



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

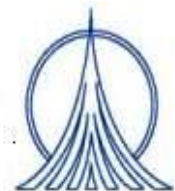
INFLUENCIA DEL ANTIPROGESTÁGENO “MIFEPRISTONA” SOBRE
LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL AGENTE
ANTINEOPLÁSICO “ETOPÓSIDO” EN RATAS SPRAGUE
DAWLEY

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

B E A T R I Z O R T E G A N A V A

DIRECTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2005



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**INFLUENCIA DEL ANTIPROGESTÁGENO "MIFEPRISTONA"
SOBRE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL
AGENTE ANTINEOPLÁSICO "ETOPÓSIDO" EN RATAS
SPRAGUE DAWLEY**

Esta tesis fue parcialmente apoyada por el proyecto
CONACYT No 44176

CARRERA: Químico Farmacéutico Biólogo
ALUMNA: Beatriz Ortega Nava
AÑO DE TERMINACIÓN: 2004
ORIENTACIÓN: Farmacia
DIRECTOR DE TESIS: Dra. Patricia García López
OPCIÓN DE TITULACIÓN: Tesis experimental
LABORATORIO DE FARMACIA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios el haberme dado la vida por llenarme de bendiciones, porque en todo lo que hago él esta tomando mi mano.

A cada uno de mis maestro que a lo lago de mi formación compartieron sus conocimientos.

A mis sinodales por su tiempo y sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Paty por compartir sus conocimientos, por su tolerancia, por enseñarme a trabajar.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a las dos mujeres más importantes de mi vida.

Mi mani por ser mi inspiración, mi apoyo incondicional, por están cuando te he necesitado.

Y mi abuelita, por haberme enseñado amar a Dios, por ser mi amiga mi segunda mama.

A mi familia por su amor y protección.

A mis primos, a ellos les digo que la vida siempre esta acompañada de éxitos, cuando se
lucha por alcanzarlos.

A mis amigas Lourdes, Margarita y Lenen por enseñarme el valor de la verdadera amistad,
donde quiera que estén siempre estarán en mi corazón.

A Michele e Inés porque juntas aprehendimos el trabajo en equipo.

Y a ti, por creer en mí, por saber esperar, por haberme enseñado el verdadero amor.
Luis Alfredo.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Generalidades del Cáncer	3
1. Epidemiología	3
2. Definición	4
3. Características	5
4. Tipos	5
5. Métodos terapéuticos	6
a. Cirugía	6
b. Radioterapia	6
c. Quimioterapia	6
B. Farmacología	7
1. Qué estudia	7
2. Farmacocinética	8
3. Farmacodinamia	11
4. Interacciones	12
C. Métodos cromatográficos	13
1. Clasificación	13
2. Cromatografía de líquidos	14
3. Tipos de detección	15
4. Detector electroquímico	16
D. Validación de métodos analíticos	17
1. Concepto y utilidad	17
2. Parámetros de validación	17
a. Linealidad	17
b. Precisión	17
1) Reproducibilidad	17
2) Repetibilidad	18
c. Exactitud	18
d. Especificidad	18
e. Límite de detección	18
f. Límite de cuantificación	18
g. Estabilidad	18
E. Etopósido	19
1. Estructura química	19
2. Usos terapéuticos	19
a. <i>in vitro</i>	19
b. <i>in vivo</i>	20
3. Mecanismo de acción	20

4. Farmacocinética	21
F. Mifepristona	22
1. Estructura química	22
2. Usos terapéuticos	23
a. <i>in vitro</i>	23
b. <i>in vivo</i>	23
3. Mecanismo de acción	24
4. Farmacocinética	24
III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	25
IV. OBJETIVOS	26
A. General	26
B. Particulares	26
V. HIPÓTESIS	27
VI. MATERIAL	28
VII. METODOLOGÍA	30
VIII. RESULTADOS	35
IX. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	49
X. CONCLUSIONES	53
XI. REFERENCIAS	54

RESUMEN

El cáncer a nivel mundial se ha convertido en un problema de salud pública, en nuestro país es la segunda causa de muerte con predominio en el sexo femenino, siendo los más frecuentes el Cáncer Cérvico Uterino, Mama y Ovario, mientras que para el sexo masculino son: el Cáncer de Próstata, Estómago y Ganglio Linfático. La gran mayoría de pacientes se someten al tratamiento de quimioterapia combinada la cual tiene como objetivo incrementar la eficacia sobre las células tumorales. Sin embargo, son bien conocidos los efectos adversos que se presentan por el uso de la combinación de agentes antineoplásicos, así que se buscan nuevas estrategias de combinación con la finalidad de incrementar el efecto farmacológico y disminuir los efectos adversos. En investigaciones recientes se ha encontrado que hay una gran similitud entre la implantación embrionaria y la metástasis de tumores, compartiendo impresionantemente condiciones biológicas similares como lo es; la adhesión celular, angiogenesis, invasión y expresión genética, por esta razón es interesante la dirección que se ha tornado al uso de antiprogéstágenos, fármacos contra la implantación embrionaria o invasión de tumores y metástasis. Por ello en el laboratorio se esta estudiado el uso de agentes antineoplásicos (Etopósido) combinados con agentes antiprogéstágenos como Mifepristona en una línea celular de cáncer de mama (MCF-7), obteniéndose un efecto sinergístico sobre la inhibición de la proliferación celular. En este trabajo se estudió la posible interacción a nivel sistémico de la combinación del antineoplásico Etopósido con el agente antiprogéstágeno Mifepristona en ratas Sprague Dawley.

Las muestras sanguíneas se recolectaron a diferentes tiempos durante 6 horas y se determinó la concentración sanguínea de Etopósido por Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento, (CLAR) a partir de la realización de las curvas de concentración sanguínea de Etopósido contra tiempo se calcularon los parámetros farmacocinéticos de concentración máxima (C_{max}), tiempo máximo (t_{max}) y área bajo la curva (ABC_{0-360}). Para el grupo tratado la C_{max} fue de $0.0981\mu\text{g/mL}$ mientras que la del grupo control fue $0.1197\mu\text{g/mL}$, en cuanto al ABC_{0-360} del grupo tratado se obtuvo $0.5508\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$ y para el grupo control $0.2576\mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$. Efecto que se debe a una posible interacción a nivel de eliminación, involucrando mecanismos como inhibición del metabolismo vía CYP450 3A4 y/o inhibición

de Pgp (glicoproteína que actúa como bomba expulsora de agentes xenobioticos) presente en la membrana celular de varios órganos entre ellos el intestino delgado, en éste se encuentra tanto del lado baso-lateral y apical de la célula epitelial expulsando hacia el lumen intestinal al fármaco impidiendo que pase a circulación sistémica. Por lo anterior Mifepristona si modificó la farmacocinética de Etopósido, reflejado en los parámetros farmacocinéticos.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha observado que a través de los años, el número de personas que contraen el cáncer es cada vez mayor, esto debido a un cambio en los hábitos alimenticios, ambientales y laborales, además por los mecanismos de resistencia ya sea intrínsecos (aquellos donde las células cancerosas no responden desde el inicio del tratamiento) o adquiridos (desarrollada durante el tratamiento), se necesita estudiar nuevas combinaciones farmacológicas que provoquen un mayor número de células cancerosas muertas. Por ello el uso de la terapia combinada es un método terapéutico muy utilizado por los oncólogos, entre las ventajas de este método se encuentran las siguientes; ¹

1. Promover la llegada del fármaco a las células tumorales.
2. Disminuir la toxicidad en células normales.
3. Reducir la posibilidad de presentar resistencia a un fármaco.
4. Actuar sobre tumores que poseen poblaciones celulares heterogéneas.
5. Tener efecto sinérgico o potencializado.
6. Diferentes mecanismos de acción y de toxicidad.

Recientemente se han hecho estudios de combinación entre agentes antineoplásicos y antiprogéstágenos como es el caso de Mifepristona, la cual se ha utilizado en varios tipos de cáncer, como lo son: Mama, Ovario, Próstata y Pulmonar entre otros, ²⁻⁵ en todos ellos Mifepristona demostró tener un efecto más allá del ginecológico, por bloqueo de uno de los siguientes mecanismos: sobreexpresión de genes involucrados en la resistencia a múltiples fármacos (del inglés *mdr 1*), sobreexpresión de enzimas detoxificantes, o alteración de la célula blanco⁶. En cuanto a terapia combinada, en estudios *in vitro*, se demostró que al utilizar Mifepristona y un agente antineoplásico, como Vincristina, en una línea celular de cáncer de pulmón (GLC4/Sb30), los niveles intracelulares del antineoplásico aumentaron con respecto a las células control, permitiendo un mayor efecto citotóxico⁷. En otro estudio realizado por Wang *et al.*⁸ se demostró que hay una interacción entre Mifepristona y Cisplatino al exponerse en una línea celular de adenocarcinoma de ovario (SK-OV-3), en este mismo artículo se indica que los efectos antiproliferativos de Mifepristona se debe a

mecanismos independientes a receptores progestágenos, más bien a la regulación a la baja de Bcl-2 (proteína que regula los mecanismos antiapoptóticos) e inducción de la expresión de TGF- β . Mientras que en una línea celular epitelial de carcinoma de cervix (HeLa) Mifepristona potencializó el efecto citotóxico de Cisplatino⁹, comprobándose a nivel *in vivo* con ratones atímicos, a quienes se les implanto un tumor de cáncer cérvico uterino, observándose una disminución del tamaño en dicho tumor, al mismo tiempo que disminuyó la toxicidad observándose en el decrecimiento del peso corporal¹⁰.

Mientras que Etopósido es un derivado semisintético de la epipodofilotoxina extraída de la planta mandrágora, se utiliza como antineoplásico de primera línea para tratar el cáncer Testicular, Ovárico, Pulmonar de células pequeñas, Linfoma Hodgkin y no Hodgkin, entre otros¹¹⁻¹³. A nivel *in vitro* ha mostrado tener un potente efecto citotóxico en varias líneas celulares humanas, una de ellas es la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer de ovario (A2780), en dosis y tiempo de exposición dependiente. Está clasificado dentro de los agentes que actúan sobre el ciclo celular, debido a que hace un arresto en la fase S tardía e inicio de la G₂. Estos datos proporcionan la base para que se investigue la combinación entre Mifepristona y Etopósido y así mejorar la calidad de vida del paciente.

II. ANTECEDENTES

A. GENERALIDADES DEL CÁNCER

1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer ha acompañado siempre al hombre, por lo menos parece tan antiguo como éste, se han encontrado lesiones tumorales en huesos del *Pithecanthropus erectus*. En Egipto, se hallaron tumores malignos en momias que datan del año 3400 a.C., calificadas como osteosarcomas¹⁴. El papiro de Edwin-Smith, que data del antiguo Imperio Egipto, con una probable antigüedad de 1600 años a.C., consiste en una colección de 48 historias clínicas, tiene una dedicada al cáncer de mama. El papiro de Ebers de aproximadamente 1550 años a.C., en su última colección trata de los tumores¹⁵, así a través de los años se ha observado un incremento de este padecimiento, reflejado en las tasas de morbilidad y mortalidad. Con el propósito de determinar el panorama epidemiológico en nuestro país, desde hace varios años se han llevado a cabo diversos estudios, sistemas de vigilancia y registro de esta enfermedad a través del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM). Mediante este registro se sabe que desde 1990, el cáncer es la segunda causa de muerte en México y que en el año 2001 existió un predominio en el sexo femenino con el 52% y en hombres con el 48% de los casos reportados. Los más frecuentes para el sexo femenino son el Cáncer Cérvico Uterino, Mama y Ovario y para el sexo masculino el de Próstata, Estómago y Ganglio Linfático. Haciendo énfasis en el cáncer de mama, en el año 2001, hubo 17 defunciones por 100,000 mujeres, el problema comienza de los 25 años en adelante agravando con la edad, de los 35 a los 64 años hay un aumento considerable y pasando los 65 años la tasa duplica al del grupo anterior. Por ello, el cáncer es sin duda una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor impacto desde finales del siglo XX, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad sino también por la gran variedad de factores de riesgo tanto individuales, laborales y ambientales con los que se asocia¹⁶.

2. DEFINICIÓN

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades producto de una pérdida, mutación o desregulación de genes cuya función es regular positiva o negativamente la proliferación y la reparación celular¹⁷, provocando un crecimiento excesivo y sin control; además, es multifactorial porque intervienen uno o más de los siguientes factores; tipo de ocupación, estilos de vida propio como sobrepeso, deficiencia vitamínica, tratamiento prolongado con anticonceptivos hormonales, número de embarazos, así como antecedentes familiares del padecimiento, edad y raza (Figura 1).

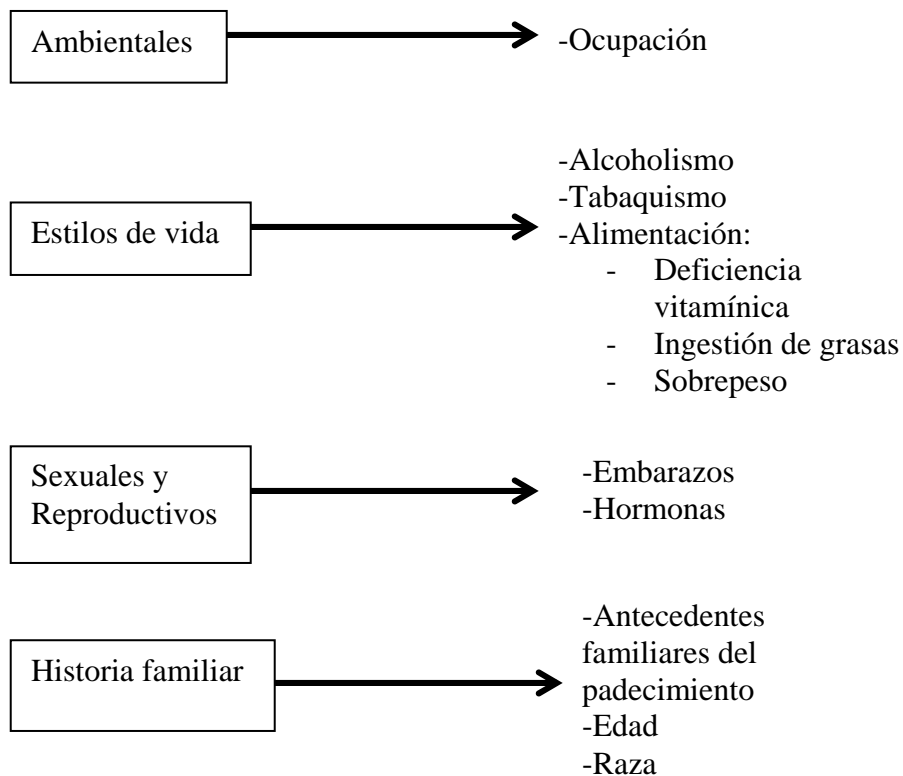


Figura 1. Factores que pueden inducir el desarrollo del cáncer ^{18,19}.

Es importante señalar que la presencia de una o varias causas en una persona no es factor para desencadenar cáncer, eso dependerá de la inestabilidad genética por la acumulación de mutaciones.

3. CARACTERÍSTICAS

Presenta cuatro características esenciales;

1. Clonalidad: cada tumor maligno se origina de una sola célula cancerosa que prolifera y da lugar a un conjunto de células malignas.
2. Autonomía: el crecimiento y desarrollo de la célula cancerosa no es regulado de forma correcta por los moduladores hormonales y bioquímicos normales.
3. Anaplasia: las células tumorales tienen una pérdida de diferenciación celular.
4. Metástasis: la célula cancerosa tiene capacidad de difundir (invadir otros tejidos) a distancia de su lugar de origen.

Cabe mencionar que las células presentes en un tumor no son homogéneas aunque se hayan originado de un mismo grupo clonal; por el contrario, en el transcurso de la proliferación y del crecimiento las células desarrollan características distintas de carácter bioquímico, morfológico e inmunológico posiblemente como consecuencia de cambios mutágenos.

4. TIPOS

El cáncer se desarrolla en cualquier parte del organismo incluida la sangre, ello conlleva a una gran variedad, por ello la terminología que se emplea para catalogarlo deriva de las células o tejidos donde se origina. Obteniéndose la siguiente clasificación¹.

- Carcinoma. Un tumor derivado de las células epiteliales, estas forman la superficie de nuestra piel y órganos.
- Sarcoma. Un tumor derivado del músculo, el hueso, el cartílago, la grasa o el tejido conectivo.
- Leucemia. Un cáncer derivado de los glóbulos blancos o sus precursores.
- Linfoma. Un cáncer derivado de la médula ósea que afecta el sistema linfático.
- Mielomas. Un cáncer de glóbulos blancos destinados a la producción de anticuerpos.

5. MÉTODOS TERAPÉUTICOS

Si se extirpa completamente el tumor se habla de curación o tratamiento radical. Pero si no está localizado y hay metástasis el objetivo de la terapia es paliativa, en ella hay una reducción del tamaño del tumor y prolongación de la supervivencia con una calidad de vida aceptable. Los tumores se tratan por medio de cirugía, radioterapia y quimioterapia. Estos métodos pueden emplearse solos o en combinación, según el estado de la persona, la naturaleza, extensión y sitio del tumor.

a. Cirugía

La intervención quirúrgica tiene el papel central en el tratamiento del cáncer, en general, el 60% de todos los pacientes requieren de un tratamiento quirúrgico en el curso de su tratamiento. En algunos casos será la obtención de una biopsia y otros casos será un procedimiento mayor y definitivo con el objeto de buscar la cura del paciente.

b. Radioterapia

Método que se utiliza en el tratamiento inicial y paliativo del cáncer. Consiste en el uso de partículas de alta energía, como los rayos X, rayos gama, partículas alfa o beta, a través de una máquina llamada acelerador lineal, en donde se generan y dirigen esas partículas hacia el lugar concreto donde se tengan que aplicar.

c. Quimioterapia

Es la terapia a base de fármacos, se usa para combatir tumores en los cuales ya hay diseminación o de hecho existe metástasis. Tal capacidad hace que la quimioterapia sea muy importante en la lucha del paciente por superar el cáncer, dado que la radioterapia y la intervención quirúrgica son adecuadas sólo para tratar el cáncer en zonas localizadas²⁰. Sin embargo algunos pacientes no responden desde el inicio o durante el tratamiento, esto debido a que pueden presentar resistencia a los fármacos la cual se desarrolla con rapidez cuando el tratamiento se realiza con un solo fármaco. A nivel celular existe más de un

mecanismo de resistencia que permite a una célula cancerosa sobrevivir. En la década de 1960, se utilizó la quimioterapia combinada para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y la enfermedad de Hodgkin, fue una consecuencia de estudios experimentales que demostraban que la combinación de fármacos daba una mayor capacidad de destrucción celular y retardaba o impedía la resistencia a los fármacos. Los fármacos se usan en combinación cuando la toxicidad de uno de ellos no se potencializa al combinarse con el otro y cuando se han obtenido evidencias en tumores *in vitro* que la combinación proporciona efectos antitumorales aditivos o sinérgicos²¹. La quimioterapia combinada presenta varias ventajas entre ellas están;

1. Promover la llegada del fármaco a las células tumorales.
2. Disminuir la toxicidad en células normales.
3. Reducir la posibilidad de presentar resistencia a un fármaco.
4. Actuar sobre tumores que poseen poblaciones celulares heterogéneas.
5. Tener diferentes mecanismos de acción o actuar en fases celulares distintas.
6. Presentar interacciones sinérgica o de potenciación.

Estos tres tratamientos cuando se utilizan en combinación, sus rutas se complementan para atacar la enfermedad ofreciendo con frecuencia al paciente, mejores posibilidades de derrotar el cáncer.

B. FARMACOLOGÍA

1. QUÉ ESTUDIA

Deriva de la palabra griega *pharmacon*, que significa medicamento, poción o droga, y *logia* significa estudio; por lo tanto, la farmacología estudia, los efectos, usos, mecanismos de acción y vías de administración de los fármacos, es decir; las interacciones entre los sistemas vivos y las moléculas especialmente de las sustancias químicas que son introducidas desde el exterior del sistema. Abarca las acciones tanto deseables como indeseables de los fármacos, con el objetivo primordial de beneficiar al paciente y hacerlo

de un modo racional y estricto. Se divide en dos ramas; farmacocinética y farmacodinamia²².

2. FARMACOCINÉTICA

Es la rama de la farmacología que se ocupa de estudiar los procesos de liberación, absorción, distribución, biotransformación y excreción de los fármacos²³. Determina la rapidez, la concentración y por cuanto tiempo el fármaco se encuentra en el organismo, a partir de la aplicación del medicamento sobre el organismo vivo, ello requiere la cuantificación de las concentraciones del fármaco y sus metabolitos en los líquidos biológicos, tejidos y excretas a través de la construcción de modelos adecuados, así como su relación con la respuesta farmacológica. También proporciona al medico la posibilidad de tomar en cuenta las diversas características patológica y fisiológicas de un paciente en particular. Las etapas por las que pasa el fármaco, desde que se administra hasta que es eliminado, se inician con la liberación de la forma farmacéutica continuando con la absorción, posteriormente una fracción se elimina sin cambio alguno, otra se distribuye hacia los tejidos donde se biotransforma y finalmente es eliminado (Figura 2).

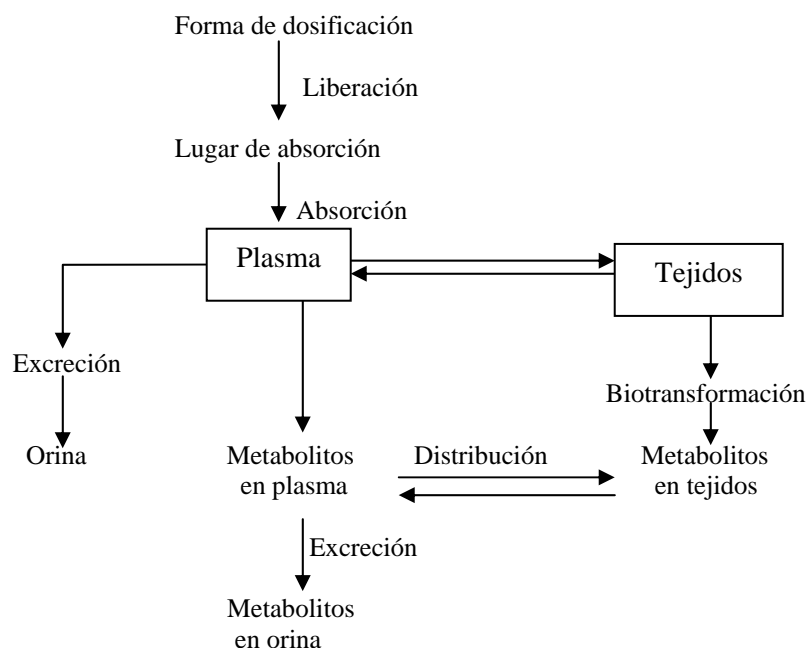


Figura 2. Esquema general de liberación, absorción, distribución, biotransformación y eliminación de fármacos (LADBE).

La absorción; incluye el paso del fármaco desde el lugar de administración hasta la sangre. Para ello el fármaco tiene que atravesar la membrana celular y lo hace por los siguientes mecanismos:

- Transporte pasivo. Hay dos mecanismos; **difusión pasiva**, por transferencia a través del componente lipídico, el movimiento del soluto será de la fase de mayor concentración a la fase de menor concentración, proceso que no requiere gasto de energía. Tanto las sustancias liposolubles como insolubles de pequeño tamaño pueden atravesar las membranas por este proceso; y **filtración** proceso puramente físico, la fuerza motora es un gradiente de presión y la velocidad de filtración depende de éste gradiente y del tamaño de la partícula, hay flujo del disolvente junto con las sustancias disueltas en él.
- Transporte especializado; comprende dos mecanismos; **transporte activo**, es la forma de transporte en la que el fármaco atraviesa la membrana en contra de un gradiente electroquímico. Para ello requiere consumo de energía procedente del metabolismo celular y la utilización de varias proteínas de membrana con función transportadora; **difusión facilitada**, se realiza a favor de un gradiente de concentración por lo que no requiere energía, pero utiliza un sistema específico transportador que puede ser saturable o inhibido.
- Pinocitosis; la transferencia se hace por invaginación local de la membrana celular y separación subsiguiente de una vesícula, mecanismo por el cual hay ingesta de líquidos. En algunos casos también puede transferirse material sólido por invaginación pero entonces el proceso se denomina fagocitosis²⁴.

La distribución de un fármaco en todo el organismo depende de su afinidad por los diversos componentes de los tejidos, incluyendo su hidrosolubilidad, liposolubilidad, unión a sustancias extracelulares y captación intracelular. Una vez que el fármaco ha penetrado

en el compartimiento sanguíneo, el ritmo con el cual penetra en los tejidos y otros líquidos corporales depende de varios factores, estos incluyen;²⁵

1. Intensidad de riego sanguíneo del tejido.
2. Masa del tejido.
3. Grado de fijación del fármaco por proteínas plasmáticas y tisulares.
4. Diferencia del pH regional.
5. Mecanismos de transporte disponible.
6. Características de permeabilidad de membranas tisulares específicas.

La biotransformación; son los cambios bioquímicos realizados en el organismo mediante los cuales, los fármacos que fueron absorbidos en el tubo digestivo y antes de pasar al torrente sanguíneo son transportados por la circulación porta al hígado, en donde pueden ser captados y metabolizados por los hepatocitos, estos cambios enzimáticos causan disminución o pérdida de su actividad farmacológica. El principal órgano relacionado con el metabolismo de los fármacos es el hígado, pero también el riñón, pulmón, mucosa intestinal, plasma y tejido nervioso. El metabolismo disminuye la liposolubilidad de la molécula, haciéndola más polar por lo tanto más hidrófila facilitando su eliminación²². Estas reacciones químicas de biotransformación se clasifican como reacciones de fase I y de fase II.

Las de fase I; convierten al fármaco original en un metabolito más polar por oxidación, reducción o hidrólisis.

Las de fase II; se denominan reacciones de conjugación o de síntesis, implican la unión del fármaco o de su metabolito polar con un sustrato endógeno como glucuronato, sulfato, acetato o un aminoácido.

La eliminación; es el paso de un fármaco del medio interno al externo. Se distinguen las siguientes vías de eliminación:

- | | | |
|-------------|---------------|-------------|
| 1. Renal | 4. Salival | 7. Cutánea |
| 2. Biliar | 5. Gástrica | 8. Lagrimal |
| 3. Pulmonar | 6. Intestinal | 9. Mamaria |

Del proceso farmacocinético se obtienen parámetros que expresan la intensidad y la velocidad con que los fármacos cursan temporalmente en el organismo, como son; área bajo la curva (ABC), indica la cantidad de fármaco en sangre que esta disponible para ejercer el efecto farmacológico, distribuirse o biotransformarse; vida media ($t_{1/2}$), tiempo en el cual se ha eliminado la mitad de la dosis del fármaco; Volumen de distribución (Vd), volumen hipotético en el cual el fármaco se esta distribuyendo; Concentración y tiempo máximo (C_{max} y t_{max}), donde la concentración máxima es la cantidad más alta del fármaco que se obtiene en sangre y al mismo tiempo se relaciona con la obtención del efecto terapéutico, mientras que el tiempo máximo es el tiempo en que se alcanza esa concentración máxima, es decir; que tanto tiempo se tardará en presentarse el efecto; y la depuración (Cl), volumen de sangre que se libera de fármaco por unidad de tiempo.

3. FARMACODINAMIA

Estudia los efectos bioquímicos, fisiológicos y mecanismos de acción de los fármacos en los organismos vivos, es decir; lo que el fármaco hace al organismo. En general, los efectos farmacológicos se deben a la interacción entre el medicamento y los componentes específicos del organismo llamados receptores. Los receptores son macromoléculas que pueden estar localizadas en la membrana celular o en el espacio intracelular y se combinan con el fármaco para producir una reacción química, cuya consecuencia es que modifica la función celular. Por lo tanto, para que el efecto biológico aparezca, debe ocurrir primero la unión del fármaco con su receptor. Esta interacción sucede por el establecimiento de uniones químicas, eléctricas o nucleares entre las partes activas de ambas moléculas. Mientras más fuerte sea la unión más tiempo persiste el efecto farmacológico, como es el caso de la unión covalente en donde dos átomos comparten sus electrones de valencia, debido a su fuerza y a la dificultad de reversión o de rotura, los fármacos con este tipo de unión poseen efecto prolongado, estos compuestos tienden a ser extremadamente tóxicos. Existen otros tipos de unión que participan en la interacción fármaco-receptor, como los; enlaces iónicos, en ella la interacción es a través de grupos catiónicos y aniónicos; puentes de hidrógeno resultan de la atracción entre átomos de hidrógeno y pares de electrones libres de oxígeno, nitrógeno o flúor; y los llamados enlaces de van der Waals, interacción entre átomos neutros muy cercanos hay atracción electrostática del núcleo por electrones de otra

molécula. Estos tres tipos de enlace son débiles con efecto farmacológico de corta duración²⁶.

4. INTERACCIONES

Al utilizar terapia combinada, surgen interacciones farmacológicas que modifican la acción profiláctica, terapéutica o diagnóstica de un fármaco, dentro o en la superficie del organismo, por acción de una segunda sustancia química de la dieta o del medio ambiente. Como resultado del fenómeno, la acción de uno o de ambos interactuantes puede aumentar, disminuir, alterarse o no modificarse. En términos generales los fármacos pueden interactuar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Interacciones farmacodinámicas. Se divide en; sumación, potenciación e inhibición. Cuando hay **sumación**, el efecto de dos fármacos administrados al mismo tiempo son exactamente aquellos que se hubieran previsto a partir de la suma de sus efectos por separado. **Potenciación** o alternativamente sinergismo, donde los efectos de dos fármacos son mayores de lo previsto a partir de sus efectos por separado; e **inhibición**, fenómeno por el cual los efectos de dos fármacos son menores que los previstos a partir de sus efectos por separado²⁷.

Interacciones farmacocinéticas; tienen lugar cuando un agente modifica la absorción, distribución, biotransformación o eliminación de otro, bien favoreciendo su efecto u oponiéndose a él.

Durante la fase de absorción; las interacciones de los fármacos pueden producirse inmediatamente después de ser administrados por cualquier vía, las más importantes son las que se relacionan con la administración oral, local (tópica) y parenteral. Esta interacción produce rapidez en el vaciamiento gástrico o aumento en la motilidad del intestino.

Durante la fase de distribución; las interacciones farmacológicas pueden alterar la distribución de los fármacos al afectar su unión a proteínas plasmáticas, el flujo sanguíneo o el transporte del mismo a través de las membranas.

En relación con el metabolismo; la intensidad y la duración del efecto farmacológico de muchos fármacos, depende de la rapidez del metabolismo de éstos. Muchos fármacos o sus

metabolitos pueden acelerar o disminuir la rapidez del metabolismo de ellos mismos o de otros fármacos afines o no afines, como es el caso de fármacos que tienen la misma vía metabólica, como es el caso de aquellos que se metabolizan por citocromo P450 y por la misma isoforma.

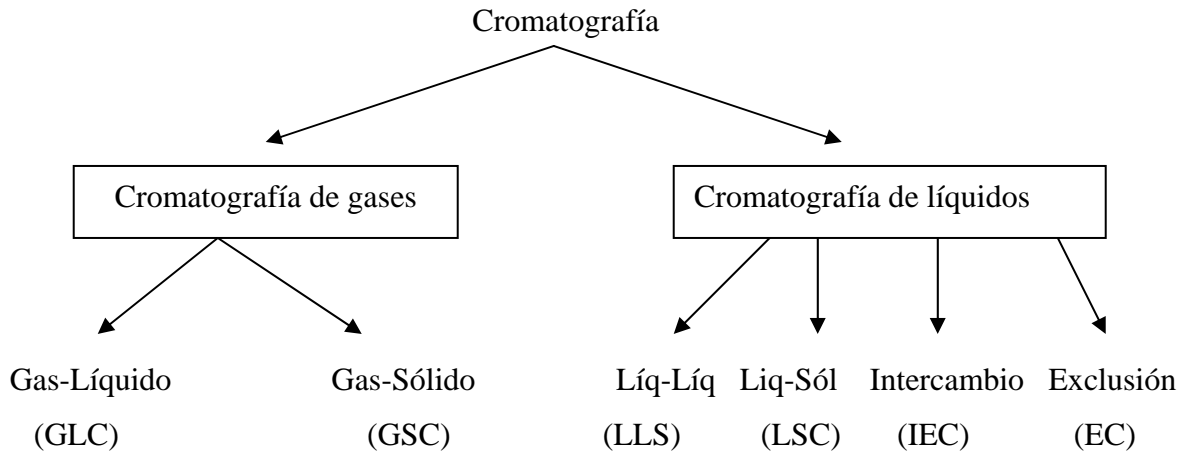
Durante la eliminación; las interacciones de los fármacos pueden alterar la excreción de otros fármacos por la orina, al aumentar o disminuir la filtración glomerular, la secreción tubular o la resorción tubular activa o pasiva. Los mecanismos más importantes que participan en estas interacciones son las alteraciones en el flujo sanguíneo glomerular, los cambios en los gradientes osmóticos o de pH dentro de los túbulos, o la competencia por los sistemas de transporte tubular²⁸.

C. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía es probablemente una de las técnicas analíticas más versátiles en la química moderna, esto se debe a la capacidad de cuantificar individualmente compuestos presentes en una mezcla, además se puede analizar una gran variedad de muestras tanto sólidas, líquidas y gaseosas. La cromatografía se define como un proceso físico de separación, el fundamento de este proceso se basa en los diferentes coeficientes de distribución que presentan los componentes individuales entre dos fases inmiscibles una de ellas estacionaria y la otra móvil²⁹.

1. CLASIFICACIÓN

Se clasifican de acuerdo a la naturaleza de las fases; la estacionaria puede ser sólida o líquida y la fase móvil, líquida o gaseoso³⁰.



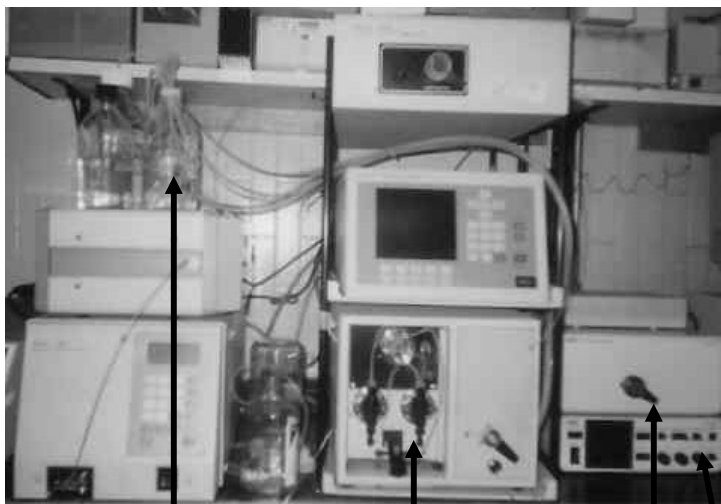
2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, de High Performance Liquid Chromatography) o CLAR no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. Es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de grupos polifuncionales de alto peso molecular. Los principales componentes de CLAR son los siguientes: (Figura 3)

1. Reservorio de la fase móvil. Puede ser cualquier recipiente desde un frasco Erlenmeyer hasta un vaso de precipitado, siempre y cuando este bien cerrado, además; se burbujea helio a través de la fase móvil.
2. Bombas. Estas proporcionan un flujo constante de la fase móvil a la columna. Es el módulo que entrega a la fase móvil de una manera exacta y precisa, al resto del cromatógrafo.
3. Inyector. Es el sistema por donde se introduce la muestra.
4. Precolumna y columna. En la primera, se filtra la muestra evitando el deterioro de la columna, siendo en ésta última, donde se lleva a cabo la separación de la muestra.
5. Detectores. Proporciona de forma continua información acerca de la composición del flujo que circula, generalmente origina una señal eléctrica continua.
6. Registrador de datos. Amplifica y registra las señales eléctricas provenientes del detector y origina una señal gráfica conocida como cromatograma.

Cromatógrafo de Líquidos de Alta resolución

I



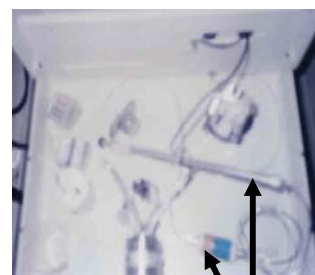
1

2

3

5

II



4

Figura 3. Esquema de un Cromatógrafo de Líquidos de Alto Rendimiento (CLAR) con detector electroquímico, mostrando tanto los componentes externos del equipo (I), como los internos del detector (II).

3. TIPOS DE DETECTORES

Todavía no se fabrica un detector universal y sensible para CLAR. Por ello es necesario seleccionar el detector con base en el problema a resolver. Las características ideales que debe poseer un detector continuo en cromatografía líquida son: ³¹

1. Alta sensibilidad (del orden de 10^{-12} - 10^{-11} g/mL) lo que implica un bajo ruido de fondo.
2. Amplio rango lineal de concentración: entre 5 y 6 órdenes de magnitud.
3. Volumen mínimo de la célula de flujo, para evitar la dispersión de los solutos.
4. Debe ser no destructivo, en caso que se quiera recuperar las fracciones de la muestra.

5. Debe operar continuamente durante largo tiempo y su empleo debe ser fácil y cómodo para el analista.

Los tipos de detectores son los siguientes:

1. Ultravioleta-visible
2. Fluorométrico
3. Absorción molecular
4. Refractometría
5. Conductimetría
6. Índice de refracción
7. Constante dieléctrica
8. Espectroscopía de masas
9. Electroquímico

4. DETECTOR ELECTROQUÍMICO

Este detector se basa en la oxidación y/o reducción del compuesto a separar en un electrodo conveniente. La detección principal esta basada en el concepto de polarografía, donde el potencial para la oxidación o reducción esta impuesta en dos electrodos, suficientes para producir una corriente en curso. Por lo tanto el nivel o la cantidad de corriente impuesta esta directamente relacionada con la concentración del analito, por ello el proceso es cuantitativo. Es sensible para compuestos que tienen fenol, catecolaminas, nitrosoaminas y ácidos orgánicos, además, que se encuentren en el rango de nanogramos ³².

D. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. CONCEPTO Y UTILIDAD

Validación es el proceso de obtener documentación que evidencie un alto grado de confianza de que un proceso específico se encuentra en sus especificaciones y funciona de la manera prevista. Por ello la validación de los métodos analíticos permite al investigador demostrar que el ensayo se ajusta a los requerimientos y se demuestra que los resultados obtenidos son correctos. Para ello se realizan varios ensayos y se obtienen varios parámetros³³.

2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

a. Linealidad

De un sistema o método, es la habilidad para que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática, sean proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

b. Precisión

Es el grado de concordancia entre resultados individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación y se evalúa por el grado de reproducibilidad y repetibilidad.

1) Reproducibilidad

Se refiere a la concordancia entre determinaciones diferentes, realizadas bajo condiciones diferentes como lo son; diferente laboratorio, diferente analista, en diferentes días y diferente equipo.

2) Repetibilidad

Se expresa como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones; mismo analista, mismo aparato y mismo laboratorio.

c. Exactitud

Es la concordancia entre los resultados obtenidos experimentalmente y el valor de referencia.

d. Especificidad

Es la capacidad del método para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

e. Límite de detección

Es la concentración más baja a la cual la sustancia de interés puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas.

f. Límite de cuantificación

Es la concentración más baja de la sustancia de interés que puede ser determinada con precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas.

g. Estabilidad

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

E. ETOPÓSIDO

1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Etopósido (4'-demethylepipodophyllotoxin-9-(4,6,-O-ethylidene-β-D-glucopyranoside) o simplemente VP-16, es un glicosido semisintético de la epipodofilotoxina, principio activo de la planta *Podophyllum peltatum* comúnmente llamada mandrágora. Tiene un peso molecular de 588g/mol, posee cinco anillos designados por A, B, C, D y E este último es una anillo dimetoxifenol, otros grupos presentes es el glucósido en el carbono 4 y los anillos alifáticos y aromáticos³⁴ (Figura 4).

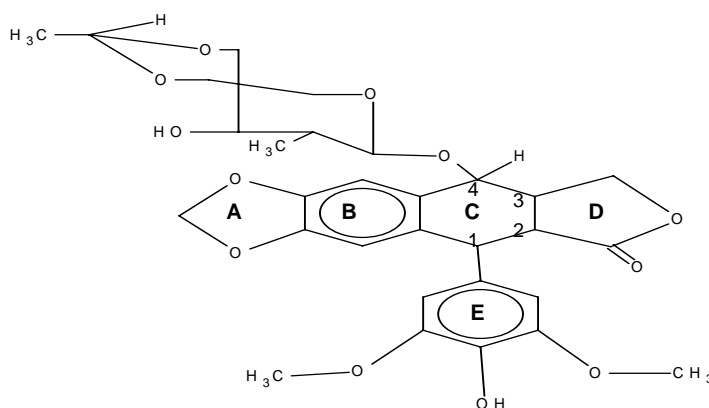


Figura 4. Estructura química de Etopósido o VP-16

2. USOS TERAPÉUTICOS

a. *In vitro*

Se demostró en experimentos *in vitro* que Etopósido es un potente citotóxico al utilizarse en líneas celulares humanas, una de ellas es la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), en ella Yang *et al.*³⁵ demostraron que al exponer las células a Etopósido, las células cancerosas mueren por efecto del antineoplásico. Maanen y Ruiters³⁶ también demuestran el daño a células HeLa (línea celular de carcinoma de cervix epitelial) por efecto del antineoplásico, posiblemente por un daño al ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Mientras que otros investigadores buscan alternativas terapéuticas para evitar los grandes efectos tóxicos y los

mecanismos de resistencia de las células cancerosas, para ello hacen uso de la terapia combinada. Moorsel *et al.*³⁷ exponen líneas células de cáncer de ovario (A2780) y de cáncer de pulmón de células pequeñas (H322), a Etopósido en combinación con Gemcitabina (dFdC), dicha combinación puede ser sinérgica, dependiendo del tiempo de exposición, proporción entre los dos antineoplásicos y la sucesión en la exposición, efecto que se debe al perfil de toxicidad bajo para dFdC y las diferencias en los mecanismos de citotoxicidad entre los dos fármacos.

b. *In vivo*

En estudios clínicos entre 1973-1974 se informó que Etopósido tenía actividad antineoplásica para la enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin, Leucemia no Linfocítica, Cáncer de pulmón tanto de células pequeñas y no pequeñas, Cáncer gástrico, de Ovario y Mama³⁸⁻⁴¹. Para 1980 Bloomfield *et al.*⁴² indican que la dirección del tratamiento para los pacientes con Linfoma no Hodgkins se basa en la terapia combinada, utilizando Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona y Etopósido. En 1987 Smales E.⁴³ y en 1991 Williams S.⁴⁴ publicaron los resultados de pacientes con tumores de ovario, los cuales fueron tratados conjuntamente con Bleomicina, Etopósido y Cisplatino, encontrando que con esta combinación se aumentó el tiempo de supervivencia controlando la enfermedad. En el 2001 estudios de Patterson *et al.*⁴⁵ con 33 pacientes de carcinoma testicular tratados conjuntamente con quimioterapia combinada y radioterapia, se demostró que se aumentaba el tiempo de supervivencia y la posibilidad de nuevas recaídas disminuía. Ya para el año 2005 tanto Singh *et al.* y Ardizzoni *et al.*^{46,47} estudiaron el efecto de la diferencia de sexo a la respuesta terapéutica del cáncer de pulmón de células pequeñas, encontrando que las mujeres experimentan más toxicidad relacionada a la quimioterapia, pero presentan mejor respuesta al tratamiento y un mayor tiempo de supervivencia.

3. MECANISMO DE ACCIÓN

Etopósido causa daño al ADN, por inhibición de la enzima topoisomerasa II, la cual es una enzima nuclear que mantiene y controla la topología del ADN, con ello se inhibe la progresión del ciclo celular, haciendo un arresto en la fase S tardía e inicio de la G₂.

4. FARMACOCINÉTICA

Absorción. Después de la administración oral, Etopósido sólo se absorbe moderadamente a través de la vía G.I. Se encuentra biodisponible el 50% de la dosis absorbida. Se une altamente a las proteínas plasmáticas, especialmente a la albúmina, aproximadamente el 94%.

Distribución. Se distribuye ampliamente en los tejidos del cuerpo, las concentraciones más altas se encuentran en el hígado, bazo, riñones y tejido cerebral. El fármaco cruza la barrera hematoencefálica en grado limitado y variable ⁴⁸.

Metabolismo. Se metaboliza en el hígado, por la familia del citocromo P450 isoforma 3A4, sus metabolitos principales son: ^{49,50}

1. Hidroxy acid [4'-demethylepipodophyllic acid-9-(4,6-O-ethylidene-β-D-glucopyranoside)]
2. Derivado Cis-(prico) lactona
3. Derivado aglicona
4. Conjugados del ácido glucoronido y sulfato
5. Producto de oxidación del anillo dimetoxifenol

Eliminación. Estudios farmacocinéticos en humanos muestran que el 35-40% de una administración se excreta intacta en la orina, mientras que en las heces se elimina una escasa porción de la dosis. Por otro lado estudios en ratas han mostrado que una cantidad significativa de Etopósido se excreta en la bilis, pero esta excreción no está demostrada en humanos.

Reacciones adversas. A nivel hemático; depresión de la médula ósea, leucopenia y trombocitopenia, a nivel del Sistema Nervioso Central; cefalea, hipersensibilidad visual, debilidad, neuropatía periférica, a nivel Gastro Intestinal; náusea, vómito, estomatitis y a nivel local; dolor en el sitio de aplicación y alopecia reversible.

En la Tabla 1 se muestran los parámetros farmacocinéticos de Etopósido administrado en pacientes por vía oral ⁵¹.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de Etopósido en pacientes

V_d	$13.8 \pm 7.4 \text{L/m}^2$
Cl (plasmática)	$26.5 \pm 9.6 \text{ mL/min/m}^2$
Cl (renal)	$9.3 \pm 3.9 \text{ mL/min/m}^2$
$t_{1/2}$	$6.4 \pm 2.4 \text{ h}$

F. MIFEPRISTONA

1. ESTRUCTURA QUÍMICA

Mifepristona (17 β -hydroxy-11 β -[4-dimethylaminophenyl]-17 α -[1-propynyl]estra-4,9-dien-3-one) o simplemente RU-486, es un esteroide sintético, que contiene un sustituto dimetilaminofenil en la posición 11 β ⁵² (Figura 5).

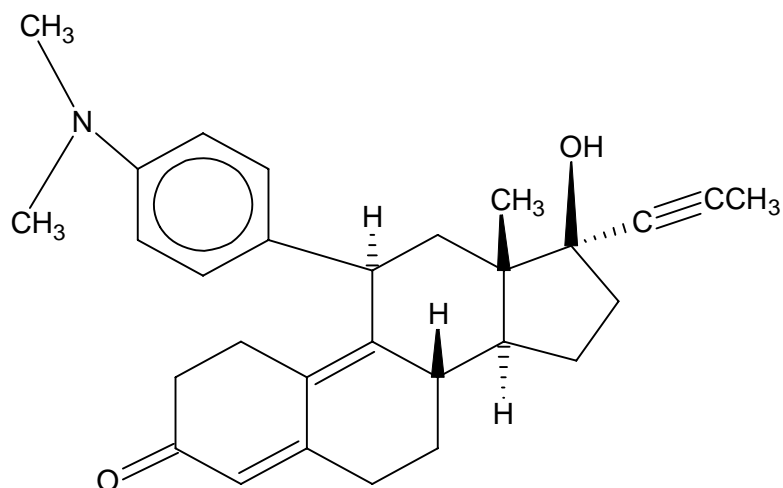


Figura 5. Estructura química de Mifepristona

2. USOS TERAPÉUTICOS

a. *In vitro*

En cuanto a su utilización en la terapia del cáncer, Da-Quiang *et al.*⁵³ demostraron que Mifepristona es un inductor de la apoptosis e inhibidor de la proliferación celular en una línea celular de adenocarcinoma gástrico (SGC-7901). En otra línea celular de adenocarcinoma gástrico (MKN-45) se demostró que inhibía el proceso metastásico⁵⁴. Mientras que en 1985 Bardon S. *et al.*⁵⁵ demostraron que al utilizar Mifepristona sobre líneas celulares de cáncer de mama, (MCF-7 y T47D) se inhibe el desarrollo celular por bloqueo de los receptores positivos a progesterona. Por lo que se refiere a terapia combinada, en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* Mifepristona y Cisplatino ejercen un efecto sinérgico el cual puede estar mediado al menos parcialmente por un incremento en la concentración intracelular del Cisplatino, por bloqueo de la proteína Pgp, así como por disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2^{9, 10, 56}.

b. *In vivo*

Se utiliza como fármaco de primera línea en la terminación del embarazo y como método anticonceptivo en la planificación familiar^{57, 58} Brown *et al.* encontraron que al administrar diariamente Mifepristona por 120 días a mujeres asiáticas y europeas, inhibe la ovulación e interrumpe la función endometrial normal, lo que justifica su uso como anticonceptivo⁵⁹. Por su parte Coyaji K *et al.*⁶⁰ estudiaron el uso de este antiprogestágeno como método anticonceptivo y abortivo en mujeres que viven en el área rural y metropolitana. Además de las aplicaciones ginecológicas ya mencionada, existen estudios en donde se ha utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Cushing, para remitir las anomalías cardiovasculares, metabólicas y neuropsiquiátricas que se presentan en los pacientes con esta enfermedad⁶¹, que al parecer también tiene actividad independiente a los receptores esteroides; como antioxidante y neuroprotector contra el estrés oxidativo inducido por la degeneración de neuronas, función que se atribuye a su estructura química, la cual es similar a otras moléculas con actividad antioxidativa⁶³.

3. MECANISMO DE ACCIÓN

Los efectos ginecológicos se derivan de un antagonismo a receptores de progesterona, es decir; bloquea la función de la hormona progesterona (antiprogéstágeno) y con ello evita que el útero se prepare para la implantación del óvulo, permitiendo las contracciones del útero⁶⁴.

4. FARMACOCINÉTICA

A las dos horas después de la administración alcanza los niveles plasmáticos, tiene gran afinidad a las glicoproteínas, se metaboliza en el hígado por el citocromo P450 isoforma 3A4, (CYP3A4) sus principales metabolitos son los productos monodimetilado, dimetilado e hidroxilado⁶⁵, excretado principalmente en la bilis, tiene una vida media de 30 horas aproximadamente. Se ha observado que los inhibidores de CYP3A4, como lo son ketoconazol, eritromicina y jugo de toronja, incrementan los niveles plasmáticos de Mifepristona⁶⁶. Los efectos adversos que presenta son el sangrado vaginal, calambres y dolor abdominal. En algunos casos, después de la administración hay sangrado por un periodo de 9 a 16 días, muy pocos requieren transfusión sanguínea. Transitoriamente presentan náuseas, vómito, diarrea y dolor de cabeza.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al incremento cada vez mayor en el número de individuos que presentan cáncer especialmente del sexo femenino con el cáncer de mama y cérvix, a la gran problemática de la resistencia a fármacos ya sea adquirida o intrínseca y a los efectos adversos tan severos que se presentan por el uso de la combinación de agentes antineoplásicos como lo son; náuseas, vómito, cefalea, debilidad, palpitaciones, entre otras, surge la necesidad de utilizar nuevas estrategias terapéuticas, que mejoren la expectativa de vida, el tiempo de recuperación y la calidad de vida en los pacientes oncológico, sin aumentar los efectos adversos ya mencionados.

En años recientes se ha observado que existen condiciones biológicas muy similares entre la implantación embrionaria y la metástasis de tumores como lo es; la adhesión celular, angiogenesis, invasión y la expresión genética, por esta razón es interesante la dirección que se ha tornado al uso de antiprogéstágenos fármacos contra la implantación embrionaria o invasión de tumores⁵⁴, además no produce los efectos secundarios de los antineoplásicos. Por ello, en el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo se estudia el uso de quimioterapia combinada con agentes antineoplásicos como es el caso de Etopósido y antiprogéstágenos como Mifepristona en una línea celular de cáncer de mama (MFC-7), en donde se ha demostrado que dicha combinación produce un efecto antiproliferativo sinérgico debido a un posible incremento intracelular del antineoplásico. Sin embargo, los estudios a nivel celular (*in vitro*), no permiten detectar una posible interacción a nivel sistémico. Así que en el presente trabajo se planteó estudiar la interacción farmacocinética de Mifepristona y Etopósido.

IV. OBJETIVOS

A. GENERAL

Evaluar la influencia de “Mifepristona” sobre la farmacocinética de “Etopósido” en ratas Sprague Dawley.

B. PARTICULARES

1. Revalidar un método cromatográfico para determinar Etopósido en micromuestras de sangre total de ratas Sprague-Dawley.
2. Determinar la farmacocinética de Etopósido en ratas después de la administración de Mifepristona.

V. HIPÓTESIS

Los parámetros farmacocinéticos del agente antineoplásico (Etopósido) se modificarán por la previa administración del antiprogéstágeno Mifepristona.

VI. MATERIAL

1. Equipo de disección
2. Tabla de disección
3. Desecador
4. Filtro de nylon marca Sigma-Aldrich con un tamaño de poro de 0.45 μ m.
5. Vasos de precipitado: 500, 100 y 50mL
6. Cubre bocas
7. Guantes
8. Jeringas para insulina
9. Tubos Eppendorf de 2mL
10. Micropipetas: 200, 100, y 10 μ L
11. Matraz Kitasato
12. Embudo de filtración
13. Trampa para vacío
14. Pipetas graduadas: 10 y 5mL
15. Cánula de polietileno calibre PE90 y PE10
16. Gasas
17. Termómetro de -10 a 120°C
18. Baño Maria modelo BMT-8
19. Espátula
20. Aserrín
21. Jaulas de acrílico
22. Bebedero

EQUIPO

1. Bomba de vacío Gast
2. Balanza analítica y granataria
3. Campana de extracción
4. Cromatografo de Líquidos de alta resolución Waters 650-E equipado con:
 - a. Bomba Waters
 - b. Controlador Waters 600s
 - c. Inyector manual RC-II
 - d. Detector Electroquímico marca BAS
 - e. Columna Symmetry C₁₈ 5 μ m (3.9 x 150mm)
5. Desionizador Simplicity 185 de Millipore Corporation
6. Agitador Vortex Thermolyne
7. Potenciometro Corning pH meter 430

8. Hamilton Rheodyne Syringe 250 μ L marca Aldrich

REACTIVOS

1. Éter etílico GR de EM Science
2. Diclorometano para CG de EM Science
3. Ácido acético glacial RA Productos químico Monterrey
4. Ácido nítrico al 1N
5. Metanol EMD grado HPLC
6. 2-acetamidofenol marca Sigma, utilizado como Estándar Interno
7. Heparina marca Sigma
8. Acetato de sodio de Baker GR
9. Nitrógeno gaseoso marca Aga

FÁRMACOS

1. Etopósido sol. Inyectable de 100mg, Lab. Lemery N° de Lote HU074
2. Mifepristona de Laboratorios Sigma-Aldrich

MATERIAL BIOLÓGICO

Ratas hembras Sprague Dawley de 7 - 8 semanas de edad.

VII. METODOLOGÍA

A. PROCEDIMIENTOS INICIALES

1. PREPARACIÓN DE LOS FÁRMACOS

a. Mifepristona. Se preparó una solución stock, a una concentración de 5 mg/mL, fue exactamente pesada y disuelta en la menor cantidad de alcohol absoluto y posteriormente se llevó a volumen final con aceite vegetal, se mantuvo en refrigeración a -20°C hasta su utilización.

b. Etopósido. Para la administración a las ratas, se utilizaron viales de 20 mg/mL, ello permitió la administración directamente de 20 mg/Kg. de peso por vía oral. En tanto para la construcción de las curvas de calibración se preparó una solución stock a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ con agua grado HPLC, a partir de esta solución se prepararon diluciones sucesivas con agua HPLC para obtener concentraciones de 0.025-10 $\mu\text{g/mL}$, estas se mantuvieron en refrigeración a 2°C hasta su utilización.

B. REVALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para este objetivo se siguió el procedimiento realizado por Virto J.⁶⁷ a través de la siguiente técnica de extracción.

A 100 μL de sangre total contenidos en tubos Eppendorf de 2mL se agregó 40 μL de solución estándar Etopósido, de concentración creciente (0.025 $\mu\text{g/mL}$ – 10 $\mu\text{g/mL}$), después se agitó por 1 minuto, se agregó 25 μL de estándar interno (E.I., 2-acetomidofenol) a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, agitando por 1 minuto nuevamente, posteriormente se agregó 1 mL de solución extractora éter etílico: diclorometano (2:1), se centrifugó por 6 minutos a 11,000rpm., se decantó y evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno, finalmente se resuspendió en 100 μL de fase móvil.

C. OBTENCIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA

Con 4 ratas hembras Sprague Dawley se formaron dos grupos: el grupo tratado y el grupo control (n=2). Al primer grupo se le administró por tres días Mifepristona, 10mg/Kg., disuelto en aceite vegetal por vía intraperitoneal. Al segundo grupo se le administró el vehículo (aceite vegetal) por el mismo periodo de tiempo. Posteriormente al cuarto día se realizó una canulación en la arteria caudal, y se administró p.o. (por oral) una dosis única de Etopósido 20mg/Kg., después se tomaron muestras de 100µL de sangre total a los 5, 10, 20,30, 60, 120 y 360 minutos.

D. CONSIDERACIONES GENERALES

1. ADMINISTRACIÓN DE ETOPÓSIDO

El alimento se retiró 12 horas antes de administrar el antineoplásico. Para la administración oral, se utilizó una cánula orogástrica.

2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE ETOPÓSIDO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

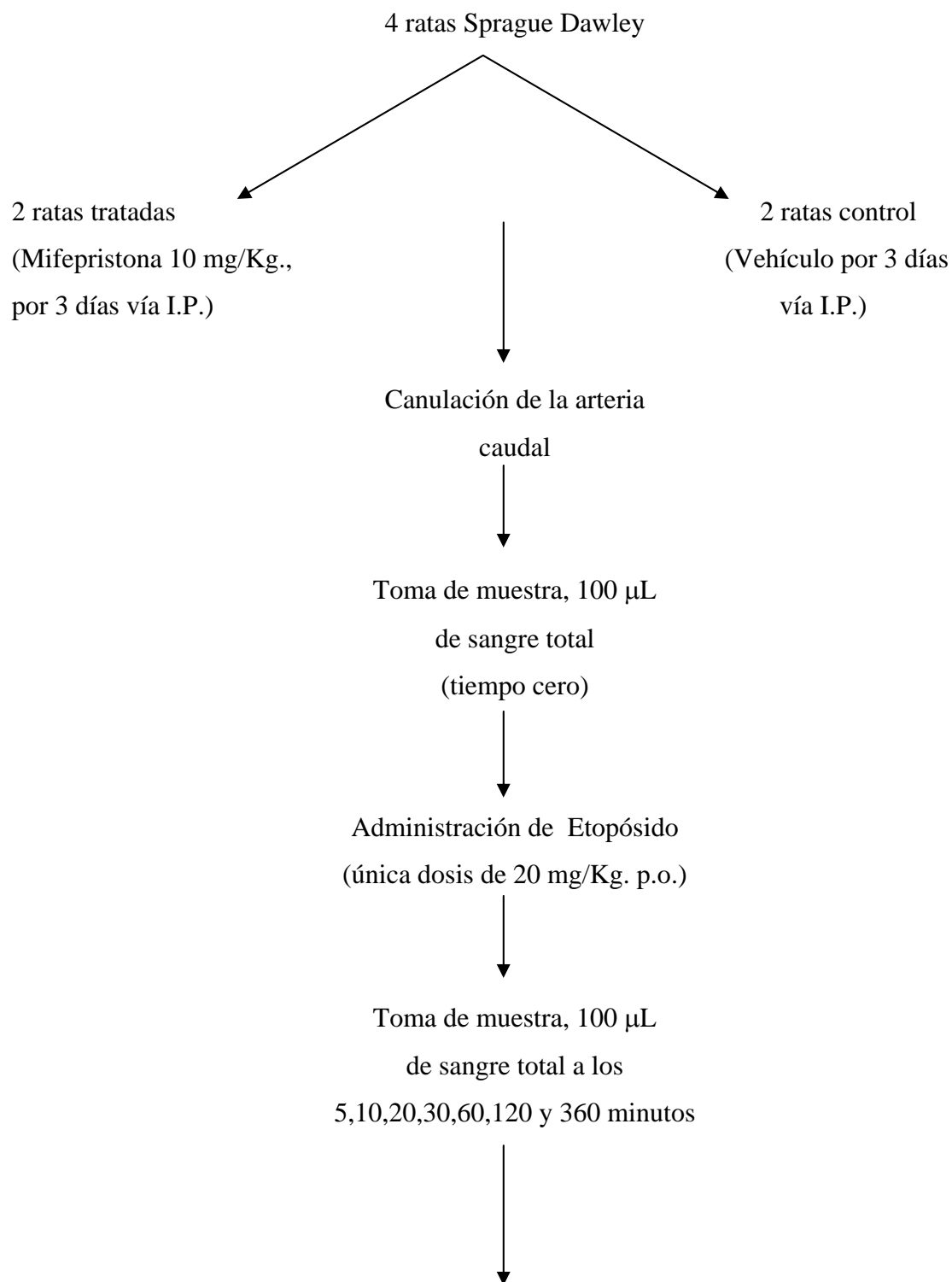
Las inyecciones al cromatógrafo se hicieron manualmente, además la cuantificación se realizó por alturas de pico. A partir de las curvas individuales de concentración sanguínea contra tiempo se determinó la concentración máxima (C_{max}), el tiempo máximo (t_{max}) y el área bajo la curva (ABC_{0-360}). En cuanto al análisis estadístico se calculó la diferencia estadística de los parámetros farmacocinéticos entre el grupo tratado y el grupo control, para ello se utilizó una prueba t-student, una p menor o igual a 0.05 se considera estadísticamente significativa.

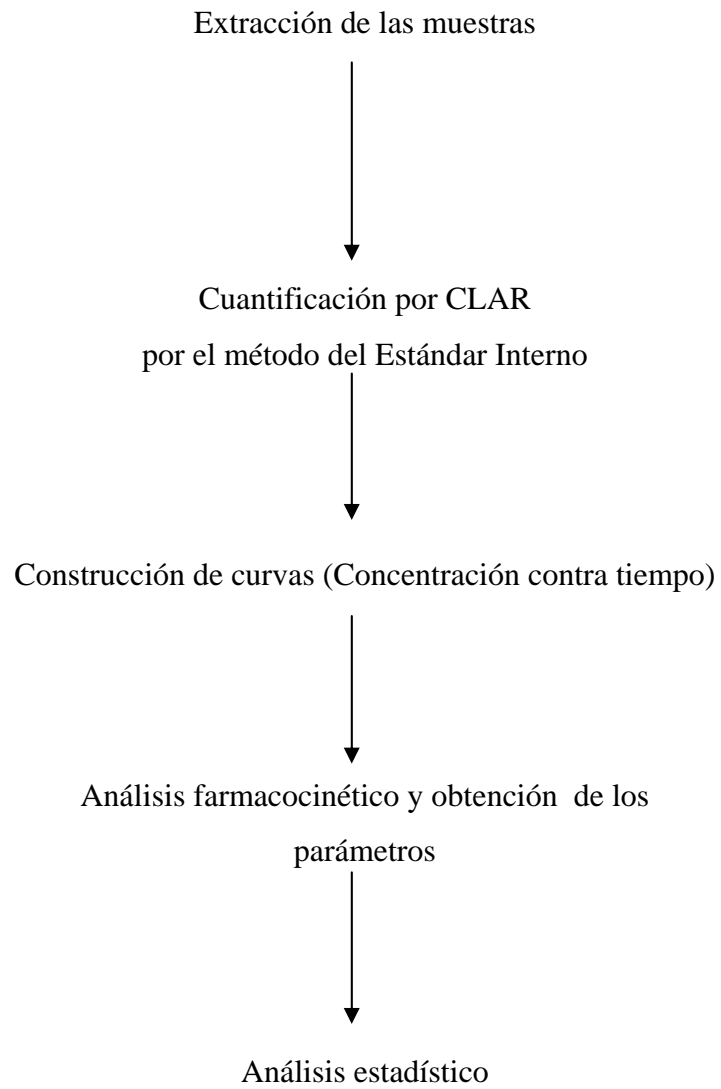
E. DIAGRAMA DE FLUJO

1. REVALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO



2. OBTENCIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA





VIII. RESULTADOS

A. REVALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- a. Fase móvil: Buffer de acetatos pH 3.9 : Metanol, 52:48
- b. Velocidad de flujo: 0.6mL/min
- c. Columna cromatográfica: Columna Symmetry C₁₈ 5µm (3.9 x 150mm)
- d. Temperatura ambiente
- e. Técnica isocrática
- f. Detección electroquímica, 0.8volts

2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Establecidas las condiciones cromatográficas fue posible cuantificar el Etopósido. Se tomaron como referencia las definiciones y criterios de aceptación descritos tanto en la NOM-177-ssa1-1998, ⁽³³⁾ así como los presentados por la FDA Guidance for Industry ⁽⁶⁸⁾, los cuales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios de aceptación para la validación del método analítico.

Parámetros de validación	Criterio de aceptación
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$
	$m \approx 1$
	$b \approx 0$
Precisión del sistema	C.V. < 15%
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$
	$m \approx 1$
	$b \approx 0$
Reproducibilidad	C.V. < 15%

Repetibilidad	C.V. < 15%
Exactitud	85% al 115%
Especificidad	No deben existir interferencia , en la cuantificación de Etopósido y E.I.
Límite de cuantificación	< 15%
Límite de detección	> 20%

Linealidad del sistema.

Se inyectaron al cromatógrafo muestras de Etopósido con E.I. y fase móvil bajo las condiciones establecidas. Al obtener los cromatogramas el tiempo de retención fue de 7.25 y 2.25 minutos respectivamente (Figura 6).

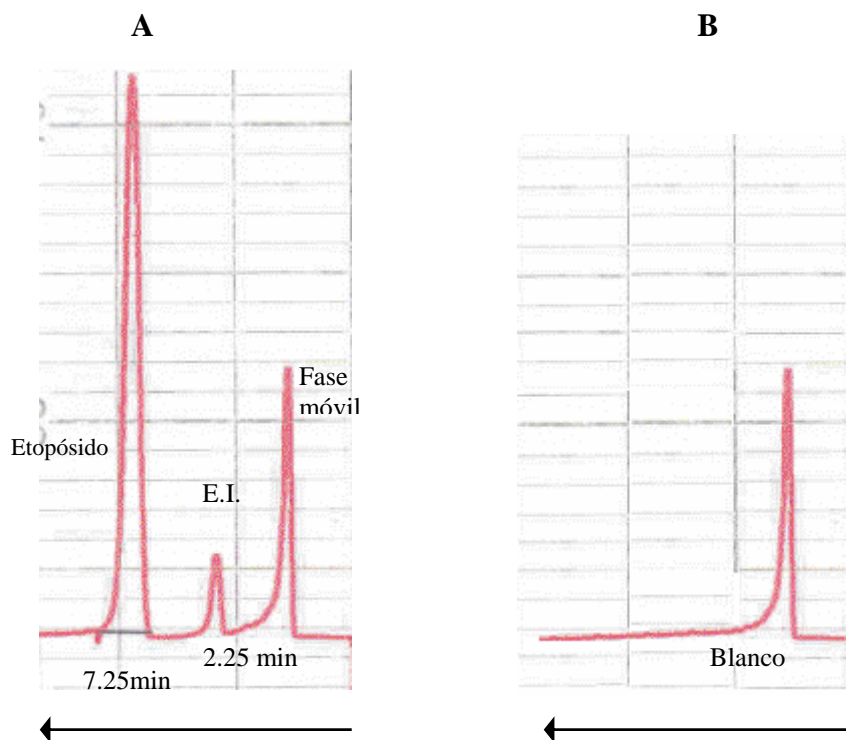


Figura 6. En A se muestra un cromatograma típico al inyectar una muestra de E.I y Etopósido. En B un cromatograma al inyectar solo fase móvil.

Para obtener la linealidad del sistema se construyeron curvas de calibración de concentración creciente de Etopósido (0.025 a 10 μ g/mL), las cuales se repitieron por sextuplicado (Figura 7).

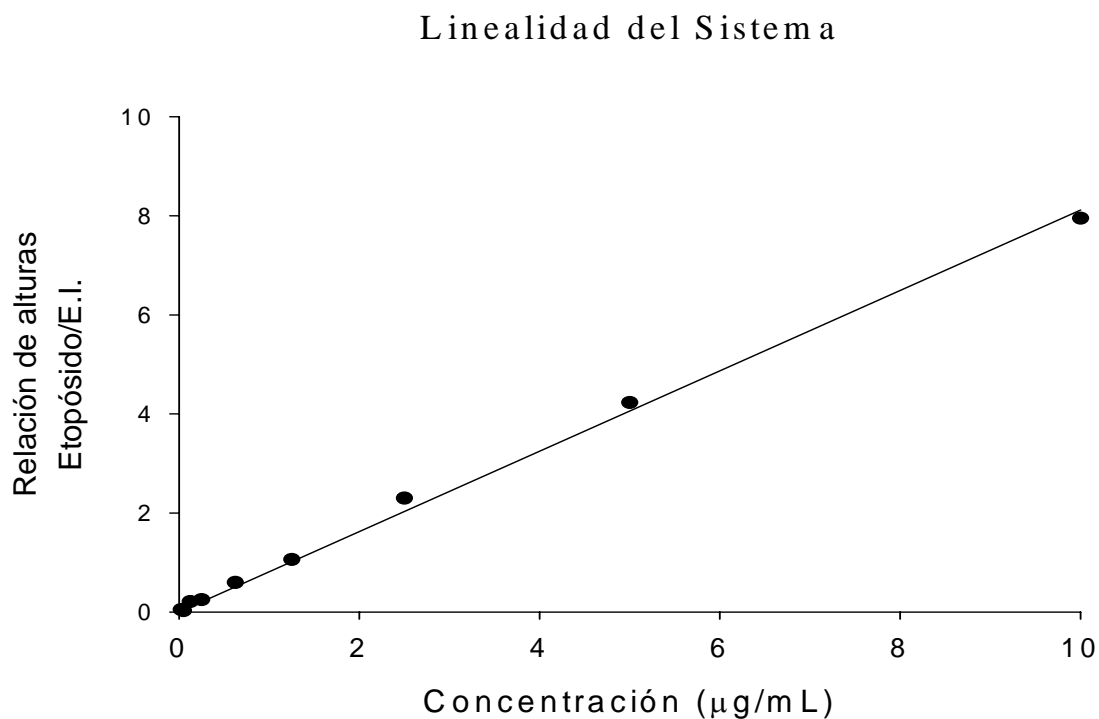


Figura 7. Curva de calibración para el sistema, en la cual se grafica relación de altura de Etopósido/E.I. contra concentración de Etopósido, cada punto representa el promedio de seis determinaciones.

Al obtener el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) experimental y teórico están dentro de los criterios de aceptación establecidos por la Norma Oficial Mexicana (Tabla 3).

Parámetros r^2 , m y b experimental y teóricos.

Parámetro	Teórico	Experimental
r^2	≥ 0.98	0.9982
m	≈ 1	0.7978
b	≈ 0	0.0938

Tabla 3. Coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m) y ordenada al origen (b) obtenidas a partir de las curvas de calibración para el sistema.

Precisión del sistema

Se efectuaron seis determinaciones independientes, a muestras en solución que contenían Etopósido en concentraciones crecientes (0.025 – 10 μ g/mL) y se determinó el coeficiente de variación (C.V.) para cada uno de los niveles de concentración, estos resultados indican que el % de variación para cada una de los niveles de concentración esta dentro de los parámetros de aceptación (Tabla 4).

Coeficiente de variación para cada nivel de concentración

Concentración (mg/mL)	C.V. (%)
10.0	10.90
5.0	9.50
2.5	6.14
1.25	5.41
0.625	6.25
0.250	5.71
0.125	6.73
0.05	8.69
0.25	0

Tabla 4. Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración obtenidos al dividir la desviación estándar entre el promedio de cada uno de los niveles de concentración, n=6.

Linealidad del método

Se obtuvo al preparar cuatro curvas de concentración conocidas de Etopósido en plasma, con la técnica de extracción mencionada anteriormente, se graficó la relación de altura Etopósido/E.I. contra concentración de Etopósido buscando que la respuesta sea lineal, indicando que la concentración de Etopósido aumenta conforme a la relación de alturas (Figura 8).

Linealidad del método

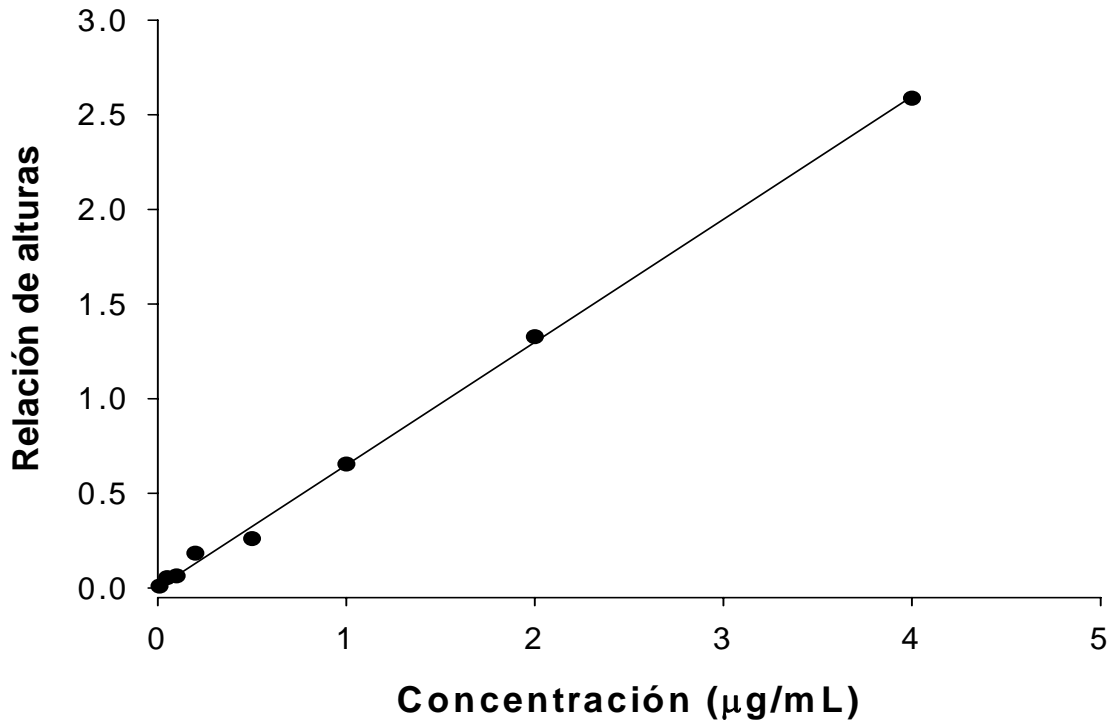


Figura 8. Curva que representa la linealidad del método obtenida a partir de la cuantificación de Etopósido en muestras sanguíneas, se gráfico relación de altura Etopósido/E.I. contra concentración de Etopósido con una $n=4$.

Al determinar matemáticamente la pendiente, el coeficiente de variación y la ordenada al origen se determinó que están dentro de los parámetros de aceptación (Tabla 5).

Parámetros r^2 , m y b experimental y teóricos.

Parámetro	Teórico	Experimental
r^2	≥ 0.98	0.9989
m	≈ 1	0.6484
b	≈ 0	0.0009

Tabla 5. Coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m) y ordenada al origen (b) obtenidas a partir de las curvas de calibración para el método.

Precisión del método

Reproducibilidad

Los datos se recabaron al determinar la variabilidad en diferentes días, se analizaron curvas que contenían Etopósido en concentración de 0.05-4 μ g/mL en plasma, realizando el análisis por duplicado en dos días diferentes posteriormente se determinó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración. Encontrando que la variabilidad para cada concentración cae dentro del parámetro de aceptación dictado por la correspondiente Norma Oficial Mexicana (Tabla 6).

Coeficiente de variación para cada nivel de concentración

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	C.V. %
4	10.45
2	11.48
1	13.79
0.5	10.10
0.25	8.36
0.1	11.17
0.05	10.87

Tabla 6. Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración obtenidos al dividir la desviación estándar entre el promedio de cada uno de los niveles de concentración, n=6.

Repetibilidad

Se obtuvo al preparar y analizar en el mismo día dos curvas de Concentración creciente de Etopósido en sangre para cada uno de ellas se determinó el C.V. el cual indico ser aceptable (Tabla 7).

Coeficiente de variación para cada nivel de concentración

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	C.V. (%)
4	2.35
2	12.09
1	8.32
0.5	1.99
0.25	11.08
0.1	11.03
0.05	14.34

Tabla 7. Coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración obtenidos al dividir la desviación estándar entre el promedio de cada uno de los niveles de concentración, n=6.

Exactitud

Se realizó la determinación de siete concentraciones de Etopósido, las cuales se tomaron como el 100% y a partir de la curva de concentración contra relación de alturas (Etopósido/E.I.), se determinaron las concentraciones reales, de cada determinación independiente y entonces determinar el porcentaje de exactitud, el cual indica ser aceptables (Tabla 8).

Porciento de exactitud.

Concentración (mg/mL)	Exactitud (%)
4	99.5
2	102
1	100
0.5	100.8
0.25	112.8
0.1	96
0.05	92

Tabla 8. Porciento de exactitud para cada uno de los niveles de concentración con una n=6.

Límite de Detección

Esta concentración se determinó, al obtener aquella concentración mínima que puede ser detectable por el cromatograma pero ya no cae dentro de los parámetros de precisión y exactitud aceptables, la cual fue de 0.01µg/mL

Límite de Cuantificación

Esté parámetro se determinó al obtener la concentración mas baja que cumpla con los parámetros de precisión y exactitud aceptables, la cual fue de 0.05 µg/mL

Especificidad

Se inyectaron muestras que contenían Etopósido y E.I. en plasma, y plasma libre de fármacos, comparando los cromatogramas obtenidos en cada caso no se detectó ninguna

otra señal. Se obtuvo un tiempo de retención para el estándar interno de 2.25 minutos y para Etopósido de 7.25 minutos (Figura 9).

Cromatograma de una muestra sanguínea de Etopósido

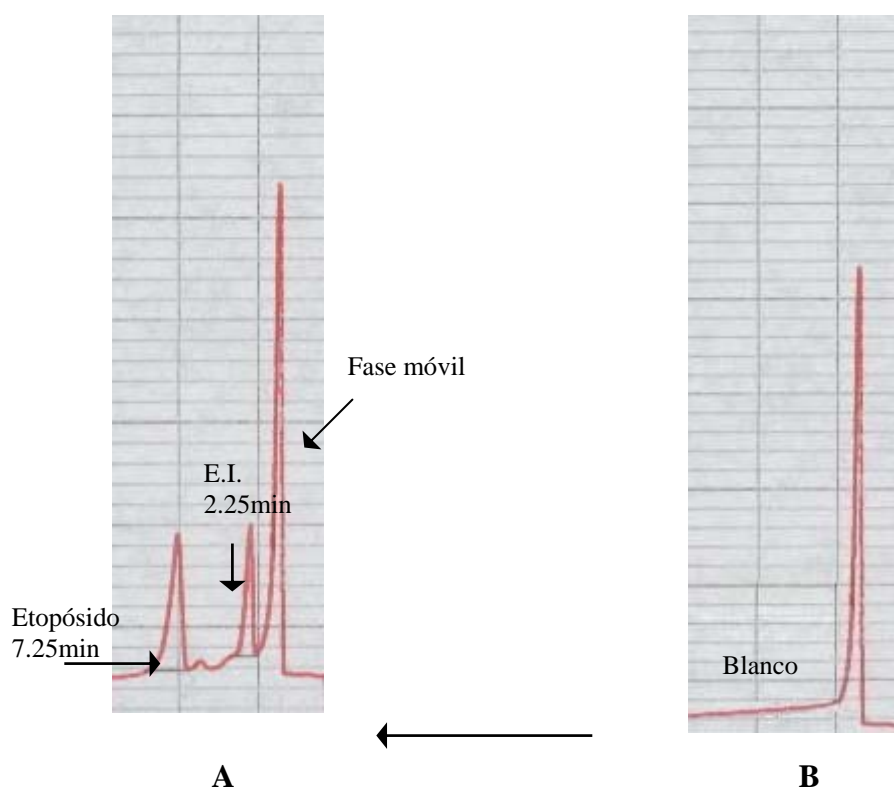


Figura 9. Cromatogramas obtenidos al inyectar una muestra de plasma con Etopósido y estándar interno (A), y sin fármaco ni E.I. (B).

En cualquiera de las dos figuras, el primer pico es el de la fase móvil, seguido por el de E.I. y finalmente el de Etopósido, cuando se comparan con la Figura 9B, en donde la muestra no contiene fármacos, solo está el pico correspondiente a la fase móvil, no se detectaron picos que interfieran con la lectura de Etopósido en plasma apreciándose que el método analítico es específico para la cuantificación de las sustancias de interés.

B. DETERMINACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE ETOPÓSIDO EN RATAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE MIFEPRISTONA.

Con el objetivo de determinar las concentraciones plasmáticas de Etopósido con la previa administración de Mifepristona, se trataron ratas Sprague Dawley por tres días y al cuarto se realizó la farmacocinética de Etopósido, se recolectaron, extrajeron y analizaron las muestras sanguíneas, con los datos obtenidos se construyó una curva farmacocinética, cada punto de la gráfica es el promedio de dos animales (Figura 10). Mientras que de las concentraciones y tiempos individuales, se calcularon los parámetros farmacocinéticos de este análisis, como son ABC (área bajo la curva) la cual se calculó a partir del tiempo cero al trescientos sesenta, por medio del programa WinNonlin profesión, para el grupo tratado fue 0.5508 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$. cifra que es mayor en comparación con el grupo control, indicando que la cantidad biodisponible es mayor en este grupo, el otro parámetro es la $C_{\text{máx}}$ (concentración máxima) que es la concentración máxima alcanzada en circulación e indica si se obtuvo o no efecto terapéutico, en el grupo tratado fue 0.0981 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en el grupo control fue 0.11975 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y finalmente, $t_{\text{máx}}$ (tiempo máximo) que es el tiempo para alcanzar la máxima concentración, para el grupo tratado fue mayor 40 minutos y 25 minutos en el grupo control (Tabla 9).

Farmacocinética de Etopósido después de la administración de Mifepristona

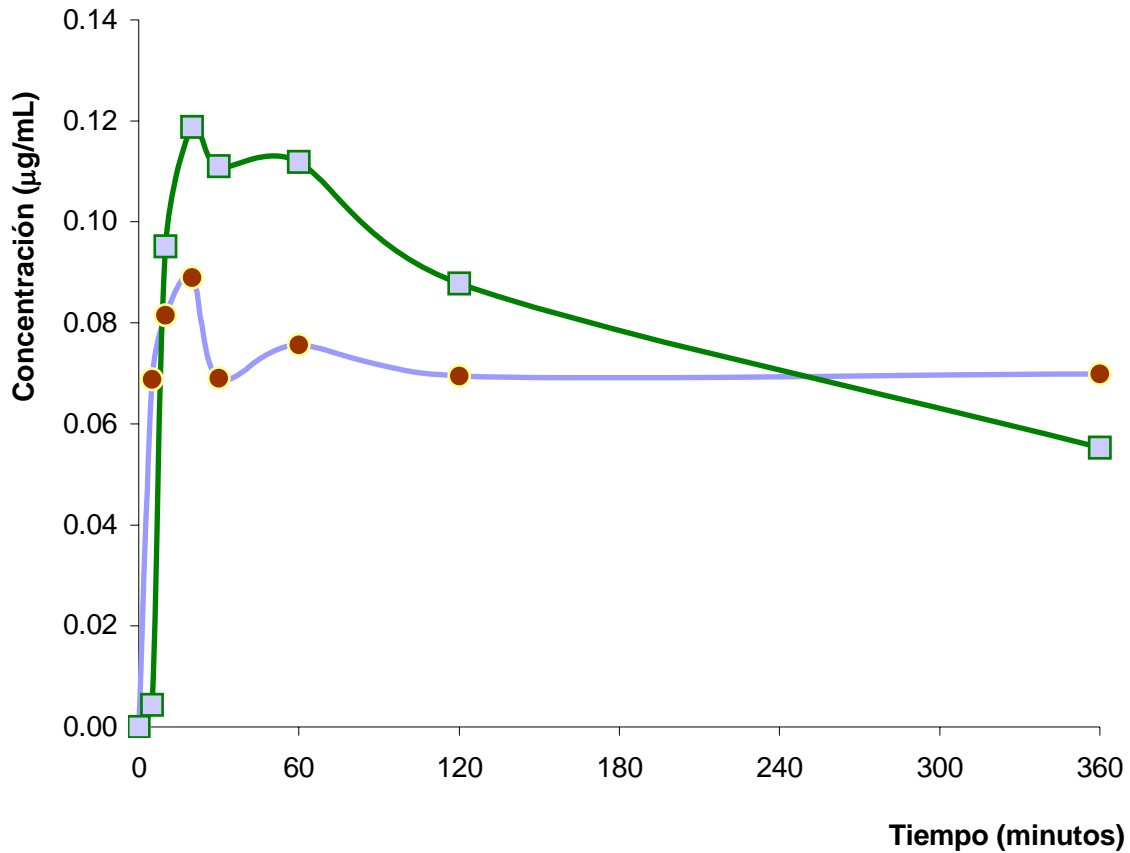


Figura 10. Efecto comparativo en la administración p.o. de 20 mg/Kg de Etopósido (grupo control ■) y la administración previa de 10 mg/Kg. vía i.p. de Mifepristona (●) en ratas Sprague Dawley. Cada punto representa el promedio de dos animales.

Parámetros farmacocinéticos de Etopósido con la previa administración de Mifepristona en ratas Sprague Dawley

Parámetro	Grupo control	Grupo tratado
C _{máx} (µg/mL)	0.11975 ± 0.00075	0.0981 ± 0.0431
ABC (µg.min./mL)	0.25765 ± 0.09695	0.5508 ± 0.1039
t _{máx} (minutos)	25 ± 5	40 ± 20

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de Etopósido en ratas sometidas a un tratamiento previo con Mifepristona por tres días, y ratas control. (n=2 ± e.e.)

* No existe diferencia estadísticamente significativa, con un $\alpha = 0.05$

IX. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Gracias a las investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, se evalúan nuevas combinaciones farmacológicas que ayuden a aumentar el efecto citotóxico de los antineoplásicos sin aumentar sus efectos tóxicos. Fármacos como Mifepristona, clasificado como un antiprogéstágeno ha mostrado tener efectos antiproliferativos en varios tipos de cáncer. Actualmente en el laboratorio se está estudiando su efecto antiproliferativo al combinarse con un antineoplásico como Etopósido en células de Cáncer de Mama (MCF-7) con la finalidad de incrementar el efecto citotóxico de manera sinérgica.

A. REVALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

Para evaluar el comportamiento sistémico de Etopósido en las micromuestras sanguíneas fue importante obtener la revalidación del método analítico con la finalidad de que los resultados obtenidos sean confiables y reproducibles. Al inyectar al sistema cromatográfico una muestra de Etopósido y E.I. en solución acuosa, el tiempo de retención observado fue de 7.25 y 2.25 minutos respectivamente, no observando ningún otro pico que pudiera interferir. Cuando se inyectó un extracto sanguíneo se observaron los picos correspondientes de Etopósido y E.I. con respecto al extracto libre de fármacos, no se observó ningún pico que interfiriera con los tiempos de retención de cada uno de los fármacos, lo cual demostró la especificidad del método analítico.

Al evaluar la linealidad del método en el rango de concentración 0.05µg/mL– 4µg/mL este fue lineal, los parámetros de r^2 , m y b obtenidos se encuentran dentro de la especificación, establecida por la Norma Oficial de la Secretaria de Salud, NOM 177. La precisión del método se evaluó por el grado de reproducibilidad y repetibilidad (Tablas 6 y 7). La reproducibilidad se determinó al calcular el C.V. para cada nivel de concentración en dos diferentes días de análisis, encontrándose que para cada nivel el C.V. fue menor a 15%, por lo que la variabilidad en diferentes días esta dentro de los parámetros establecidos por la Norma Oficial Mexicana. La repetibilidad, igualmente se evaluó con el C.V. de dos curvas realizadas en el mismo día siendo este valor <15%.

Al determinar la cantidad de Etopósido (expresado en porcentaje) recuperado en las muestras. Se obtuvo un % de recobro para cada nivel de concentración entre el 92-112% lo que refleja una exactitud aceptable de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana. Finalmente el Limite de Detección y de Cuantificación fue de 0.01µg/mL y 0.05µg/mL respectivamente, este último valor presentó una precisión y exactitud con un coeficiente de variación de 23.8% y 12.60% respectivamente.

En resumen, los resultados obtenidos de la revalidación del método se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Norma Oficial de la Secretaria de Salud (NOM 177) y por la FDA (Guía de validación), siendo este método confiable para cuantificar Etopósido en micromuestras de sangre total.

B. DETERMINACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE ETOPÓSIDO EN RATAS SPRAGUE DAWLEY DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE MIFEPRISTONA

En la quimioterapia del cáncer, las interacciones fármaco-fármaco pueden llevarse a cabo tanto a nivel farmacodinámico (cuando la interacción esta involucrada con el mecanismo de acción) y a nivel farmacocinético (cuando la interacción esta involucrando procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, ADME). El presente trabajo esta relacionado precisamente con la interacción fármaco-fármaco a nivel farmacocinético involucrando alguno de los procesos de ADME, teniendo como antecedente que a nivel *in vitro* se presenta una interacción fármaco-fármaco de tipo farmacodinámico, ya que la previa sensibilización con Mifepristona en células de Cáncer de Mama (MCF-7) ejerce un efecto sinérgico con Etopósido, al comparar la curva de sobrevivida del grupo control y tratado, en este último el número de células muertas es mayor y su CI_{50} (Concentración inhibitoria 50, definida como la concentración que inhibe el 50% de la población total) es menor para este grupo. Payen L. *et al*⁷, demostraron que en células de Cáncer de Pulmón (GLC4/Sb30), Mifepristona aumenta los niveles de Vincristina (antineoplásico de primera línea para el tratamiento del cáncer de pulmón) modulando a la baja los mecanismos de resistencia a múltiples fármacos asociados a proteína (MRP), permitiendo así que el agente

antineoplásico tenga un mayor efecto terapéutico. Con lo anterior se demuestra que la combinación de Mifepristona y un antineoplásico como Vincristina o Etopósido presenta una interacción de tipo farmacodinámico desconociéndose a la fecha una posible interacción a nivel farmacocinético.

En este trabajo, los resultados indican que las concentraciones sanguíneas del grupo tratado previamente con Mifepristona disminuyen con respecto al grupo control en las primeras 3 horas. Sin embargo, estas concentraciones aumentan en el grupo tratado con respecto al grupo control en las últimas 2 horas de muestreo, (Figura 10). Mientras que al obtener los parámetros farmacocinéticos como son $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-360} y $t_{m\acute{a}x}$, en el grupo tratado hubo una disminución de $C_{m\acute{a}x}$ y un aumento del ABC, (Tabla 9) debido a que hay una interacción a nivel de eliminación; estudios previos han demostrado que existe interacción farmacológica entre Mifepristona y Digoxina a nivel de eliminación, evitando la secreción renal del glucósido que da como consecuencia el aumento de la concentración sistémica del glucósido⁶⁹. Otra demostración son los estudios realizados por Da-Qiang *et al.*⁷⁰, al exponer células de cáncer gástrico (SGC7901) resistentes a Vincristina con Mifepristona, hay una mayor sensibilidad y por tanto una mayor muerte de células cancerosas, debido a que esta última puede estar modulando la expresión de genes reguladores de la apoptosis Bcl-2 y Bax. Por otro lado He K. *et al.*⁷¹ indican que la coadministración de Mifepristona con un agente anticanceroso con una buena biodisponibilidad, como es el caso de Tamoxifen, Vinblastina, Vincristina o Taxol, permite llevar a cabo el mecanismo basado en la inactivación de CYP3A4 vía modificación irreversible de la aprotéina. Este mecanismo consiste en la oxidación del triple enlace carbono-carbono de Mifepristona por CYP's en el cual se forma un intermediario que puede modificar irreversiblemente el sitio crítico (enzima-substrato) y así inactivar la enzima y como consecuencia al inactivar el metabolismo del antineoplásico se prolongan las concentraciones circulantes, lo que ayudaría a obtener un mayor efecto terapéutico, sin embargo no se puede descartar que la eliminación este alterada y por lo tanto se este observando este aumento del ABC.

La disminución de la Cmax puede ser explicado por los siguientes puntos, la absorción de ciertos fármacos es muy restringida por la presencia de la glicoproteína Pgp que se encuentra en la membrana del intestino delgado, tanto del lado baso-lateral y apical de la célula epitelial, la cual constituye los vasos capilares por donde pasa a circulación sistémica el fármaco⁷². Normalmente esta glicoproteína se encuentra en la membrana y actúa como una bomba expulsora de fármaco o agentes xenobioticos fuera de la célula, con ello, expulsa hacia el lumen intestinal al fármaco impidiendo que pase a circulación sistémica, además en células tumorales se encuentra sobreexpresada^{73,74}. Se sabe que Etopósido se metaboliza por CYP3A4, isoforma que no solo se encuentra en el hígado, sino también en el intestino, lo que permite que exista un metabolismo de fase I a nivel intestinal y por tanto se inactive el fármaco⁷⁵. La concentración alcanzada por el grupo tratado posiblemente no sea suficiente para alcanzar niveles terapéuticos.

Otro mecanismo de resistencia que provoca que la concentración absorbida disminuya, es MRP (resistencia a múltiples fármacos asociados a proteína) una bomba expulsora a nivel membranal, la cual modulan el transporte de muchos fármacos y otros compuestos; se han descubierto nueve tipos de subfamilias, cada una transporta un grupo específico de fármacos, las cuales están presentes en todo el tejido humano e igualmente están localizadas en la parte baso lateral de células epiteliales dentro del cuerpo⁷⁶. Los resultados se analizaron utilizando un análisis estadístico de Mann-Whitney, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por el tamaño reducido de muestra.

En suma, Mifepristona demuestra no solo tener aplicaciones ginecológicas, sino también en la terapia del cáncer, a través de varios mecanismos como son: modulación de las proteínas apoptóticas, mecanismos de inactivación metabólica de CYP's y como antagonista de los receptores a progesterona. Nuestros resultados muestran una alteración de la farmacocinética de Etopósido por influencia de Mifepristona, se propone que en futuras investigaciones se amplíe el número de animales de experimentación.

X. CONCLUSIONES

1.- La revalidación del método analítico para cuantificar Etopósido en micromuestras de sangre total demostró ser rápido, sensible, lineal, reproducible y exacto en el rango de concentración 0.05 μ g/mL a 4 μ g/mL.

2.- La previa administración de Mifepristona si modifica la farmacocinética de Etopósido a través de una interacción a nivel de eliminación, reflejado por el incremento en el ABC del grupo tratado con respecto al grupo control.

XI. REFERENCIAS

1. Flórez J, Armijo JA. Quimioterapia antineoplásica I Bases fundamentales antimetabolitos, En: Flórez J. Farmacología humana, 2ª.ed. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas; 1992
2. Eltreby M, Liang Y, *et al.* Additive effect of Mifepristone and Tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:149-168
3. Rocereto F, Saul M, *et al.* Phase II study of Mifepristone (RU486) in refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 429-432
4. Eltreby M, Liang Y, Lewis R. Induction of apoptosis by Mifepristone and Tamoxifen in human LNCaP prostate cancer cells in culture. *Prostate* 2000;43:31-42
5. Koide S. Mifepristone, auxiliary therapeutic use in cancer and related disorders. *J Reprod Med* 1998;43:551-560
6. Malcomson R, Oren M, *et al.* p53-independent death and p53-induced protection against apoptosis in fibroblasts treated with chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer* 1995; 75: 952-957
7. Payen L, Delugin L, *et al.* Reversal of MRP-mediated multidrug resistance in human lung cancer cells by the antiprogesterone drug RU486. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;258(3): 513-518
8. Wang G, Shang H, *et al.* Effects of Mifepristone on the proliferation, apoptosis and cis-diamminedichloroplatinum sensitivity of cultured chemoresistant human ovarian cancer cells. *J Chin Med* 2005;118(4): 333-336
9. Álvarez A. Efecto del antiprogéstágeno Mifepristona sobre la citotoxicidad de Cisplatino en células HeLa. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. México D.F. FEZ-Zaragoza, UNAM 2003
10. López A. Actividad antitumoral de la combinación de Cisplatino y Mifepristona en tumores de cérvix, desarrollados en ratones atímicos. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. México D.F. FES-Zaragoza, UNAM 2004
11. Peckham M, Barrett A, *et al.* The treatment of metastatic germ-cell testicular tumours with Bleomycin, Etoposide and Cisplatin. *Br J Cancer* 1983;47: 613-619

12. Gershenson D, Morris M, *et al.* Treatment of malignant germ cell tumors of the ovary with Bleomycin, Etoposide and Cisplatin. *J Clin Oncol* 1990;8: 715-720
13. Nissen N, Larsen V, *et al.* Phase I clinical trial of a new antitumor agent, 4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(-4,6,*O*-ethylidene- β -D-glucoopyranoside) (VP-16-213). *Cancer Chemother Rep* 1972;56:769-777
14. Jaramillo J. Historia, En: Jaramillo J. El cáncer fundamentos de oncología. Tomo 1. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 1991
15. González M, Castro J. Concepto de oncología medica, En: González M, Ordonez A, *et al.* Oncología clínica fundamentos y patología general. 2ª.ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1998
16. Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud Mexicana. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México. Compendio mortalidad y morbilidad; 1998
17. Meyers F, Jawetz E, Goldfin A. Farmacología clínica. 7ª.ed. México: El manual moderno,1982:466-469
18. Casado E, Feliu J, Rodríguez JM. Prevención primaria e inhibidores de la proliferación tumoral, En: Gonzales M, Ordonez A, *et al.* Oncología clínica. 2ª. ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1998
19. Cuevas J, Santos J. Oncología básica. Madrid: Vector editores,1985:192,193
20. Falconer M, Shendan E, *et al.* Farmacología y terapéutica. 6ª.ed. México: Interamericana, 1981
21. Smith C, Reynord A. Farmacología. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1993:888
22. Katzung B. Farmacología básica y clínica. 4ª. ed. México: El manual moderno, 1991:1
23. Gilman A, Rall T, Nies A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª.ed. México: Panamericana,1991
24. Velasco A, Barrio L, *et al.* Farmacología fundamental. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 2003
25. Bowman W, Rand M. Farmacología bases bioquímicas y patológicas aplicaciones clínicas.2ª. ed. México: Interamericana;1985
26. Goth A. Farmacología médica principios y conceptos. Barcelona: Editores Doyma, 1984:1,7-9

27. Levine R, Clark B. Farmacología acciones y reacciones medicamentosas. España: Salvat Editores; 1982:283
28. Bevan J, Thompson J, *et al.* Fundamentos de farmacología, introducción a los principios de acción de los fármacos. 2ª. ed. México: Editorial Harla; 1982:36-41
29. Skoog D, West D, Holler F. Química analítica. 6ª.ed. México: McGraw-Hill-Interamericana; 1995
30. Willard H, Merritt L, *et al.* Métodos instrumentales de análisis. México: Grupo Editorial Iberoamérica; 1991
31. Valcárcel M, Gómez A. Técnicas analíticas de separación. España: Reverte; 1988: 459-461
32. Yost R, Ettre L, Conlon R. Practical liquid chromatography an introduction. E.U.A. Perkin-Elmer;1980
33. Secretaria de Salud (SSA) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
34. Henwood J, Brogden R. Etoposide a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in combination chemotherapy of cancer. *Drugs* 1990;39 (3):438-490
35. Yang XH, Sladek TL, *et al.* Reconstitution of Caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to Doxorubicin and Etoposide induced apoptosis. *Cancer Res* 2001;61(1):348-354
36. Maanen J, Ruiter C, *et al.* The role of metabolic activation by cytochrome P-450 in covalent binding of VP 16-213 to rat liver and HeLa cell microsomal proteins. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21(9):1099-1106
37. Moorsel C, Pinedo H, *et al.* Combination chemotherapy studies with Gemcitabine and Etoposide in non-small cell lung and ovarian cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology* 1999;57:407-415
38. Slevin M. The clinical pharmacology of Etoposide. *Cancer* 1991;67:319-329
39. Johnson D, Hainsworth J, *et al.* Current status of Etoposide in the management of small cell lung cancer. *Cancer* 1991;67:231-244

40. Radice P, Bunn P, Ihde D. Therapeutic trials with VP-16-213 and VM-26: active agents in small cell lung cancer, non-Hodgkin's lymphomas and other malignancies. *Cancer Treat Rep* 1979;63:1231-1239
41. Muggia F, Russell C. New chemotherapies for ovarian cancer. *Cancer* 1991;67:225-230
42. Bloomfield C, Jorgensen J *et al.* VP-16-213 in combination with Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1980;64(10-11):1135-1137
43. Smales E, Peckham M. Chemotherapy of germ-cell ovarian tumours: first-line treatment with Etoposide, Bleomycin and Cisplatin or Carboplatin. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23(5):469-479
44. Williams S, Blessing J, *et al.* Chemotherapy of advanced dysgerminoma: trials of the gynecologic oncology group. *J Clin Oncol* 1991;9(11):1950-1955
45. Patterson H, Norman A *et al.* Combination Carboplatin and radiotherapy in the management of stage II testicular seminoma: comparison with radiotherapy treatment alone. *Radiotherapy and Oncology* 2001;59:5-11
46. Singh S, Parulekar W, *et al.* Influence of sex on toxicity and treatment outcome in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(4):850-855
47. Ardizzoni A, Favaretto A, *et al.* Platinum-Etoposide chemotherapy in elderly patients with small-cell lung cancer: results of a randomized multicenter phase II study assessing attenuated-dose or full-dose with lenograstim prophylaxis a forza operativa nazionale italiana carcinoma polmonare and grupo studio tumori Palmonari Venoto (FONICAP-G STPV) study. *J Clin Oncol* 2005;23 (3):569-574
48. Rosenstein E. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. México: Ediciones PLM, 1998:1175
49. Hande K, Anthony L, *et al.* Identification of Etoposide glucuronide as a mayor metabolite of Etoposide in the rat and rabbit. *Cancer Res* 1988;48:1829-1834
50. Relling M, Evans R *et al.* Human cytochrome P450 metabolism of Teniposide and Etoposide. *J Pharmacology Exp Thera* 1992;261(2):491-496
51. Hande K. Etoposide four decades of developmen of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998;34(10):1514-1521
52. Bertagna X, Bertagna C, *et al.* The new steroide analog RU486 inhibits glucocorticoid action in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:25-28

53. Da-Qiang, Zhi-Biao *et al.* Effects of Mifepristone on proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 *in vitro*. *World J Gastroenterology* 2004;10(18):2628-2631
54. Da-Qiang, Zhi-Biao *et al.* Effects of Mifepristone on invasive and metastatic potential of human gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterology* 2004;10(12):1726-1729
55. Bardon S, Vignon F, *et al.* RU486 a progestin and glucocorticoid antagonist inhibits the growth of breast cancer cell via the progesterone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60(4):692-697
56. Gruol DJ, Zee MC, *et al.* Reversal of multidrug resistance by RU486. *Cancer Res* 1994;54(12):3088-3091
57. Spitz I, Van Look P, Coelingh B. The use of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in contraception. *Steroids* 2000;65:817-823
58. Ledger W, Sweeting V, *et al.* Inhibition of ovulation by low dose Mifepristone (RU486). *Hum Reprod* 1992;7:945-950
59. Brown A, Cheng L *et al.* Daily low-dose Mifepristone has contraceptive potential by suppressing ovulation and menstruation: a double-blind randomized control trial of 2 and 5mg per day for 120 days. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;87(1):63-70
60. Coyaji K, Elul B, *et al.* Mifepristone abortion outside the urban research hospital setting in India. *Res Letters* 2001;357(9249):120-122
61. Chu J, Matthias D, *et al.* Successful long-term treatment of refractory Cushing's disease with high-dose Mifepristone (RU486). *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(8): 3568-3573
62. Pomara N, Doraiswamy M, *et al.* Mifepristone (RU486) for Alzheimer's disease. *Neurology* 2002;58(9):1436-1437
63. Behl C, Trapp T *et al.* Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death—a novel role for RU486. *Eur J Neuroscience* 1997;9:912-920
64. Murphy A, Kettel L *et al.* Endometrial effects of long-term low-dose administration of RU486. *Fertil Steril* 1995;63:761-766
65. Kawai S, Nieman L *et al.* Pharmacokinetic properties of the antiglucocorticoid and antiprogestin steroid RU486 in man. *J Pharmacology Exp Ther* 1987; 241(2): 401-406

66. The Medical Letter Inc. Mifepristone (RU486). The medical letter on drugs and therapeutics 2000;42(1091):101-102
67. Virto J. Influencia del 17-Beta estradiol sobre la farmacocinética de Etopósido en ratas Sprague Dawley. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. México D.F. FES Zaragoza, UNAM 2003
68. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validations, 1998
69. Woodland C, Koren G, Ito S. From bench to bedside: utilization of an *in vitro* model to predict potential drug-drug interactions in the kidney: the Digoxin-Mifepristone example. J Clin Pharmacol 2003;43(7):743-750
70. Da-Quiang L, Zhi-Biao W, *et al.* Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogesterone drug Mifepristone. World J Gastroenterology 2004;10(2):1722-1725
71. He K, Woolf T, Hollenberg P. Mechanism-based inactivation of cytochrome P-450-3A4 by Mifepristone (RU486). J Pharmacology Exp Thera 1999;288(2):791-797
72. Dale K. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. J Clin Pharmacol 1999;39:1203-1211
73. García C. Sistema enzimático citocromo P-450 en la farmacocinética de los antidepresivos de nueva generación y su relación con la interacción medicamentosa. J Neurologi Neuroc Psiqui 2001;1994:29-34
74. Leu BL, Huang Jd. Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on Etoposide absorption. Cancer Chemother Pharmacol 1995;35:432-346
75. Hochman J, Chiba M, *et al.* Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of Indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. J Pharmacology Exp Thera 2000; 292(1):310-318
76. Kruijtz C, Beijnen J, *et al.* Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. The Oncologist 2002;7:516-530