pg/mL**

En la evaluación a largo plazo de las muestras preparadas, se encontró que hasta por un periodo de aproximadamente dos meses se siguen cumpliendo con los criterios de precisión y exactitud establecidos para la validación y cuantificación de muestras; con esto se pudo demostrar el periodo de tiempo dentro del cual se pueden analizar las muestras sin ningún problema derivado por inestabilidad de las muestras.

#### **4.1.8. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN**

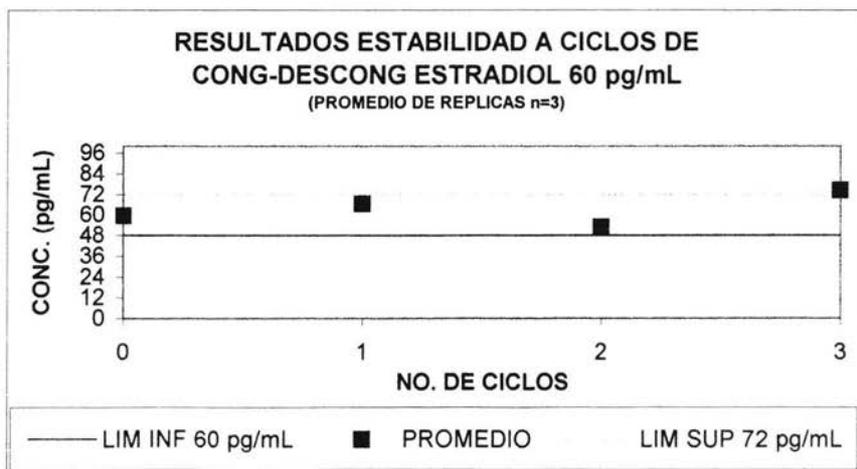
Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 18 y las figuras 19 a 22.



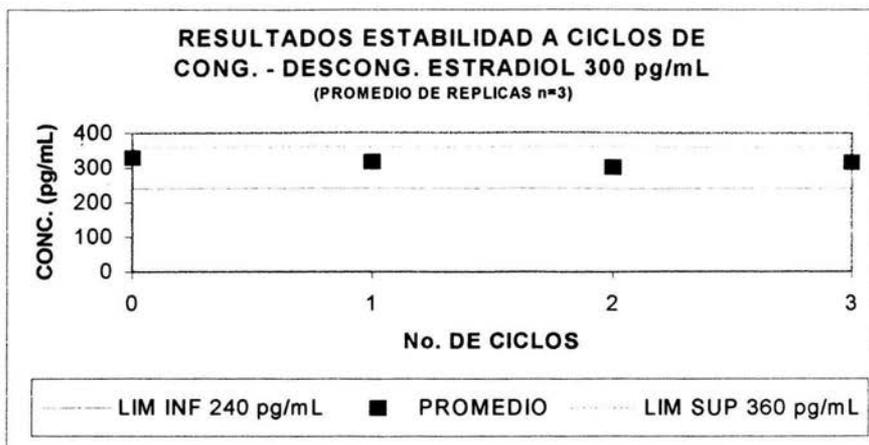
**TABLA 18. RESULTADOS DE ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN  
DESCONGELACIÓN**

<b>RESULTADOS DE ESTABILIDAD A CICLOS DE CONG.-DESC. ESTRADIOL</b>				
<b>CONC. NOMINAL (pg/mL)</b>	<b>CONCENTRACIÓN PROMEDIO EN (pg/mL)</b>			
	<b>0 CICLOS</b>	<b>1 CICLO</b>	<b>2 CICLOS</b>	<b>3 CICLOS</b>
<b>60</b>	59.561	66.343	52.686	74.317
<b>300</b>	328.606	315.306	301.303	314.617
<b>1080</b>	1146.793	1103.254	1071.346	991.821
<b>2160</b>	1846.880	2230.422	2011.628	1917.488
<b>PORCENTAJE DE ERROR CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN NOMINAL</b>				
<b>CONC. NOMINAL (pg/mL)</b>	<b>0 CICLOS</b>	<b>1 CICLO</b>	<b>2 CICLOS</b>	<b>3 CICLOS</b>
<b>60</b>	-0.73	10.57	-12.19	23.86
<b>300</b>	9.54	5.10	0.43	4.87
<b>1080</b>	6.18	2.15	-0.80	-8.16
<b>2160</b>	-14.50	3.26	-6.87	-11.23

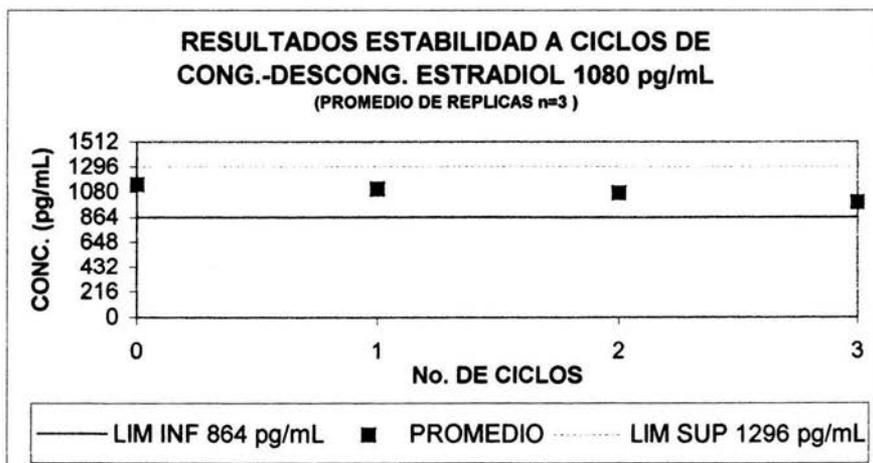
**FIGURA 19. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN  
DESCONGELACIÓN  
60 pg/mL**



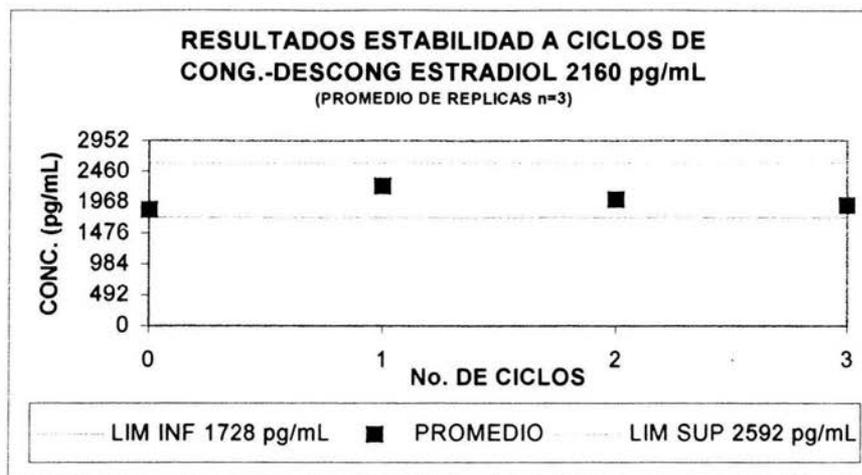
**FIGURA 20. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN  
DESCONGELACIÓN  
300 pg/mL**



**FIGURA 21. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN  
DESCONGELACIÓN  
1080 pg/mL**



**FIGURA 22. ESTABILIDAD A CICLOS DE CONGELACIÓN  
DESCONGELACIÓN  
2160 pg/mL**



Para la evaluación de estabilidad del método de cuantificación de estradiol hasta dos ciclos de congelación descongelación siguen cumpliendo con los criterios establecidos en la validación, lo cual fue importante para conocer el número máximo de ciclos de congelación descongelación, donde la cuantificación de Estradiol no se ve afectada en su precisión o exactitud.

#### 4.1.9. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO

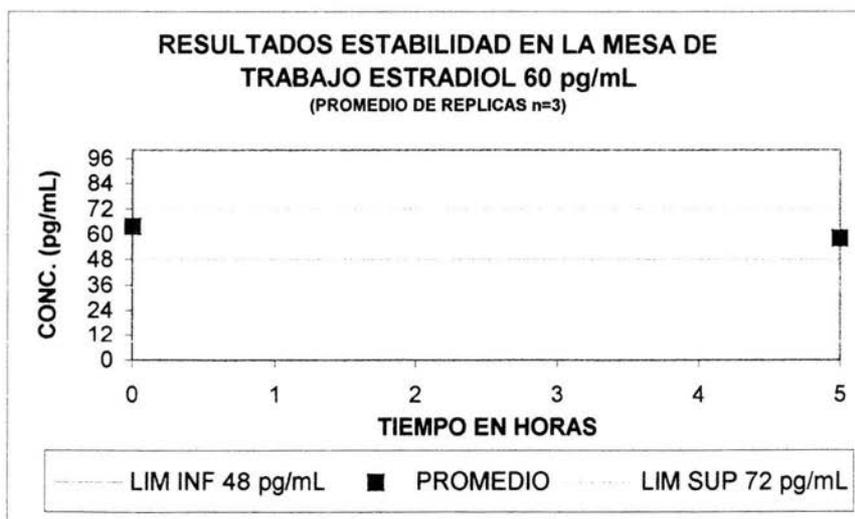
Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 19 y las figuras 23 a 26.



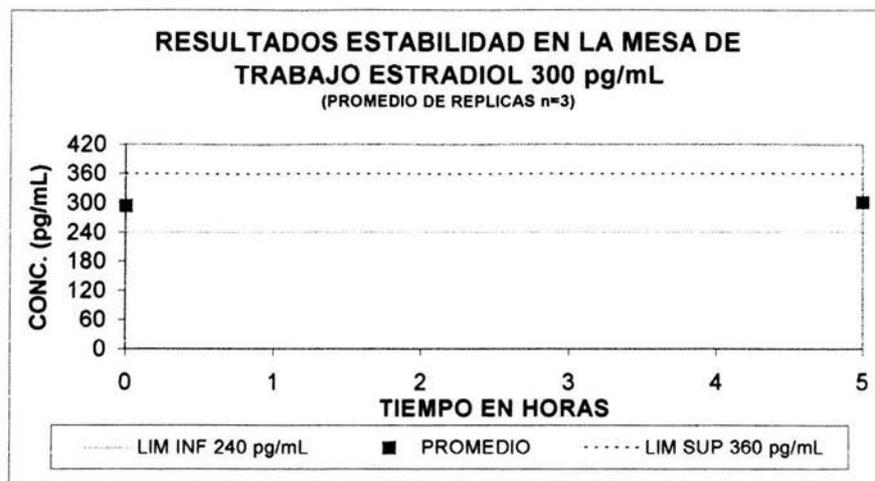
TABLA 19. RESULTADOS DE ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO

RESULTADOS DE ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO ESTRADIOL		
CONC. NOMINAL (pg/mL)	CONCENTRACION PROMEDIO EN (pg/mL)	
	CERO HORAS	CINCO HORAS
60	63.800	58.100
300	294.000	300.300
1080	1004.400	1062.300
2160	2295.600	2338.300
PORCENTAJE DE ERROR CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN NOMINAL		
CONC. NOMINAL (pg/mL)	PORCENTAJE DE ERROR	
	CERO HORAS	CINCO HORAS
60	6.33	-3.17
300	-2.00	0.10
1080	-7.00	-1.64
2160	6.28	8.25

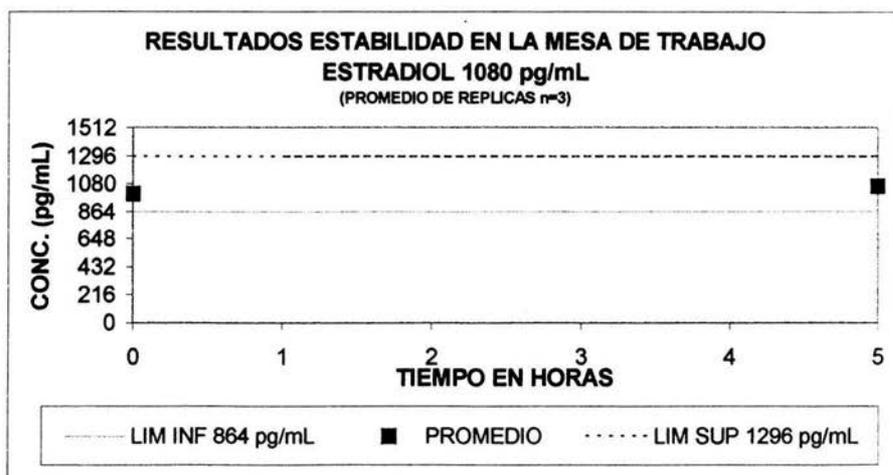
FIGURA 23. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 60 pg/mL

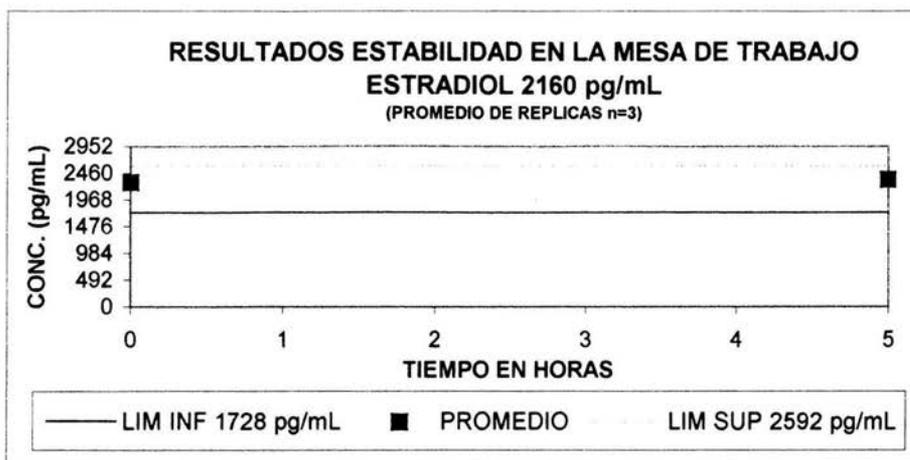


**FIGURA 24. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 300 pg/mL**



**FIGURA 25. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 1080 pg/mL**



**FIGURA 26. ESTABILIDAD EN LA MESA DE TRABAJO 2160 pg/mL**

La estabilidad del estradiol en la mesa de trabajo es de 5 horas después de que se ha descongelado, ya que en este intervalo cumple con los criterios establecidos en la validación para precisión y exactitud, que es importante para poder distribuir los tiempos de procesamiento y análisis de las muestras.

## 4.2. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD

### 4.2.1. ANALISIS DE RESULTADOS DEL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD

A partir de las concentraciones cuantificadas de estradiol en las muestras de los conejos, se realizaron gráficas de la concentración contra tiempo de cada una de las combinaciones de microesferas de estradiol y estradiol-colesterol evaluadas.

De las comparaciones entre gráficas realizadas y del cálculo de los parámetros farmacocinéticos utilizando los programas WinNonline y Biopak, se procedió a discutir los resultados.



## **CALCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS**

Los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva (ABC<sub>29</sub> y ABC<sub>INF</sub>) tiempo medio de residencia (TMR), área bajo la curva al infinito (ABC<sub>INF</sub>), la constante de eliminación (kel) y vida media (t<sub>1/2</sub>) fueron calculados pero en algunos casos no se pudo realizar el cálculo debido a que para su cálculo se requiere de los datos de la parte final de los perfiles. En algunos casos esto no fue posible ya que de la última porción de datos de los perfiles, si se extrapolaran al infinito estos no cruzan con el eje de las x (tiempo) al tiempo de finalizado el estudio. Lo cual impide hacer una medición exacta. En algunos reportes se ha encontrado que en este tipo de formas farmacéuticas suelen presentarse fases secundarias de liberación prolongadas (41), por la cual al momento de finalizar la toma de muestras en el estudio algunas de las formas farmacéuticas evaluadas todavía presentaban niveles altos de estradiol.

Para poder realizar la comparación y análisis de resultados de los parámetros farmacocinéticos calculados para las diferentes proporciones de estradiol y colesterol probadas en este estudio se analizaron los resultados por grupos de formas farmacéuticas.

Las comparaciones que se describen a continuación, primero se discutirán con base en las observaciones a partir de los gráficos realizados y posteriormente con base en los datos numéricos, estas comparaciones numéricas se hicieron con los datos promedio obtenidos para cada forma farmacéutica probada y mediante un análisis de varianza ANOVA con un 95% de confianza.

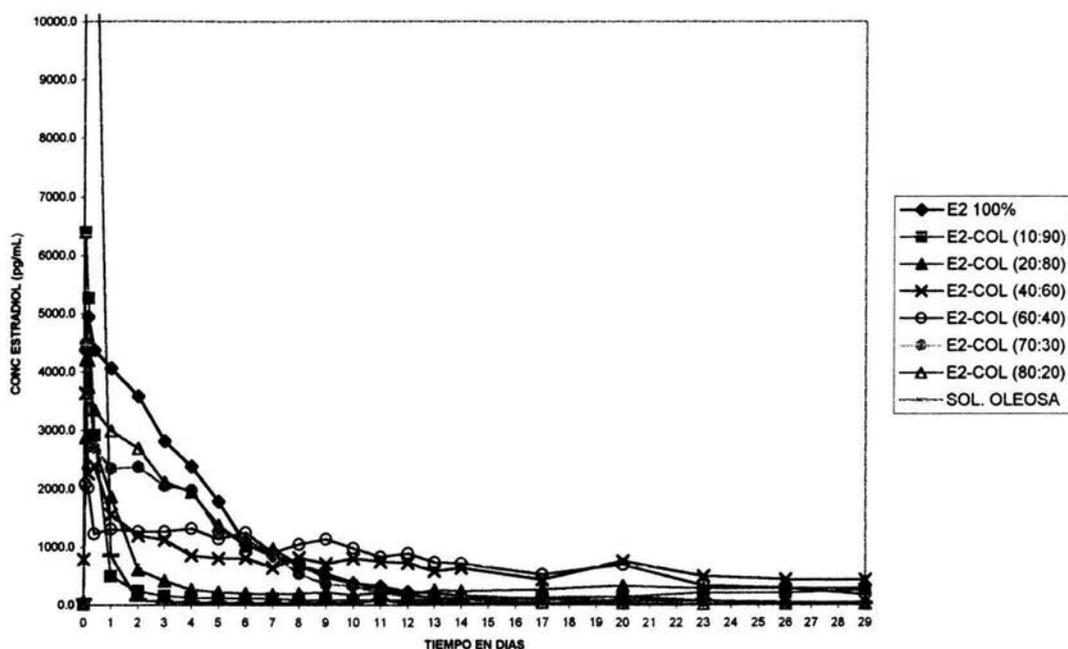
Los resultados de los parámetros farmacocinéticos se muestran a continuación.

### **ANÁLISIS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y ESTRADIOL-COLESTEROL EN DIFERENTES PROPORCIONES RESPECTO A UNA SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL**

En el gráfico comparativo de las formas farmacéuticas de microesferas respecto a la solución oleosa de estradiol se observa que la solución oleosa de estradiol presenta un pico de concentración muy alto C máx 74500.6 pg/mL respecto a lo obtenido en las microesferas de estradiol-colesterol, (microesferas de estradiol-colesterol (10:90)



C máx 6425.3 pg/mL, 11.6 veces mayor) y al de menor concentración (microesferas de estradiol-colesterol (60:40) C máx 2280 pg/mL 32.6 veces mayor). La caída de la concentración de estradiol en la solución oleosa probada es muy rápida, aproximadamente en dos días de haber sido administrada. No así para las microesferas de estradiol y estradiol-colesterol. Estos resultados indicaron que tanto la forma farmacéutica probada como la adición de colesterol tienen un control en la liberación del estradiol. Los resultados de la concentración de las microesferas probadas y la solución oleosa se encuentran en las tablas 20 a 23 y en la figura 27.



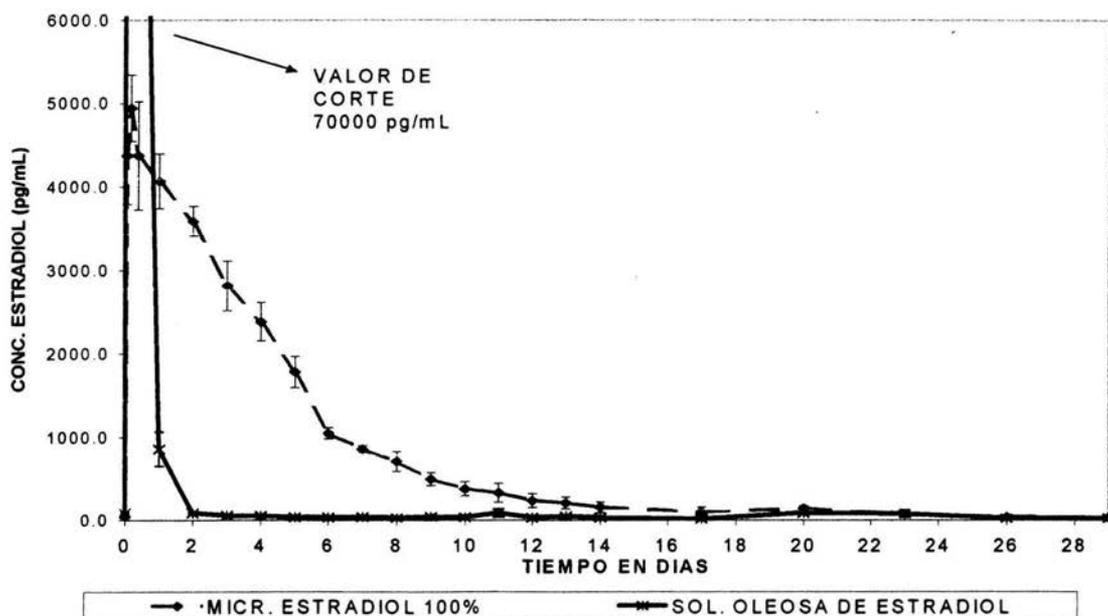
n=6

**FIGURA No. 27 GRÁFICO PROMEDIO DE COMPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN OLEOSA Y LAS MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL EN LAS DIFERENTES PROPORCIONES PRUBADAS DOSIS 5 mg**



## ANÁLISIS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL

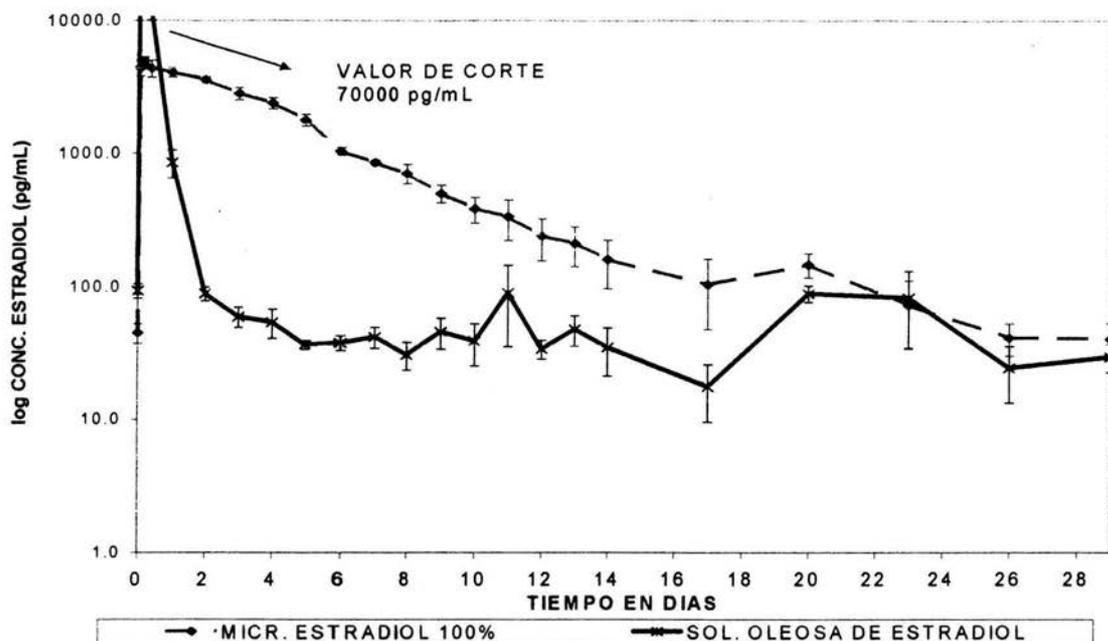
Al ver los gráficos de concentración contra tiempo de ambas formas farmacéuticas se observaron diferencias en la forma del perfil, con una liberación inmediata del estradiol a partir de la solución oleosa. Las microesferas tienen una liberación más lenta, lo que nos indica que esta forma farmacéutica tiene un efecto de control de la liberación. Los resultados de concentración de estradiol de estas microesferas se encuentran en la tabla 20 y las figuras 28 y 29.



PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 28 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL DOSIS 5mg.**





PROMEDIO  $\pm$  E.E. n= 6

**FIGURA No. 29 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCION OLEOSA DE ESTRADIOL (semilogaritmica) DOSIS 5 mg.**

Los parámetros farmacocinéticos calculados para estas formas farmacéuticas se encuentran en las tablas 24 y 25. Se presentan diferencias entre ambas formas farmacéuticas en los valores de concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), en el tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ), constante de eliminación fase terminal ( $K_{el}$ ), tiempo medio de residencia (TMR) y vida media ( $t_{1/2}$ ), no así para el área bajo la curva (ABC) a 29 días y al infinito.

La  $C_{m\acute{a}x}$  de la solución oleosa presenta un valor 14 veces más alto (74500.6 pg/mL) que la formulación de microesferas de estradiol puro (5216 pg/mL), esto es debido a las diferencias de forma farmacéutica, en el caso de la solución oleosa está disponible en mayor cantidad para ser

absorbido (no hay pasos previos como de disolución para estar disponible), en la formulación de microesferas de estradiol puro, debe haber un proceso de disolución previo. Esto también se refleja en el valor de  $T_{m\acute{a}x}$ , donde debido a la disponibilidad inmediata del estradiol en la solución oleosa (0.06 días) el valor es 3 veces menor que para las microesferas de estradiol puro (0.16 días).

Los valores de constante de eliminación y vida media fueron calculados de la parte terminal de los perfiles, encontrándose que hay una mayor permanencia de la formulación de microesferas de Estradiol en los conejos que en la solución oleosa; para las microesferas de Estradiol se observa una vida media de alrededor de 4.9 días 24 veces mayor que la de la solución oleosa de alrededor de 0.2 días. Al realizar el cálculo del tiempo medio de residencia (TMR) se corrobora este comportamiento, mayor permanencia de las microesferas de Estradiol sobre la solución oleosa.

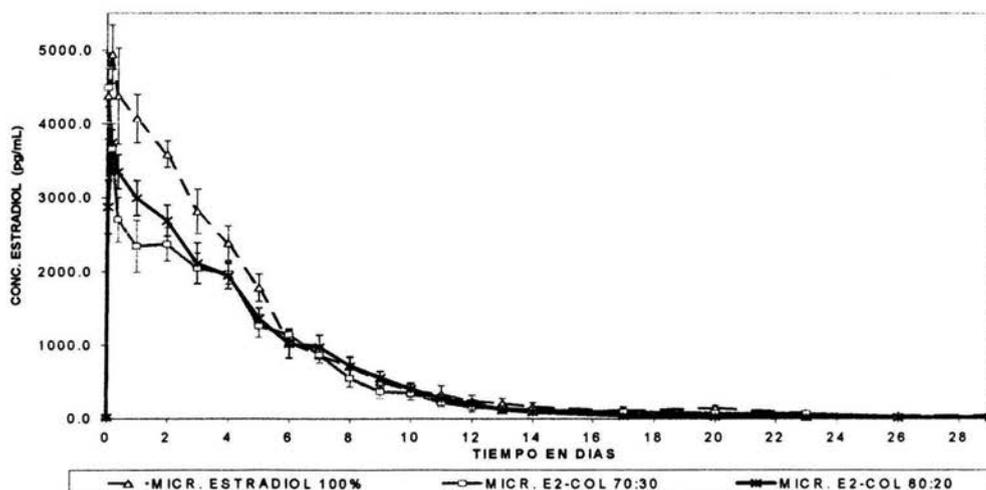
Con la evaluación de estas dos formas farmacéuticas se observa que las microesferas de estradiol tienen una biodisponibilidad relativa respecto a la solución oleosa de estradiol ligeramente mayor, lo cual se explica porque en la porción terminal del perfil de microesferas de estradiol (26-29 días), la caída de los niveles de estradiol sigue lenta, ya que dentro de este intervalo la concentración de estradiol, es prácticamente la misma y se sigue liberando estradiol hasta los 29 días, no así para la solución oleosa, lo cual justifica el tener un valor de área bajo la curva ligeramente mayor. (Ver figuras 28 y 29 y tablas 24 y 25). Se observa también que tienen un pico de  $C_{m\acute{a}x}$  menor al de las soluciones oleosas y por lo tanto las fluctuaciones de concentración son menores y esto es una ventaja porque los efectos adversos son menores, que además de presentar una permanencia mayor en el organismo (41, 42, 43) dan buenas perspectivas terapéuticas. El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre ambas formas farmacéuticas en concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), constante de eliminación terminal ( $K_{el}$ ), vida media ( $t_{1/2}$ ) y no hay diferencia significativa en  $ABC_{29}$  días.

Los resultados obtenidos sugieren que el control de la liberación del estradiol a partir de las formas farmacéuticas de microesferas pueden ser por mecanismos de degradación de la estructura de la microesfera al estar en contacto con los fluidos biológicos. Este fenómeno se ha descrito para microesferas de otros compuestos fabricadas de manera similar a la aquí empleada para las microesferas de estradiol e indican que el control de la liberación se lleva a cabo por medio de la degradación de la estructura de las microesferas (44).



## ANÁLISIS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y ESTRADIOL-COLESTEROL (70:30) Y (80:20)

Las microesferas de estradiol-colesterol 70:30 y 80:20 tienen la menor cantidad de colesterol presente en sus formas farmacéuticas. Por lo que su comportamiento es similar al de las microesferas de Estradiol puras. Sin embargo, se presenta una modificación en la forma de liberación del estradiol cuando el colesterol está presente, esto se observa tanto en las microesferas de estradiol-colesterol 70:30 como 80:20, un valor de C máx menor al presentado por las microesferas de estradiol puras. En los primeros tiempos de muestreo y hasta el día 6 se observa una liberación rápida de Estradiol, después del día 6 la forma de la liberación de las microesferas es muy parecida a la de las microesferas puras de Estradiol. Los resultados de concentración se muestran en la tabla 22.



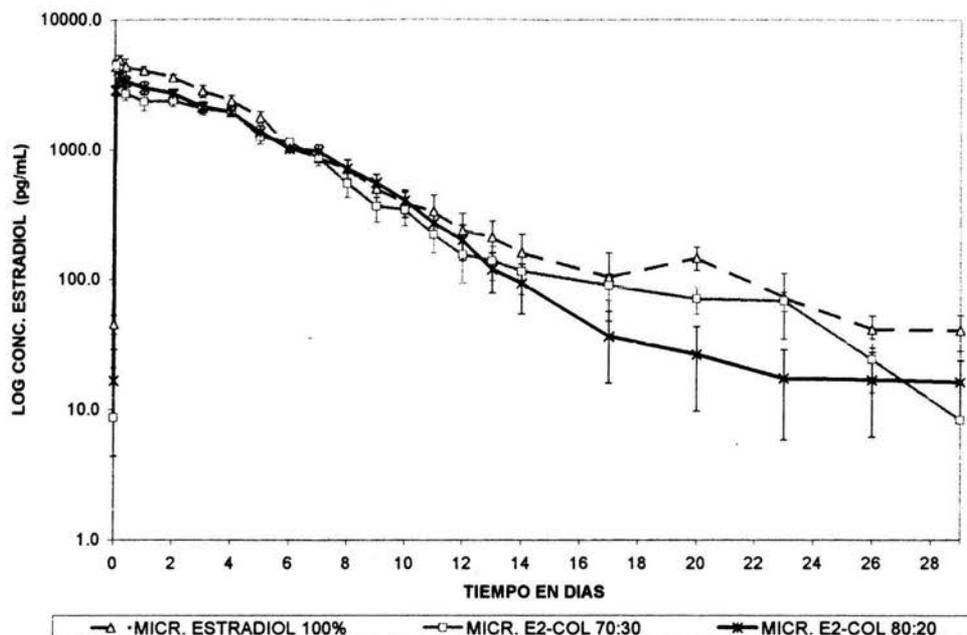
PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 30 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 70:30 Y 80:20 DOSIS 5 mg**



Biofarmacia

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 31 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 70:30 Y 80:20. (semilogarítmica) DOSIS 5 mg.**

Los resultados de los parámetros farmacocinéticos calculados para estas formas farmacéuticas se encuentran en las tablas 24 y 25. Estas formas farmacéuticas presentaron perfiles muy semejantes, las mayores diferencias se observaron en las fases de distribución y menores en la fase de eliminación. Ver figuras 30 y 31. Al ver los resultados numéricos de los parámetros farmacocinéticos podemos decir lo siguiente: el  $C_{máx}$  de las microesferas de estradiol colesterol 80:20 (3320.4 pg/mL) es 1.6 veces menor respecto a las microesferas de estradiol puro (5216.0 pg/mL) y para las 70:30 (4297.0 pg/mL) es 1.2 veces menor respecto a las microesferas de estradiol puro, microesferas de Estradiol puro. La presencia del colesterol, ayuda al control de la liberación del estradiol a partir de la



microesfera, lo que se corrobora por la disminución en el  $C_{m\acute{a}x}$ . Para el valor de  $T_{m\acute{a}x}$  no se presentaron diferencias entre las tres formulaciones. Para el ABC a 29 días e infinito para las tres formas farmacéuticas son comparables, aunque se presentó una mayor variación para este parámetro en las microesferas de estradiol puras.

En cuanto a la vida media se observa que tiende a aumentar a medida que se aumenta la proporción de colesterol, en el caso de la formulación estradiol-colesterol 70:30 (4.1 días) es mayor al de la formulación de estradiol-colesterol 80:20 (3.0 días). Sin embargo, aunque para las microesferas de estradiol puras la vida media es mayor (4.9 días), la variación registrada en el cálculo de este parámetro fue mayor que el de las otras dos formas farmacéuticas de microesferas. Para el TMR se observó el mismo comportamiento que para la vida media; al aumentar la proporción de colesterol aumenta la permanencia del estradiol en el organismo, TMR\_29 días para microesferas de estradiol puras 4.3 días, para microesferas de estradiol-colesterol (80:20) 4.5 días, para microesferas de estradiol-colesterol (70:30) 5.4 días. Con estos resultados se puede decir que la forma farmacéutica de microesfera *per se* controla la liberación del estradiol y al agregar colesterol a la fabricación de las mismas se provoca un mayor control de la liberación. La biodisponibilidad de las microesferas de estradiol-colesterol y las de estradiol puro presentaron una biodisponibilidad relativa respecto a la solución oleosa muy cercana a 1 o 100%, es decir no existen limitaciones para la llegada del fármaco al sitio de acción y a la velocidad que lo hace.

En cuanto al análisis de varianza no se observan diferencias significativas en cuanto a  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ , ABC\_29 días, constante de eliminación de la fase terminal ( $K_{el}$ ) y vida media ( $t_{1/2}$ ); las diferencias encontradas de los datos promedio fueron estadísticamente no significativas, debido a la variabilidad en los parámetros.

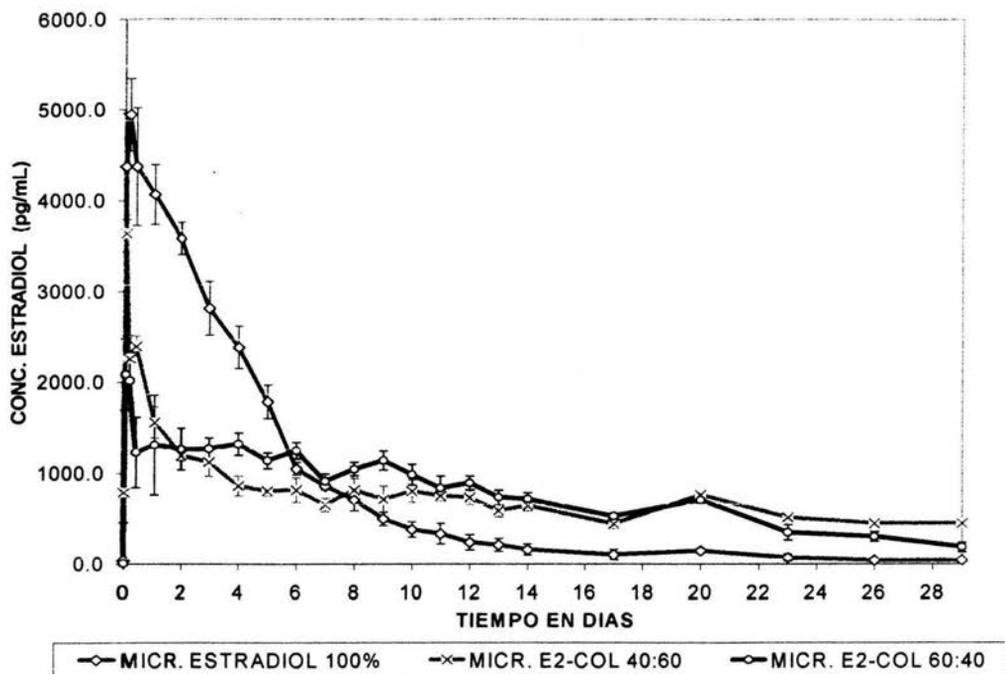
### **ANÁLISIS DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURAS Y ESTRADIOL-COLESTEROL 40:60 Y 60:40**

Al realizar la construcción de los perfiles de concentración contra tiempo, se observa que las formas farmacéuticas de estradiol-colesterol son diferentes con respecto a las microesferas de estradiol puro, se observa también una disminución en el valor de  $C_{m\acute{a}x}$ , con respecto a las microesferas de estradiol puro. La liberación en las microesferas de Estradiol-colesterol 40:60 y 60:40 es aún más lenta que las microesferas de Estradiol-colesterol 70:30 y 80:20, ya que a partir del día 3 del muestreo la forma de la cinética



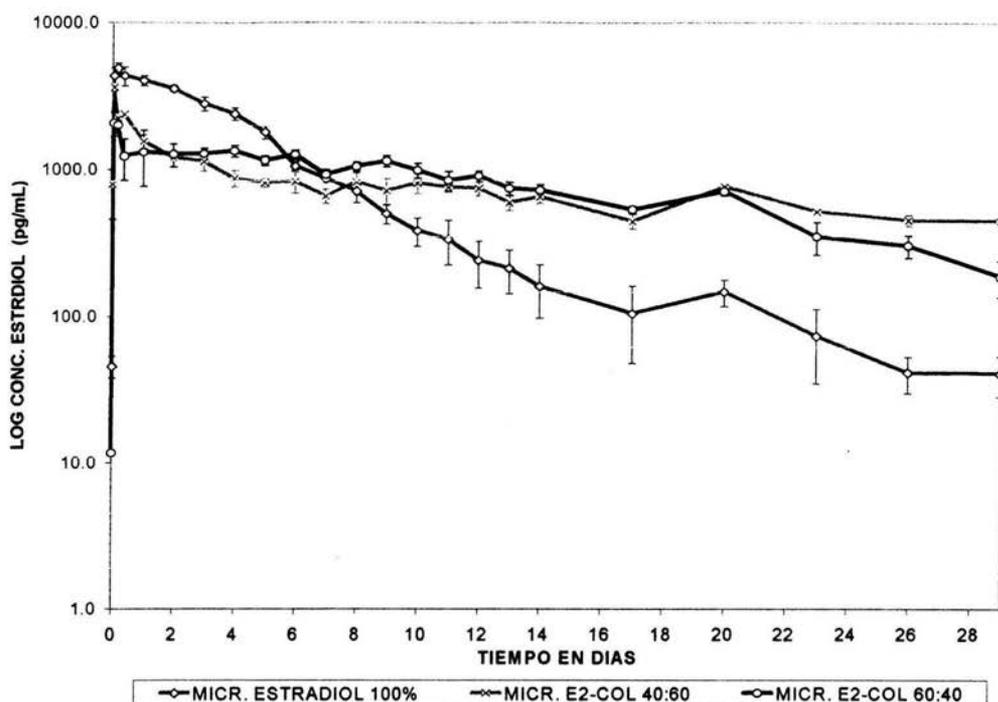
de liberación es prácticamente de orden cero, lo que le da propiedades de controlar la liberación del Estradiol, por lo cual la permanencia del estradiol es mayor, y se obtienen niveles de concentración de estradiol mayores. Se sigue observando al igual que en el caso de las microesferas de estradiol-colesterol 70:30 y 80:20, que en los primeros tiempos de muestreo hay una liberación rápida de estradiol la cual se va volviendo lenta posteriormente, sugiriendo que la liberación se hace por medio de etapas (41). Existen reportes que en formas farmacéuticas de este tipo se pueden presentar fases como son una primera fase de liberación tipo burst, seguida de una fase aletargamiento, donde la liberación es lenta y posteriormente una fase pulsátil. Este resultado permite concluir que el control de la liberación esta en función de la forma farmacéutica y del colesterol presente. Esto se observa para las microesferas de estradiol-colesterol 60:40 y 40:60 en la gráfica de tipo semilogarítmico (Ver figuras 32 y 33). Los resultados de las concentraciones de estradiol plasmático obtenidos para las formas farmacéuticas se muestran en la tabla 23. Los resultados de los parámetros farmacocinéticos se encuentran en las tablas 24 y 25.





PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 32 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 40:60 Y 60:40 DOSIS 5 mg.**



PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 33 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, ESTRADIOL-COLESTEROL 40:60 Y 60:40 (semilogarítmica) DOSIS 5 mg**

Al realizar la comparación de los perfiles con base en su forma, se observó que las formas farmacéuticas de microesferas de Estradiol-colesterol 40:60 y 60:40 tenían una forma diferente a la de las microesferas puras y a las de Estradiol-colesterol 70:30 y 80:20, en cuanto a los parámetros farmacocinéticos se observó lo siguiente:

Para el caso de C máx se encontró que para la formulación 40:60 (3748.5 pg/mL) es 1.4 veces menor que las microesferas de estradiol-puro (5216 pg/mL) y para las 60:40 (2280 pg/mL) es 2.3 veces menor, se



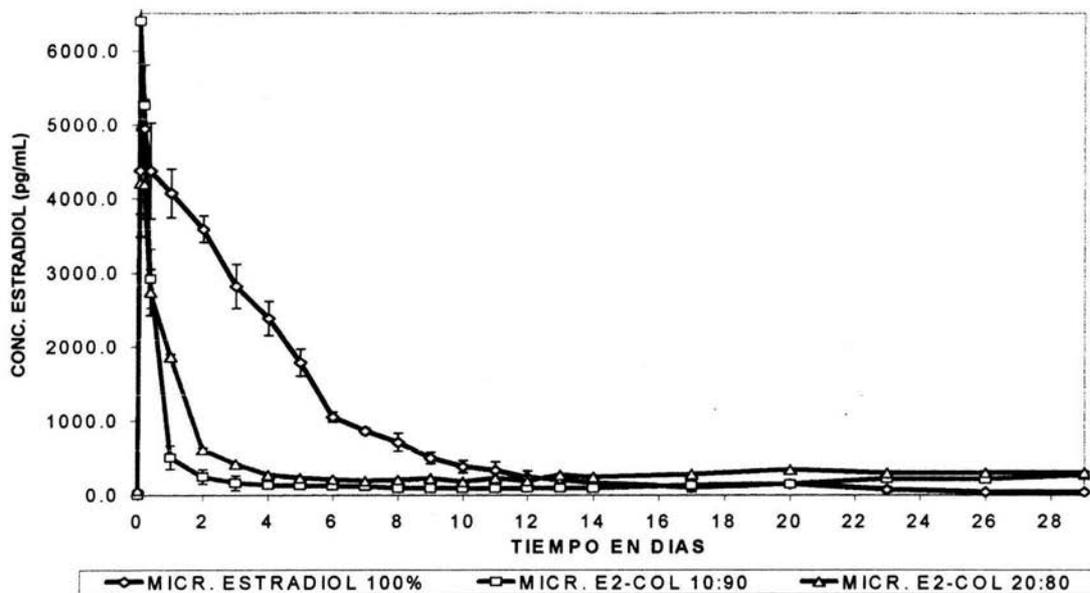
comprueba que el colesterol tiene un papel importante en la liberación del estradiol de las microesferas haciendo esto más controlado y por más tiempo. En cuanto al valor de  $T_{máx}$  es mayor para la formulación de estradiol-colesterol (40:60) (0.20 días) respecto a (60:40) (0.13 días) y microesferas de Estradiol puro (0.16 días); sin embargo esta diferencia no es clara ya que presentaron una variación alta. El parámetro ABC a los 29 días, fue similar y comparable con el de las microesferas de estradiol puro. Las microesferas de estradiol-colesterol 60:40 y 40:60 tienen un perfil con una cinética prácticamente de orden cero, o pseudo-orden cero. Los valores de constante de eliminación ( $K_{el}$ ) son menores al de microesferas de estradiol puro y se acercan en valor a cero, por ejemplo microesferas de estradiol-colesterol (40:60) 0.059 días<sup>-1</sup> y (60:40) 0.069 días<sup>-1</sup>. Los valores de vida media son en consecuencia altos, 10.6 días para estradiol-colesterol (60:40) y 12.8 días para (40:60), si se comparan tanto con la vida media de microesferas de estradiol puro de 4.9 días, esto también se corroboró con el TMR. Con esta información se puede ver que por tener más colesterol en estas formas farmacéuticas se tiene un mayor control de la liberación y mayor permanencia. En cuanto a la biodisponibilidad esta también es de alrededor de 100%, como para una formulación oleosa lo cual habla de la buena disponibilidad del producto.

El análisis de varianza para  $C_{máx}$ ,  $t_{máx}$ ,  $ABC_{29}$ , constante de eliminación de la fase terminal ( $K_{el}$ ) y vida media ( $t_{1/2}$ ), mostró que las diferencias encontradas fueron estadísticamente no significativas.

### **ANÁLISIS DE FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURAS Y ESTRADIOL-COLESTEROL 10:90 Y 20:80**

Las microesferas de estradiol-colesterol 10:90 y 20:80 presentan un perfil diferente al de las microesferas de estradiol puras, siendo su liberación muy rápida en los primeros tiempos de muestreo, posteriormente se controla la liberación aunque la caída de la concentración de estradiol es muy importante, si se comparan con los perfiles obtenidos para las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol-colesterol 40:60 y 60:40; sin embargo se mantienen concentraciones más altas de estradiol por más tiempo con relación a las microesferas de estradiol puras, se observa incluso un aumento en la concentración de estradiol (cerca de la parte final del estudio), esto debido a que quizás estas formas farmacéuticas siguen liberando parte del Estradiol pero en una segunda etapa, de esta probable segunda etapa no se midieron sus concentraciones ya que el estudio de estas formas farmacéuticas se terminó hasta los 29 días. Los resultados de estos perfiles se muestran a continuación.

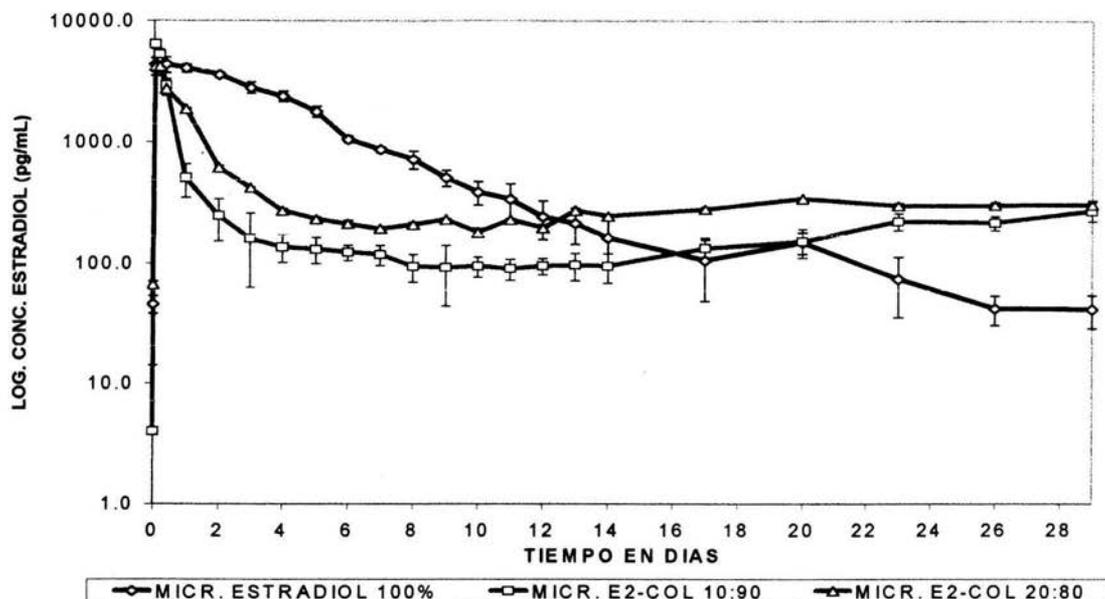




PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 34 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, MICROESFERAS DE ESTRADIOL COLESTEROL 10:90 Y 20:80 DOSIS 5 mg**





PROMEDIO  $\pm$  E.E. n=6

**FIGURA No. 35 GRÁFICO COMPARATIVO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, MICROESFERAS DE ESTRADIOL COLESTEROL 10:90 Y 20:80 (semilogarítmico) DOSIS 5 mg**

Los resultados de los parámetros farmacocinéticos de las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol-colesterol, 10:90 y 20:80 se encuentran en las tablas 24 y 25, estas formas farmacéuticas presentan valores de  $C_{máx}$  similares a los de las microesferas de estradiol puras (5216 pg/mL), microesferas de estradiol-colesterol (10:90) 6245.3 pg/mL (1.23 veces mayor que microesferas de estradiol puras) y microesferas de estradiol-colesterol (20:80) 4406.2 pg/mL (1.18 veces mayor que las microesferas de estradiol puras), también se observó una liberación más rápida del estradiol. El valor de  $T_{máx}$  es menor para las dos proporciones

farmacéuticas hasta el tiempo que se realizó el estudio. Se observó en la porción final de los perfiles que la concentración de estradiol empieza a aumentar nuevamente, lo que provocó que no fuera posible el cálculo de la constante de eliminación  $K_{el}$ , la vida media  $t_{1/2}$ ; el tiempo medio de residencia a 29 días es de 3.2 días; para el caso de la formulación de estradiol-colesterol (10:90). No así para la de Estradiol-colesterol (20:80)  $K_{el}=0.161$  días<sup>-1</sup>, TMR 29 días = 4.3 días y  $t_{1/2}= 4.3$  días.

Se esperaba tener una mayor permanencia del estradiol en el organismo al existir una mayor concentración de colesterol, sin embargo no se observó; pero existen datos en bibliografía que indican que algunas formas farmacéuticas del tipo de microesferas empleando matrices pueden presentar cinéticas de liberación bifásicas o trifásicas (41), dependiendo del arreglo que tengan los polímeros en las matrices de las microesferas sean lineales o ramificadas, esto provoca que cuando se utilizan matrices para liberación, si se encuentran en contacto con agua y son erosionadas la liberación es diferente; posiblemente esto ocurra también en el caso de las microesferas de estradiol-colesterol; la alta cantidad de colesterol puede provocar arreglos de las moléculas de estradiol y colesterol que favorezcan cinéticas de este tipo. La idea que apoya este tipo de liberación y explicación del comportamiento es que se observó al final de los perfiles de las formas farmacéuticas de estradiol-colesterol (10:90) y (20:80) que empiezan a elevarse las concentraciones de estradiol observándose aparentemente el inicio de otra etapa de liberación de estradiol. Posiblemente si se hubiera continuado con el estudio de estas formas farmacéuticas se presentaría otra fase de liberación que justificaría el por qué del faltante en área bajo la curva para la formulación, ABC de las microesferas de estradiol-colesterol (10:90) 4823 pg\*día/mL, (4.6 veces menor respecto a las microesferas de estradiol puro), ABC de las microesferas de estradiol-colesterol (20:80) 7620 pg\*día/mL, (2.9 veces menor respecto a las microesferas de estradiol puro).

En cuanto a los valores de biodisponibilidad encontrados, para las formas farmacéuticas de estradiol-colesterol (10:90) y (20:80) donde se hizo la cuantificación de estradiol hasta los 29 días, se vieron valores bajos de entre 25 y 39 %, lo cual no corresponde a lo obtenido para las demás formas farmacéuticas de microesferas probadas, la posible explicación a esto es que quizás sería necesario aumentar el tiempo de muestreo para poder ver el resto del perfil ya que como se ha reportado (41), se pueden presentar perfiles con varias fases de liberación y alrededor de los 29 días se observó que las concentraciones de estradiol se vuelven a elevar después de haber previamente descendido.



En el análisis de varianza no se observan diferencias significativas para  $C_{máx}$ ,  $t_{máx}$ , ABC\_29 días, constante de eliminación de la fase terminal  $k_{el}$  y vida media  $t_{1/2}$ , las diferencias encontradas fueron realizadas por la observación puntual de los datos promedio, no son estadísticamente significativas.

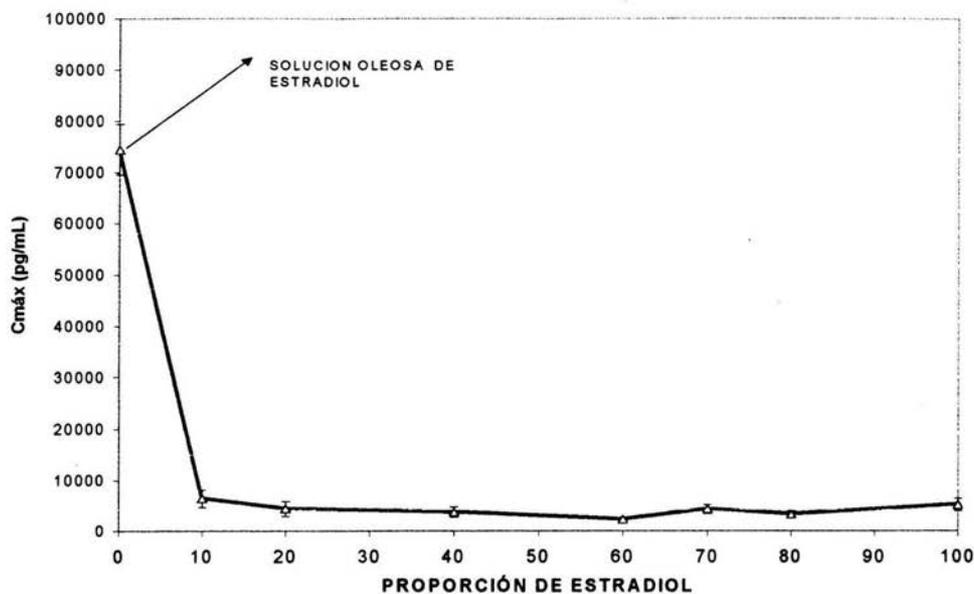
### **ANÁLISIS GLOBAL DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE MICROESFERAS Y MICROESFERAS DE ESTRADIOL-COLESTEROL EN LAS DIFERENTES PROPORCIONES**

Con base en los resultados obtenidos para las formas farmacéuticas de microesferas, podemos decir que estas, tanto de estradiol puro, como en las diferentes proporciones con colesterol presentaron una liberación más lenta que la formulación comercial ya conocida de solución oleosa de estradiol, y en general no presentaron problemas de liberación y biodisponibilidad. Las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol y estradiol-colesterol presentan en general menores valores de  $C_{máx}$  con respecto a la solución oleosa, lo cual hace que no se presenten los picos de concentración plasmática o burst que provocan reacciones adversas en quien se administran las formas farmacéuticas de Estradiol, por consecuencia presentaron tiempos de residencia y vida media mayores que la formulación de solución oleosa de Estradiol, tienen buena biodisponibilidad y menores fluctuaciones en concentraciones con respecto a otro tipo de formas farmacéuticas que si presentan fluctuaciones de concentración (42, 45).

Estas microesferas presentan forma de perfil muy similar a la reportada para microesferas de matriz polimérica, en las cuales se piensa que el tipo de arreglo de las moléculas hace que los activos se liberen de una manera específica, pudiendo tener comportamientos bifásicos o trifásicos en la liberación (41) como sería el caso probable de las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol-colesterol (10:90 y 20:80), además de presentar liberación de los principios activos en una primera fase de tipo burst, seguida de un alentamiento o aletargamiento y posteriormente una fase pulsátil (42). Probablemente esto ocurre también para el caso de las microesferas de estradiol y estradiol-colesterol. Se ha propuesto por algunos autores que el posible mecanismo de liberación de los activos a partir de microesferas de este tipo (producidas por spray-secado) es la formación de poros de difusión de los principios activos, humectación y bioerosión (43), quizás sea el mecanismo de las microesferas que se estudiaron en este trabajo.



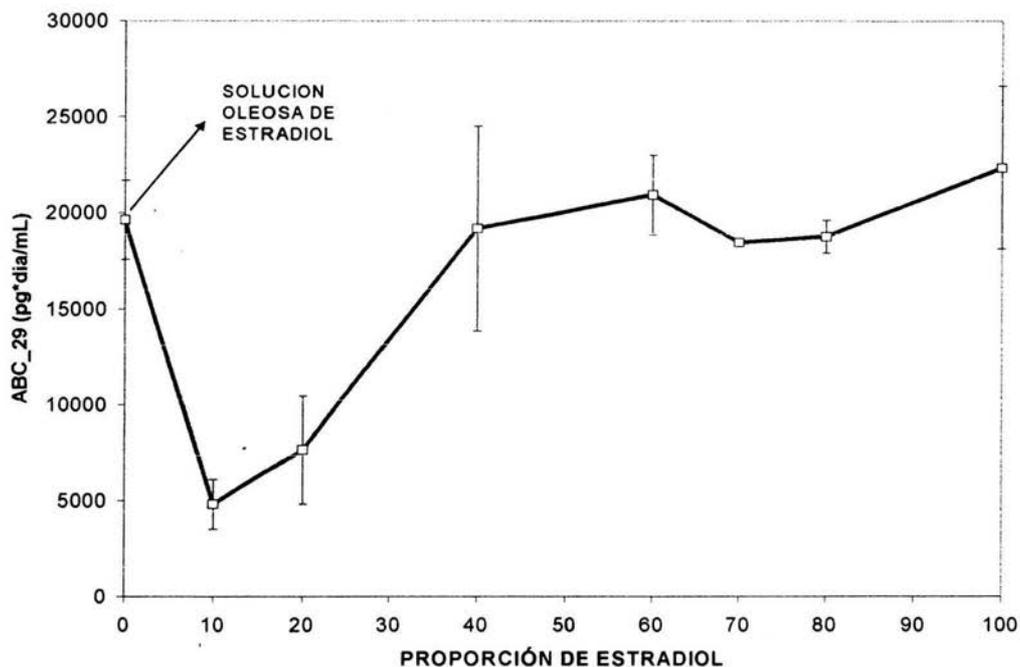
Entre las microesferas de estradiol-colesterol probadas se observó que las que presentaron mejores parámetros farmacocinéticos como son tiempo de residencia mayor, vida media mayor,  $C_{máx}$  menores que la solución de referencia (solución oleosa de estradiol) y mejor biodisponibilidad fueron las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol-colesterol (40:60) y (60:40). Esto se puede apreciar tanto en la tabla de resultados globales de los parámetros farmacocinéticos calculados como en las graficas realizadas para cada uno de los parámetros. (Ver figuras 36-40).



PROMEDIO  $\pm$  D.E. n=6

**FIGURA No. 36 GRÁFICO COMPARATIVO DE  $C_{máx}$  DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL**

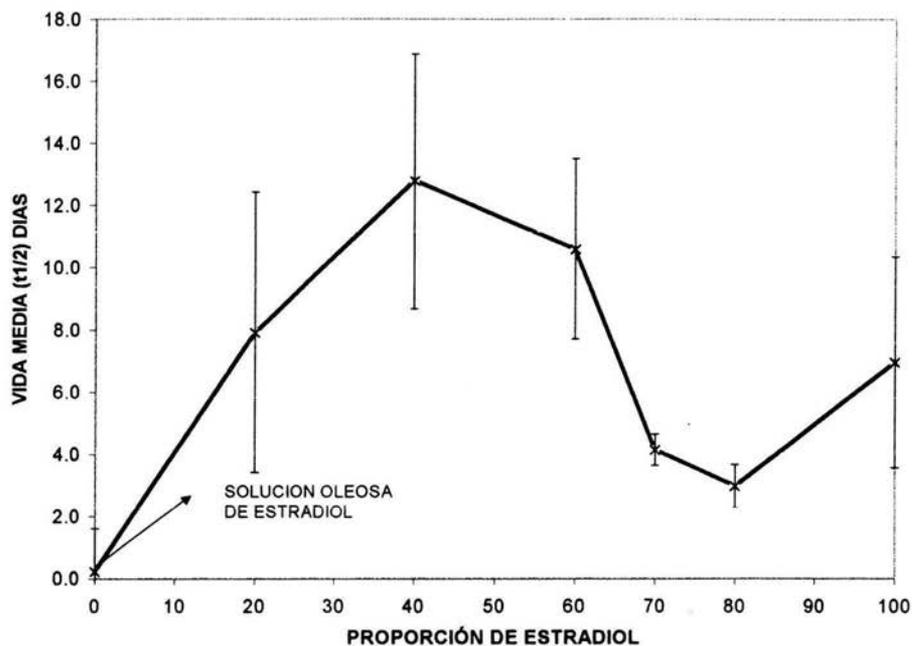




PROMEDIO  $\pm$  D.E. n=6

**FIGURA No. 37 GRÁFICO COMPARATIVO DE ABC A 29 DIAS DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL**

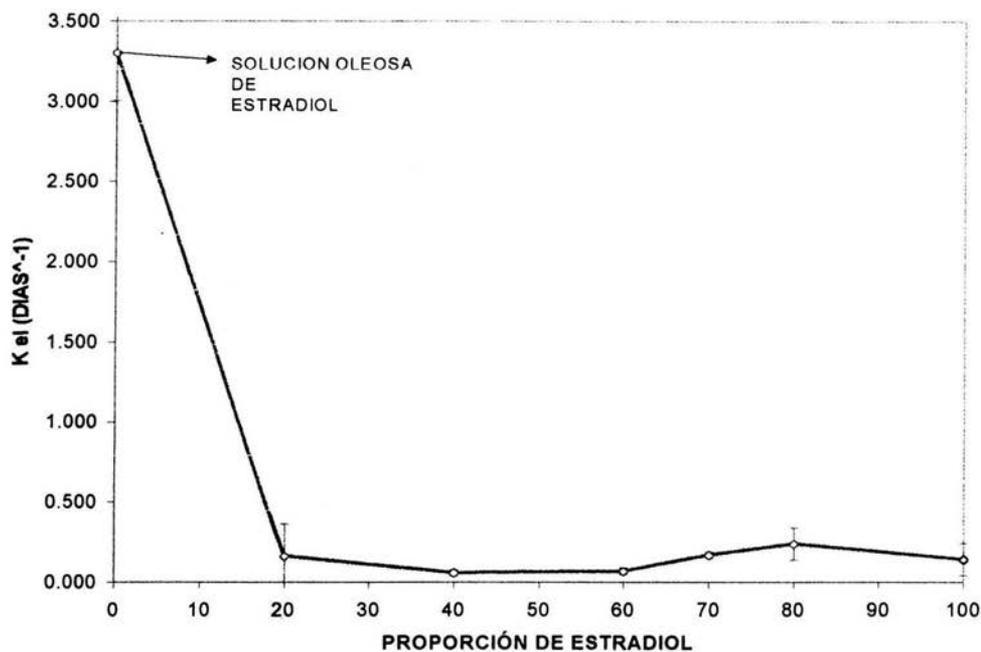




PROMEDIO  $\pm$  D.E. n=6

**FIGURA No. 38 GRÁFICO COMPARATIVO DE VIDA MEDIA DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL**

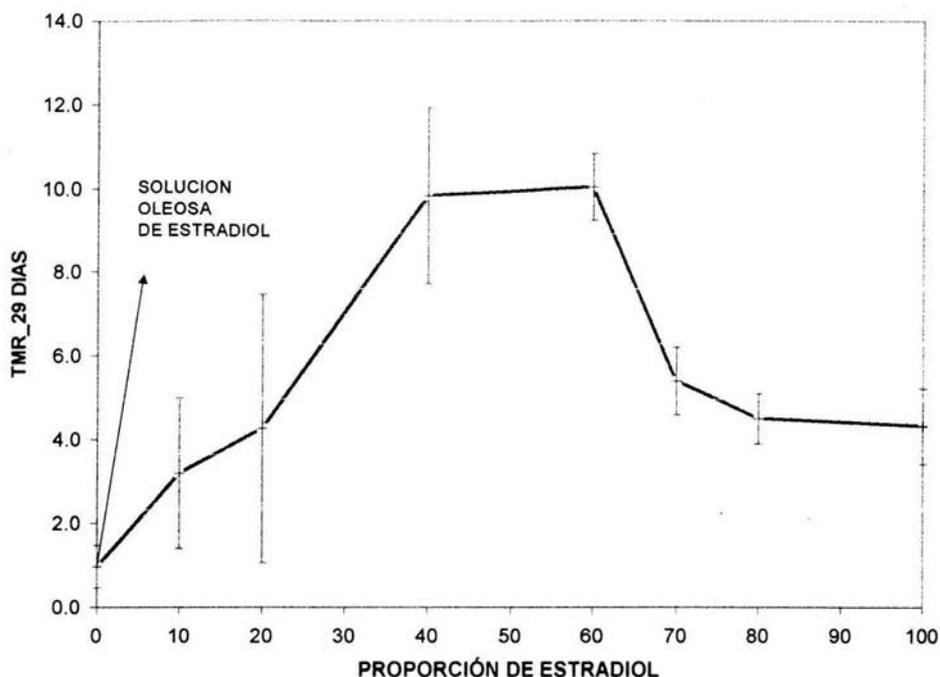




PROMEDIO  $\pm$  D.E. n=6

**FIGURA No. 39 GRÁFICO COMPARATIVO CONSTANTE DE ELIMINACION DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL**





PROMEDIO  $\pm$  D.E. n=6

#### FIGURA No. 40 GRAFICO COMPARATIVO DE TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE MICROESFERAS ESTRADIOL-COLESTEROL

De acuerdo a la clasificación propuesta en la tabla 2 (11), las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol y estradiol-colesterol en las diferentes proporciones y en particular las de (40:60) y (60:40) se pueden clasificar como de liberación extendida o (extended release), de acuerdo a la definición dada por Gunter Remy: Es aquella que permite por lo menos una reducción de frecuencia de administración en dos veces cuando se compara con una formulación de la misma sustancia activa pero en la forma de dosificación convencional. Farmacocinéticamente tienen un  $C_{m\acute{a}x}$  bajo, un  $t_{m\acute{a}x}$  no bien definido es largo y una vida media de eliminación prolongada.

En general todas las formas farmacéuticas de microesferas de estradiol probadas presentaron al final del estudio (29 días) niveles de concentración



altos (entre 214 y 445 pg/mL, formas farmacéuticas 40:60 y 60:40 con dosis de 5 mg), aún cuando sea en animales, sin embargo lo importante es que estos niveles de estradiol se mantuvieron por un periodo de tiempo prolongado. Cuando se trata de comparar los resultados de las microesferas obtenidos con productos existentes en el mercado, encontramos que no hay productos con tecnología similar a las microesferas que hayan sido probados en animales o humanos. La comparación de los resultados obtenidos se hizo respecto a productos que ya existen en el mercado con aplicación a la terapia de reemplazo donde se requieren niveles de estradiol por periodos de tiempo prolongados, se observa que en algunos casos que los niveles obtenidos de estradiol con las microesferas son mayores en otros no. Para esto mencionaremos varios ejemplos, como es el caso de administraciones que se han hecho por vía vaginal y oral de 4 mg de estradiol cada una donde en el caso de la vaginal se tienen niveles de alrededor de 2300 pg/mL con reacciones adversas y de alrededor de 279 pg/mL para la oral, evaluando a los 21 días (46). En el caso de aplicaciones transdérmicas con dosis de 4 mg las concentraciones de estradiol llega a entre 80 y 100 pg/mL, pero duran de 30 a 40 horas (41). En otro ejemplo de dispositivos transdérmicos cuando se ha administrado entre 4 y 20 mg de Estradiol se encontraron niveles de entre 30 y 70 pg/mL respectivamente (47). Para parches, geles transdérmicos y tabletas con dosis entre 1.5 y 2 mg se ha observado que las concentraciones están entre 116 y 191 pg/mL para gel y tabletas, y de 365 pg/mL para parche (48).

Con esta información podemos decir que estas formas farmacéuticas de microesferas de estradiol tienen posibles usos terapéuticos, destacando las de estradiol-colesterol (40:60 y 60:40), debido a sus altas concentraciones alrededor de los 29 días, sin embargo es necesario tener en cuenta que son resultados preliminares en animales y que aunque se hayan utilizando dosis que se administrarían en humanos, estos resultados de altas concentraciones al final de las administraciones se modificarán al probar estas formas farmacéuticas en humanos. Entre las posibles aplicaciones que pueden tener estas formulaciones, está la de terapia de reemplazo en la cual se requiere tener cantidades de estradiol sostenidas por periodos largos de tiempo, aunque para poder llegar a tener un producto definitivo, se requiere de más experimentación entre los que está el ajuste de dosis, evaluación de efectividad, pruebas preliminares en animales y posteriormente en humanos.



**SECCIÓN DE TABLAS DE RESULTADOS Y PARÁMETROS  
FARMACOCINÉTICOS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL  
Y ESTRADIOL-COLESTEROL**



**TABLA 20. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL**

RESULTADOS PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL EN (pg/mL)						
TIEMPO (DIAS)	FORMULACIÓN MICR. ESTRADIOL PURO			FORMULACIÓN SOL OLEOSA ESTRADIOL		
	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV
0	45.3	7.6	40.9	93.6	11.3	29.6
0.042	4378.3	585.7	32.8	69249.3	14415.8	51.0
0.167	4947.1	397.7	19.7	42670.9	2607.0	14.4
0.375	4377.1	649.2	36.3	12110.0	2070.4	41.9
1	4070.2	326.5	19.6	858.2	208.0	59.4
2	3589.0	178.7	12.2	89.4	11.0	30.2
3	2816.7	296.1	25.8	60.1	10.4	42.5
4	2384.8	231.8	23.8	54.6	13.6	60.9
5	1784.9	185.4	25.4	36.7	2.9	19.5
6	1050.1	68.5	16.0	37.9	5.0	32.1
7	859.6	42.6	12.1	41.9	7.8	44.6
8	710.6	120.3	41.5	30.6	7.2	58.0
9	499.1	75.4	37.0	45.9	12.1	64.7
10	381.3	83.0	53.3	38.9	13.7	66.6
11	333.0	112.2	82.5	89.9	54.6	148.7
12	238.6	83.6	85.8	34.0	5.6	40.1
13	211.1	69.7	80.9	48.2	12.6	63.3
14	160.0	62.9	96.3	35.0	13.8	96.6
17	103.7	56.0	132.3	17.6	8.1	112.6
20	146.3	29.7	49.7	88.8	12.3	33.9
23	72.6	38.0	128.2	82.5	48.4	143.8
26	41.2	11.4	67.8	24.2	11.0	111.2
29	40.6	12.4	74.7	29.5	6.9	57.4



**TABLA 21. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, FORMULACION DE ESTRADIOL Y COLESTEROL (10:90) Y (20:80)**

TIEMPO (DIAS)	RESULTADOS PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL EN (pg/mL)								
	FORMULACION MICR. ESTRADIOL PURO			FORMULACION MICR. E2-COL (10:90)			FORMULACION MICR. E2-COL (20:80)		
	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV
0	45.3	7.6	40.9	4.0	4.0	244.9	86.1	10.0	37.2
0.042	4378.3	586.7	32.8	6396.2	717.9	27.5	4209.3	569.8	33.2
0.167	4947.1	397.7	19.7	5263.7	463.9	21.6	4197.9	541.1	31.6
0.375	4377.1	649.2	36.3	2921.2	312.2	26.2	2738.3	395.3	35.4
1	4070.2	326.5	19.6	503.8	34.4	16.7	1864.4	154.5	20.3
2	3589.0	178.7	12.2	246.0	23.1	23.0	612.5	94.0	37.6
3	2816.7	296.1	25.8	159.5	6.0	9.2	418.0	97.7	57.2
4	2384.8	231.8	23.8	134.6	12.1	21.9	270.1	34.9	31.6
5	1784.9	185.4	25.4	128.9	8.2	15.7	228.9	31.5	33.7
6	1050.1	68.5	16.0	121.3	13.7	27.7	209.0	17.8	20.8
7	859.5	42.5	12.1	115.5	6.3	13.3	189.2	22.2	28.7
8	710.6	120.3	41.5	91.6	8.7	23.1	204.1	23.7	28.4
9	499.1	75.4	37.0	90.2	4.0	10.9	226.5	47.1	60.9
10	381.3	83.0	53.3	92.3	14.2	37.5	176.2	17.6	24.4
11	333.0	112.2	82.5	88.5	4.5	12.4	225.1	17.8	19.4
12	238.6	83.6	85.8	93.1	11.3	29.8	193.1	14.4	18.2
13	211.1	59.7	80.9	94.6	11.2	29.1	268.7	24.6	22.5
14	160.0	62.9	96.3	92.6	8.5	22.5	240.9	25.8	26.2
17	103.7	56.0	132.3	131.8	10.2	18.9	276.5	21.9	17.7
20	146.3	29.7	49.7	148.8	4.6	7.0	339.0	40.7	26.8
23	72.6	38.0	128.2	218.5	14.2	14.6	296.0	34.3	25.9
26	41.2	11.4	67.8	212.6	15.4	16.2	298.9	28.0	18.7
29	40.6	12.4	74.7	267.1	24.1	18.0	301.6	47.8	31.7

**TABLA 22. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, FORMULACION DE ESTRADIOL Y COLESTEROL (70:30) Y (80:20)**

RESULTADOS PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL EN (pg/mL)									
TIEMPO (DIAS)	FORMULACION MICR. ESTRADIOL PURO			FORMULACION MICR. E2-COL (70:30)			FORMULACION MICR. E2-COL (80:20)		
	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV
0	45.3	7.6	40.9	8.7	5.6	169.3	16.6	12.3	180.4
0.042	4378.3	585.7	32.8	4493.3	361.2	19.7	2875.1	257.6	22.0
0.167	4947.1	397.7	19.7	3662.6	175.3	11.7	3744.3	338.1	22.1
0.375	4377.1	649.2	36.3	2705.6	230.9	20.9	3349.5	300.2	22.0
1	4070.2	326.5	19.6	2343.7	235.9	24.7	2994.7	360.8	26.2
2	3589.0	178.7	12.2	2371.2	205.6	21.2	2690.0	222.6	20.3
3	2816.7	296.1	25.8	2048.7	277.0	33.1	2113.9	205.3	23.8
4	2384.8	231.8	23.8	1971.2	177.1	22.0	1946.8	143.2	18.0
5	1784.9	185.4	25.4	1266.5	138.2	26.7	1372.6	155.6	27.8
6	1050.1	68.5	16.0	1146.3	197.4	42.2	1023.4	61.5	14.7
7	859.5	42.5	12.1	869.6	161.8	45.6	978.2	114.8	28.8
8	710.6	120.3	41.5	549.0	132.0	58.9	713.5	120.9	41.5
9	499.1	75.4	37.0	364.6	85.9	57.7	551.1	89.6	39.8
10	381.3	83.0	53.3	341.7	81.1	58.1	401.1	84.1	51.4
11	333.0	112.2	82.5	220.7	61.5	68.3	270.5	81.0	55.2
12	238.6	83.6	85.8	155.3	47.9	75.5	201.4	61.6	74.9
13	211.1	69.7	80.9	139.0	43.6	76.8	119.2	40.7	83.6
14	160.0	62.9	96.3	114.8	38.3	81.7	92.8	38.7	102.1
17	103.7	56.0	132.3	89.6	32.2	86.1	36.5	20.5	137.3
20	146.3	29.7	49.7	70.7	26.0	89.9	26.5	16.8	154.9
23	72.6	38.0	128.2	68.1	36.4	130.9	17.4	11.5	162.4
26	41.2	11.4	67.8	24.3	10.7	108.3	16.8	10.7	155.4
29	40.6	12.4	74.7	8.4	5.4	158.6	16.3	7.6	114.8

**TABLA 23. RESULTADOS PROMEDIO MICROESFERAS DE ESTRADIOL PURO, FORMULACION DE ESTRADIOL Y COLESTEROL (40:60) Y (60:40)**

RESULTADOS PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL EN (pg/mL)									
TIEMPO (DIAS)	FORMULACION MICR. ESTRADIOL PURO			FORMULACION MICR. E2-COL (40:60)			FORMULACION MICR. E2-COL (60:40)		
	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV	PROMEDIO	ERROR. EST	CV
0	45.3	7.6	40.9	789.2	444.2	137.9	11.7	7.4	155.0
0.042	4378.3	585.7	32.8	3641.9	393.3	26.5	2088.1	204.1	23.9
0.167	4947.1	397.7	19.7	2263.8	242.4	26.2	2020.1	268.2	31.3
0.375	4377.1	649.2	36.3	2399.0	386.7	39.5	1230.0	114.5	20.8
1	4070.2	326.5	19.6	1559.0	548.6	86.2	1311.6	169.5	31.7
2	3589.0	178.7	12.2	1196.6	228.3	38.2	1264.3	63.0	10.0
3	2816.7	296.1	25.8	1121.2	120.6	26.3	1266.8	185.1	27.4
4	2384.8	231.8	23.8	861.7	121.9	34.7	1317.9	109.9	16.7
5	1784.9	185.4	25.4	805.9	86.8	26.4	1139.0	52.1	11.2
6	1050.1	68.5	16.0	816.8	88.4	26.5	1249.9	133.6	26.2
7	859.5	42.5	12.1	663.2	81.2	30.5	912.5	71.5	17.5
8	710.6	120.3	41.6	817.5	72.4	21.7	1046.8	131.4	30.7
9	499.1	75.4	37.0	715.5	102.1	35.0	1140.0	147.6	31.7
10	381.3	83.0	53.3	804.1	112.4	34.2	984.7	122.6	30.5
11	333.0	112.2	82.5	750.9	129.2	42.1	838.7	54.3	15.9
12	238.6	83.6	85.8	734.8	78.7	25.2	894.2	79.6	21.8
13	211.1	69.7	80.9	588.9	78.3	31.8	737.2	67.8	22.5
14	160.0	62.9	96.3	646.6	68.0	25.8	717.1	63.5	21.7
17	103.7	56.0	132.3	441.5	30.2	16.8	529.3	60.9	21.5
20	146.3	29.7	49.7	763.9	43.6	14.0	705.8	23.4	7.4
23	72.6	38.0	128.2	513.6	85.6	40.8	347.3	20.8	14.7
26	41.2	11.4	67.8	448.9	52.1	28.4	301.8	37.3	27.6
29	40.6	12.4	74.7	445.5	51.3	28.2	185.1	17.8	21.5

**TABLA 24. RESULTADOS GLOBALES DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LAS FORMAS FARMACÉUTICAS MICROESFERAS DE ESTRADIOL, ESTRADIOL-COLESTEROL Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL**

FORMULACIONES DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL Y ESTRADIOL-COLESTEROL PROMEDIO ± DESV. ESTANDAR								
PARAMETRO	ME E2 100%	ME E2-COL "30:20"	ME E2-COL "30:30"	ME E2-COL "30:40"	ME E2-COL "40:60"	ME E2-COL "20:50"	ME E2-COL "10:90"	SOLUCION OLEOSA
Cmax_ALL pg/mL	5216 ±1233.5	3320.4 ±547.6	4297.0 ±879.4	2280.0 ±423.7	3748.5 ±991.7	4406.2 ±1465.8	6425.3 ±1735.4	74500.6 ±24727
Tmax_ALL dias	0.16 ±0.1	0.27 ±0.1	0.13 ±0.1	0.13 ±0.06	0.20 ±0.4	0.10 ±0.1	0.06 ±0.05	0.06 ±0.05
ABC_29 (pg*día/mL)	22357 ±4251.8	18745 ±853.1	18425 ±202.9	20919 ±2093.9	19157 ±5338.1	7620 ±2800.1	4823 ±1286.4	19645 ±3083.0
ABC_INF (pg*día/mL)	23667 ±7020.6	19080 ±770.0	18625 ±308.3	25019 ±2073.4	29557 ±6577.6	8422 ±671.7		18339 ±2710.9
HALF_ALL dias	4.9 ±3.4	3.0 ±0.7	4.1 ±0.5	10.6 ±2.9	12.8 ±4.1	4.3 ±4.5		0.2 ±0.02
BETA_ALL dias-1	0.141 ±0.1	0.239 ±0.1	0.169 ±0.02	0.069 ±0.02	0.059 ±0.02	0.161 ±0.2		3.304 ±0.3
TMR 29 dias	4.3 ±0.9	4.5 ±0.6	5.4 ±0.8	10.0 ±0.8	9.8 ±2.1	4.3 ±3.2	3.2 ±1.8	1.0 ±0.6
TMR INF dias	5.5 ±2.5	4.8 ±0.7	5.7 ±0.9	15.4 ±3.9	19.6 ±6.1	8.1 ±3.4		1.1 ±0.7

**TABLA 25. RESULTADOS GLOBALES DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LAS FORMAS FARMACEUTICAS MICROESFERAS DE ESTRADIOL, ESTRADIOL-COLESTEROL Y SOLUCIÓN OLEOSA DE ESTRADIOL (CONTINUACION)**

FORMAS FARMACEUTICAS DE MICROESFERAS DE ESTRADIOL Y ESTRADIOL-COLESTEROL								
PARÁMETRO	M.E. E2	ME E2-COL	SOLUCION OLEOSA					
	100%	"80:20"	"70:30"	"60:40"	"40:60"	"20:80"	"10:90"	
F 29 DIAS	113.8	95.4	93.8	106.5	97.5	38.8	24.6	100.0
F INFINITO	129.1	104.0	101.6	136.4	161.2	45.9		100.0

**CAPITULO 5**  
**CONCLUSIONES**

1. Con base en los resultados obtenidos se encontró que las microesferas de estradiol y estradiol-colesterol, como forma farmacéutica presentan un efecto de control de la liberación de Estradiol.
2. La adición de colesterol a las formas farmacéuticas de microesferas de Estradiol modifica la forma de liberación de Estradiol, manteniendo concentraciones de Estradiol por más tiempo en circulación, siendo esto más evidente en el caso de las formas farmacéuticas de Estradiol-colesterol 40:60 y 60:40, así como también en las otras formas farmacéuticas probadas.
3. Los perfiles plasmáticos de las microesferas de Estradiol-colesterol en sus diferentes proporciones presentaron 2 etapas en la liberación del Estradiol, una rápida que se presenta al inicio de la administración donde se presenta el pico de concentración (booster o burst), seguida de un retardamiento o (dormant phase) y posteriormente una lenta de liberación controlada.
4. De acuerdo a bibliografía relacionada con formas farmacéuticas del tipo de liberación controlada y con base en la información obtenida de los parámetros farmacocinéticos calculados a las microesferas de estradiol y estradiol-colesterol, se pueden clasificar como de liberación extendida o (*extended release*) debido a que presentaron las siguientes características: permiten por lo menos una reducción de frecuencia de administración en dos veces cuando se compara con una formulación de la misma sustancia activa pero en la forma de dosificación convencional.
5. Debido a sus características de control de la liberación, las microesferas de Estradiol-Colesterol (40:60 y 60:40) podrían tener una potencial aplicación a terapia de reemplazo hormonal por su liberación lenta y mantenimiento de concentraciones por arriba de los valores basales durante varios días, sin embargo se requiere de estudios clínicos para confirmar estos resultados.
6. Se pretende realizar a futuro, el escalamiento a una fase clínica de este nuevo tipo de formas farmacéuticas, para conocer el tipo de liberación, los niveles plasmáticos alcanzados en función de las combinaciones Estradiol-Colesterol y dosis de estradiol utilizadas en las microesferas que nos den la información necesaria para encontrar sus posibles usos terapéuticos.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Second. Edition. The pharmaceutical press analytical 1986, pág 783 .
2. Greenspan , Baxter. Endocrinología básica y clínica 3ª. Edición. Editorial el manual moderno 1994, pág 454-458.
3. Ganong, William F. Fisiología Médica. Edit. El Manual moderno 1990, 12ª. Edición, pág 390-392 .
4. MARTINDALE The extra pharmacopoeia. Edition 29 th. London. The pharmaceutical Press, 1989 pág 1673-1678 .
5. Murad, F., Kuret, J. Estrogens and progestins. In: The Pharmacological basis of Therapeutics. Goodman L.S., Gilman, A., Rall, T., Nies, A.S. Eds. Pergamon Press, New York 1990; pág 1384-1393.
6. Barnes, R.B., Lobo, R.A. Pharmacology of estrogens. In: menopause: Physiology and Pharmacology. Mishell, D.R. Eds. Yearbook Medical Publishers, Inc., Chicago 1987; pág 301-315.
7. Rodriguez-Espinosa, et al. Analytical and clinical performance of an automated immunoassay system (immulite) for oEstradiol in serum. **Clin-Chem-Lab-Med.** Dic. 1998; 38(12): pág 969-974.
8. Grenier J. Determination of 17 beta-Estradiol with an enzyme immunoassay kit. Comparison with a specific radioimmunoassay. **J. Steroid Biochem.** Oct 1989; 33(4b): pág 833-835.
9. Terada H, Yamamoto-K. Determination of corticosteroids and anabolic agents in health food by high-performance liquid chromatography. **Jpn-J-Toxicol-Environ-Health.** Dic 1992; 38(6): pág 537-544.
10. Batjoens,-P et al, Gas chromatography –mass-spectrometric confirmation of anabolic compounds in injection sites. **Analyst (London)** Dic. 1994; 119 (12): pág 2607-2610.
11. Blume, Gundert Remy Möller Modified release products. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1991.
12. Udeala O.K., Aly S.A.S., Degradation Kinetics of Thiamine Hydrochloride in Directly Compressed Tablets III. Water Vapour Transmission Through Free and Applied Eudragit Films., **Drug Dev. Ind. Pharm.**, 1989 15 (11), pág 1797-1825.

13. Gardner C., Drug Targeting: Potentials and Limitations., in Topics in Pharmaceutical Science.,1983 Eds D.D. Briemer, P. Speiser, pág 291-303.
14. Gregoriadis G. Targeting of Drugs., *Nature*, 1977; 265 (3): pág 407-411.
15. Gregoriadis G., Senior J., Poste G., (Eds), Targeting of Drugs with Synthetic Systems., NATO-ASI Series (No. 113), Plenum Press, NY, 1986.
16. Gregoriadis G., Poste G., (Eds), Targeting of Drugs, Anatomical and Physical Considerations., Plenum Press, NY, 1988.
17. Poznansky M.J., Juliano R.L., Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: a Critical Review., 1984; 36 (4): pág 277-236,.
18. Tomlinson E., Davis S.S. (Eds), Site Specific Drug Delivery., Wiley Int., Chichester, 1986.
19. Chien W. Yie, Novel Drug delivery systems 2<sup>nd</sup>. Ed. Revised and expanded. Marcel Dekker N.J. USA 1992 Chapter 8, pág. 406-407.
20. Singh P., Desai S.J., Simonelli A.P., Higuchi W.I., Role of Wetting on the Rate of Drug Release from Inert Matrices., *J. Pharm. Sci.*, 1968; 57 (2): pág 217-226.
21. Heller J. Helwing R.F. Baber R.W. Tuttle M.E. Controlled release of water soluble macromolecules from bioerodible hydrogels. *Biomaterials* 1983 4, pág 262.
22. Kydonieus Agis. Treatise on controlled drug delivery. Fundamentals. Optimization Applications. Marcel Dekker. N.J. USA 1992 pág 199-204
23. Uwe-Hollihn K. Hormone replacement therapy and menopause. Schering AG. International product management D-13342 Berlin Germany 2<sup>nd</sup>. Edition. June 1997. pág 27-41.
24. PDR "Physicians desk reference" 53<sup>th</sup> edition, Medical Economics Montva NJ USA 1999 pág. 830-831, 2533-2534.
25. Selby PL Peacock M Dose dependent response of symptoms, pituitary and bone to transdermal estrogen in postmenopausal women. *Br. Med. J.* 1986; Nov 22 293(6558); pág 1337-1339.

26. Schram JH, Boerrigter PJ, The TY Influence of two hormone replacement therapy regimens oral oEstradiol valerate and cyproterone acetate versus transdermal oEstradiol and oral dihydrogesterone, on lipid metabolism. *Maturitas* 1995 Sep; 22 (2) : pág 121-130.
27. Corson SL Clinical experience with system, a new transdermal form of hormone replacement therapy. *Int. J. Fertil Menopausal stud*, 1993; 38 suppl. 1: pág 36-44.
28. Stevenson JC, Crook D, Godslan IF, Lees B, Whitehead MI Oral versus transdermal hormone replacement therapy *Int. J. Fertil. Menopausal stud*. 1993, 38 suppl. 1, pág 30-35.
29. PLM, México 2002, Diccionario de Especialidades Farmacéuticas Thomson PLM Edición 48 pág.1159, 1165, 1166, 1217.
30. Dirección electrónica [www.rxlist.com](http://www.rxlist.com)
31. Suckow Mark A., Douglas A. Fred. A volume in the laboratory animal pocket reference series. CRC Press EU 1996 pág. 1
32. 21 CFR, Ch. (4-1-91) Edition Part 58 Good laboratory practices for non-clinical laboratory studies.
33. Findlay J.W.A., Smith W.C., Lee J.W. Validation of immunoassays for bioanalysis a pharmaceutical industry perspective. *J. of Pharm. And biomedical analysis* 2000 21 pág. 1249-1273.
34. Fonseca-Eugenia, Galvan-Rosa, Ochoa Raquel. Evaluación de tres equipos automatizados con diferente sistema de detección para la cuantificación de hormonas por inmunoanálisis enzimático. *Bioquímica* 1997, Vol. 22 No. 3 88 pág 712-721.
35. Inserto del estuche para determinacion de Estradiol por radioinmunoanálisis de Diagnostics Products corporation CA EUA.
36. Miller Kris J, Bowsher Rnald, R, et al. Workshop on Bioanalytical validation for macromolecules: Summary report. *Pharm. Research* 2001 9(18): pág 1373-1383.
37. Shah et al. "Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies"; *Pharm. Research* 1992; 9(4): pág 588-592.

38. Shah, Vinod. P "Analytical methods in bioavailability studies: a regulatory viewpoint". *Clin. Res.practices and reg. Affairs*, 1987; pág 51-60.
39. Manual de laboratorio de hormonas Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Dpto. de Biología de la reproducción. México D.F. 1983 pág 10.
40. Miller KJ, et al Workshop on bioanalytical methods validation for macromolecules. Summary report *Pharmaceutical Research* 2001; sept Vol 18, (9) 1373-1383.
41. Kissel T, Brich Z, Bantle S et al. Parenteral depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. *Journal of controlled Release*. 1991 16: pág 27-42.
42. Blanco-Príeto, et al, In vitro and in vivo evaluation of a somatostatin analogue released from PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 2000 67: pág 19-28.
43. Bodmer D, Kiessel T, Traeschlin E. Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *Journal of Controlled Release* 1992 21: pág 129-138.
44. Michael Abazinge, Tanise Jackson In vitro and in vivo characterization of biodegradable enoxacin microspheres *Eur. J. Pharm and Biopharm* 2000; 49: pág 191-194
45. Walters Kenneth A. Et al, Comparison of the transdermal delivery of Estradiol from two gel formulations. *Maturitas* 1998 29: pág 189-195.
46. Tourgeman David E. Et al. Serum and tissue hormone levels of vaginally and orally administered Estradiol. *A. J. Obstet Gynecol* 1999; 180: pág 1480-1483
47. Guichard Jean-Pierre, Sauron Renée. Jones B. Anthony. Comparison of the pharmacokinetics of 17 beta Estradiol after a single 4-day application of Oesclim 50, Oesclim 100, and Vivelle 0.05 (menorest 50) transdermal delivery systems. *J. Clin. Pharmacol.* 1999; 39: pág 811-816.
48. Asko Järvinen, Nykänen Sirkka et al. Absorption and bioavailability of oEstradiol from a gel, a patch and a tablet. *Maturitas* 32(1999) pág 103-113.

## APENDICE 1. FORMULAS PARA EL CALCULO DE PARAMETROS FARMACOCINETICOS.

### Area bajo la curva al último tiempo (ABC\_t o AUC\_LAST)

El método empleado es el de los trapezoides que se representa a continuación:

$$AUC\_LAST = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Donde:

n= número de datos para realizar el perfil plasmático

t<sub>i</sub>= tiempo en que se realiza la iésima toma de muestra

C<sub>i</sub>= Concentración obtenida en el iésimo tiempo de muestreo

### Area bajo la curva de 0 a infinito (AUC\_INF o ABC\_INF)

$$AUC\_INF = AUC + C_L / BETA\_ALL$$

Donde:

C<sub>L</sub> = Concentración de la última muestra

BETA\_ALL o Kel= Constante de eliminación

### Constante de eliminación (BETA\_ALL o Kel)

Se estima a partir de la siguiente regresión lineal:

$$\ln C_i = \text{intercepto} + BETA\_ALL * t_i$$

Donde:

lnC<sub>i</sub>= Logaritmo natural de la concentración de la iésima toma de muestra que corresponde a la fase de eliminación

BETA\_ALL =Pendiente de la regresión lineal (Constante de eliminación)

t<sub>i</sub>= Tiempo de la iésima toma de muestra correspondiente a la fase de eliminación.

**Tiempo de vida media (HALF\_ALL o  $t_{1/2}$ )**

$$\text{HALF\_ALL} = -\ln(0.5) / \text{BETA\_ALL}$$

Donde:

BETA\_ALL o kel= Constante de eliminación

**Concentración plasmática máxima (Cmax)**

Es la concentración máxima observada (gráfica).

Area bajo la curva del primer momento de cero a infinito:

$$\text{AUMC\_inf} = \text{AUMC} + \frac{(t_{\text{last}} * c_{\text{last}})}{\text{beta}} + \frac{c_{\text{last}}}{\text{beta}^2}$$

donde:

AUMC= área bajo la curva del primer momento de cero al tiempo t

$t_{\text{last}}$  = Último tiempo de muestreo.

$c_{\text{last}}$  = Última concentración plasmática.

beta= Constante de eliminación.

**Tiempo de residencia media (MRT o TMR)**

$$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC\_INF}}{\text{AUC\_INF}}$$

donde:

AUMC\_INF= Area bajo la curva del primer momento de cero a infinito.

AUC\_INF= Area bajo la curva de cero a infinito.