



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO ANALITICO POR CLAR PARA LA
CUANTIFICACION DEL GRADO DE UNION A PROTEINAS PLASMATICAS DE
LA CASIOPEINA IIGLY, UN NUEVO ANTICANCERÍGENO”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. EXP. MIRNA OLIVIA GARCÍA ROJAS



TUTOR: DRA. INÉS FUENTES NORIEGA.
AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Héctor Salvador Sumano López
Vocal:	Dr. Gilberto Castañeda Hernández
Secretario:	Dra. Adela Rodríguez Romero
Primer Suplente:	Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents
Segundo Suplente:	Dr. Enrique García Hernández

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
LABORATORIO 112 y 113, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.**

**FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

EL TRABAJO SE PRESENTO EN:

La 4ª Jornada de Trabajo en Casiopeinas, 4, 5 Diciembre 2000
En el XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, 21-25 Octubre 2001
En el 1er Congreso de Casiopeínas. 5ª Jornada de Trabajo en Casiopeínas, 1-3 Diciembre 2002
II Congreso Nacional de Química Médica, 4-8 Septiembre 2006

SUSTENTANTE: BIOL. EXP. MIRNA OLIVIA GARCIA ROJAS

ASESOR DEL TEMA: DRA. INÉS FUENTES NORIEGA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado a través de los proyectos:

Facultad de Química

CONACYT G35012N

PAPIIT IN212100, IN223598

PADEP 205325

CONACYT SECTORIAL SALUD 2002-CO1-7677

A la Dra. Inés Fuentes.

Como todos sus alumnos le agradezco el que haya compartido sus conocimientos, su paciencia, etc pero principalmente le agradezco el no haberme abandonado y alentarme a cerrar este ciclo en uno de los momentos más difíciles de mi vida.

A la Dra. Lena Ruíz y su equipo de colaboradores, gracias por su confianza y apoyo.

A mi jurado

Por el tiempo que me dedicó y por todos sus consejos, los cuales han sido de gran ayuda e interés.

A todas aquellas personas que se me haya pasado mencionar y que de alguna manera contribuyó a la realización de este proyecto.

A mis padres

Por ser los pilares fundamentales en mi vida; Por haberme enseñado valores morales y espirituales como: la honestidad, la bondad, el respeto, la humildad, la amistad y la solidaridad; Por enseñarme a ser perseverante, tenaz y optimista, a cultivar el buen humor y a disfrutar los pequeños y grandes momentos.

Finalmente quiero agradecerles, sus besos, sus caricias, su protección, su comprensión, su apoyo y paciencia, los sacrificios que han hecho por mi y mis hermanos e incluso por haber sido duros conmigo en el momento adecuado.

Por llenar mi vida de felicidad, **“mil gracias”**

DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO ANALITICO POR CLAR PARA LA CUANTIFICACION DEL GRADO DE UNION A PROTEINAS PLASMATICAS DE LA CASIOPEINA IIGLY, UN NUEVO ANTICANCERÍGENO.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO I	3
1.1 INTRODUCCIÓN.	4
CAPITULO II	7
2.1 CÁNCER	8
2.1.1 ANTECEDENTES DEL CÁNCER.	8
2.2. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER	9
2.2.1 ANTECEDENTES DE LA QUIMIOTERAPIA	10
2.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.	10
2.2.3 DESVENTAJAS DE LA QUIMIOTERAPIA	12
2.2.4 CIS-DIAMINO-DICLORO-PLATINO (II). (CISPLATINO).	13
POSTULADOS DE ROSENBERG:	14
2.3. CASIOPEÍNAS.	15
2.3.1 DISEÑO DE COMPLEJOS DE COORDINACIÓN DE COBRE CASIOPEÍNAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.	15
2.3.2 CASIOPEÍNA Iigly	17
2.3.2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.	17
2.3.2.2 TOXICIDAD Y FARMACOCINÉTICA DE LA CASIOPEINA IIGLY	17
2.4. UNIÓN A PROTEÍNAS	18
2.4.1. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	20
2.4.2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE UNIÓN A PROTEÍNAS	21
2.4.3. ULTRAFILTRACIÓN	22
2.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DEL ALTA RESOLUCIÓN	24
2.5.1 PRINCIPIO DE LA CLAR	24
2.5.2 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR	24
2.5.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	26
La resolución	26
El factor de capacidad (K')	26
El número de platos teóricos (N).	26
Factor de selectividad (α).	27
2.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	27
CAPITULO III.	28
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
3.1.1 HIPOTESIS	30
CAPITULO IV	31
4.1 OBJETIVOS	32

4.2 PARTE EXPERIMENTAL.	33
4.2.1 EQUIPO.	33
4.2.2 REACTIVOS	33
4.2.3 MATERIAL BIOLÓGICO.	34
4.2.4 SOLUCIONES.	34
4.3 PRUEBA DE SOLUBILIDAD	34
4.4 ESPECTRO DE ABSORCIÓN	34
4.5 ESTUDIO DE ESTABILIDAD PRELIMINAR DE LA MUESTRA ANALÍTICA.	34
4.6 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE LA CASIOPEÍNA HGLY.	35
4.7 OPTIMIZACION DEL MÉTODO ANALÍTICO.	35
4.7.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.	35
4.8 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO.	36
4.8.1 SELECTIVIDAD.	36
4.8.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA.	36
4.8.2.1 TRATAMIENTO DE CARTUCHOS DE ULTRAFILTRACIÓN AMICON Y PUNTAS DE MICROPIPETAS CON TWEEN 20 AL 0.25%.	36
4.8.3 PRECISION DEL SISTEMA (repetibilidad).	37
4.8.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO	37
4.8.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO.	37
4.8.5.1 REPETIBILIDAD.	37
4.8.5.2 REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO.	38
4.8.6 EXACTITUD.	38
4.8.7 ESTABILIDAD	38
4.8.8 LIMITE DE DETECCIÓN (LOD).	38
4.8.9 LIMITE DE CUANTIFICACION (LOQ).	38
4.9 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE UNION A PROTEINAS PLASMÁTICAS DE LA CASIOPEÍNA Hgly, POR EL MÉTODO DE ULTRAFILTRACIÓN.	39
4.9.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN: ALBÚMINA, PLASMA HUMANO, PLASMA DE PERRO Y DE RATA.	39
ALBUMINA	39
PLASMA DE DIFERENTES ESPECIES.	39
4.9.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	39
CAPITULO V	41
5.1 SOLUBILIDAD DE LA CASIOPEINA II.	42
5.2 ESPECTRO DE ABSORCIÓN.	42
5.3 ESTABILIDAD.	43
5.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.	44
5.4.1 OPTIMIZACION DEL METODO ANALITICO	46
5.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	46
5.5.1 ADECUABILIDAD	46
5.5.2 SELECTIVIDAD	46
5.5.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA.	48
5.5.4 PRECISIÓN DEL SISTEMA.	48
5.5.5. LINEALIDAD DE MÉTODO.	49
5.5.6 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)DEL MÉTODO Y PORCENTAJE DE RECOBRO	49
5.5.6.1 REPRODUCIBILIDAD	49

5.5.7 EXACTITUD.	50
5.5.8 ESTABILIDAD (Estudio de conservación de las muestras).	50
5.5.9 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).	51
5.5.10 LIMITE DE DETECCIÓN (LOD).	51
5.6 UNIÓN A PROTEÍNAS.	51
5.6.1 DETERMINACION DEL GRADO UNION A LA MEMBRANA Y AL FILTRO DE ULTRACENTRIFUGACIÓN.	51
CAPITULO VI	54
6.0 CONCLUSIONES	55
CAPITULO VII	56
BIBLIOGRAFÍA	57

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS DE ACUERDO A SU MECANISMO DE ACCIÓN ²⁸ .	11
FIGURA 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CISPLATINO	13
FIGURA 3. ESTRUCTURA DE LA CAS II GLY. [(ACUA 4,7-DIMETIL-1,10-FENANTROLINA)(GLICINA).Cu(II)] NO ³	17
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA DISPOSICIÓN DEL FÁRMACO EN EL CUERPO. DONDE $K_{P,R,T,E}$ = CONSTANTE DE AFINIDAD DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS, DE LOS RECEPTORES ACTIVOS, DE LOS TEJIDOS Y DE LOS SITIOS DE ELIMINACIÓN, RESPECTIVAMENTE, DEL FÁRMACO	19
FIGURA 5. DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ULTRAFILTRACIÓN. LAS MOLÉCULAS DE FÁRMACO (●) NO UNIDAS A LAS PROTEÍNAS (o) Y EL AGUA PLASMÁTICA PUEDEN PASAR A TRAVÉS DE UN FILTRO SEMIPERMEABLE, MIENTRAS QUE LAS MOLÉCULAS UNIDAS A LAS PROTEÍNAS PERMANECEN EN EL FILTRO.	23
FIGURA 6. DIAGRAMA DE FLUJO DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ALBÚMINA, PLASMA HUMANO, DE PERRO Y DE RATA.	40
FIGURA 7. ESPECTRO DE ADSORCIÓN DE LAS CAS II GLY EN METANOL / AGUA (50:50) A TEMPERATURA AMBIENTE.	42
FIGURA 8. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN UNA SOLUCIÓN DE METANOL AGUA 50:50.	43
FIGURA 9. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CAS II GLY. A) EN EL BLANCO DE AGUA SOLO SE OBSERVA UN PEQUEÑO PICO NEGATIVO ENTRE LOS 2 Y 3 MINUTOS B) AGUA +CLORANFENICOL (TR=5.4 MIN)+ CAS II GLY (Tr = 6.8). C) EL BLANCO DE ALBÚMINA BOVINA MUESTRA UN PICO ENTRE EL MINUTO 1.5 Y 2.2 . D) AL AGREGAR CAS II GLY A UNA SOLUCIÓN DE ALBÚMINA BOVINA, SE OBSERVA UN PICO A LOS 6.8 MINUTOS EN EL CUAL NO SE ENCONTRÓ NINGÚN OTRO PICO. E) EN EL BLANCO DE PLASMA HUMANO SE OBSERVAN 3 PICOS EL PRIMERO A LOS 2.3, EL 2DO A LOS 2.6 Y EL 3 ERO A LOS 5.063 MINUTOS D) AL AGREGAR UNA MUESTRA DE CAS II GLY AL PLASMA SE OBSERVAN 2 PICOS ADICIONALES A LOS 5.3 Y 8.023 MIN, LOS CUALES NO SE ENCIMAN CON LOS PICOS DEL PLASMA.	47
FIGURA 10. LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CAS II GLY EN PLASMA.	48
FIGURA 11. LINEALIDAD DEL MÉTODO LA CUANTIFICACIÓN DE CAS II GLY EN PLASMA	49

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. SUBFAMILIAS Y FAMILIAS GENERALES DE LAS CASIOPEÍNAS	16
TABLA 2. PRINCIPALES PROTEÍNAS PLASMÁTICAS. ^B PUEDEN DISMINUIR EN PACIENTES CON CÁNCER. ^C SE PUEDEN INCREMENTAR EN PACIENTES CON CÁNCER	21
TABLA 3. FACTORES QUE MODIFICAN LA UNIÓN DE COMPUESTOS A PROTEÍNAS	21
TABLA 4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN INDIRECTA DEL GRADO DE UNIÓN A PROTEÍNAS ^{20, 66}	22
TABLA 5. CONDICIONES INICIALES PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE FASE REVERSA	26
TABLA 6. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LA MOLÉCULA EN DIFERENTES DISOLVENTES ORGÁNICOS	34
TABLA 7. RESULTADOS DE SOLUBILIDAD DE LA CAS IIIGLY EN LOS DIFERENTES DISOLVENTES ORGÁNICOS	42
TABLA 8. RESULTADOS DE ABSORCIÓN DE LA CAS IIIGLY EN CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN, AMBIENTE Y EXPUESTAS A LA LUZ. *LSC LÍMITE SUPERIOR DE CONFIANZA, **LIC LÍMITE INFERIOR DE CONFIANZA	43
TABLA 9. CONDICIONES CROMATÓGRAFICAS PROBADAS DURANTE EL DESARROLLO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CAS IIIGLY POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ALTA RESOLUCIÓN.	44
TABLA 10. RESULTADOS DE PRECISIÓN DEL SISTEMA	48
TABLA 11. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CAS IIIGLY.	49
TABLA 12. REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE LA CAS IIIGLY.	50
TABLA 13. EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA CAS IIIGLY.	50
TABLA 14. RESULTADOS DE ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS DE CAS IIIGLY QUE PERMANECIERON DENTRO DEL INYECTOR DURANTE 8 HRS.	50
TABLA 15. RESULTADOS DEL GRADO DE UNIÓN DE LA CAS IIIGLY A LA ALBÚMINA BOVINA Y A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS HUMANAS, DE PERRO Y RATA. EN DIFERENTES CONCENTRACIONES (N=3)	52

RESUMEN

La importancia de controlar enfermedades degenerativas mortales como el cáncer ha propiciado la búsqueda, caracterización y síntesis de nuevos compuestos, con capacidad antineoplásica. Las Casiopeínas, es un nuevo grupo de compuestos de coordinación con un centro metálico de (Cu^{2+}) que fueron diseñadas y sintetizadas por la Dra. Lena Ruiz en la Facultad de Química de la UNAM. Entre estas, la Casiopeína IIgly (Cas IIgly) ha mostrado tener efecto citostático, citotóxico y antineoplásico, lo que la hace ser una fuerte candidata a ser utilizada como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer, sin embargo, poco se sabe acerca de su eficacia y seguridad. Por tal motivo es necesario realizar un gran número de pruebas que nos den una idea de su potencial toxicológico, predecir el perfil farmacocinético / farmacodinámico del fármaco y determinar la dosis terapéutica adecuada.

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la solubilidad, la estabilidad y la determinación de la longitud de onda máxima de la Casiopeína IIgly, disuelta en solución de metanol:agua. También se desarrolló, optimizó y validó el método analítico por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR) y finalmente se determinó del grado de unión de esta molécula en soluciones de albúmina bovina sérica (ABS), plasma humano, plasma de perro y plasma de rata utilizando la técnica in Vitro de Ultrafiltración.

La Casiopeína IIgly es muy soluble en agua, soluble metanol y en soluciones de metanol/agua e insoluble en acetonitrilo. Sus picos máximos de absorción fueron detectados a una longitud de onda de 209 y 273 nm. La Casiopeína IIgly es una molécula fotosensible pero, en condiciones de refrigeración y protegidas de la luz permanece estable durante más de 21 días. La Casiopeína IIgly la cual eluye a los 6.8 min en agua y los 8.0 min en plasma fue bien resuelta de sus componentes endógenos. Hubo una buena relación lineal entre el área del pico de los analitos y su concentración, en el intervalo de concentración de 2 a 50 $\mu\text{g/ml}$. El porcentaje de recobro fue de 91.8 %. La precisión y exactitud promedio (RSD) de las muestras control, estuvieron dentro del 15%. El límite de detección fue de 0.031 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de cuantificación de 2.0 $\mu\text{g/ml}$.

El fármaco se une en un alto grado a las proteínas de las diferentes matrices probadas. El grado de unión a proteínas fue para la albúmina de 96.8 %, para el plasma humano de 95.2%, para el plasma de rata de 88.68% y de 72.78% para el plasma de perro.

La unión del fármaco a la albúmina promedio (\pm s.d) no fue significativamente diferente a la del plasma humano, esto sugiere que la albúmina es la principal, pero no necesariamente la única proteína unida a la Casiopeína. El método de ultrafiltración utilizado para la determinación del grado de unión de la Casiopeína IIgly a las proteínas plasmáticas, es adecuado debido a su rapidez.

ABSTRACT

The importance of controlling lethal degenerative diseases as cancer have started the investigation, characterization and synthesis of new drugs. Casiopeinas are a new group of coordination compounds with copper (II) as a metallic center. They were designed and synthesized by Lena Ruíz Ph. in la Facultad de Química from UNAM. Casiopeina IIgly showed to have cytostatic, cytotoxic and antineoplastic effect. It has become to Casiopeína IIgly in a potentially useful therapeutic agent in cancer treatment. Due to its mechanism and side effects are still almost unknown, it is necessary to do several testes, which give us an idea of their toxicity, predict their pharmacokinetic and pharmacodynamic profile and determined their dosage regiment.

The solubility and stability study and the determination of absorption spectrum of Casiopeína IIgly were done. A selective and accurate High Performance Liquid Chromatography method (HPLC) was developed, optimized, validated and applied for determining the extent of binding protein of Casiopeína IIgly. Protein – free samples were prepared by ultrafiltration method in bovine albumin, human, dog and rat plasma.

This molecule is very soluble in water, soluble in methanol or methanol water solutions and insoluble in acetonitrile. The Casiopeina's spectrum shows two maxima peaks at 273 nm and 209 nm and minima at 248 nm. Casiopeina IIgly is a photosensible molecule but in refrigeration's conditions and protected from the light, it is stable at least for 21 days.

Casiopeina IIgly that eluted within 6.8 min in water and 8.0 min in plasma was well resolved from endogenous components. There was a good lineal relationship between chromatograph area of analytes and concentration of analytes over the concentration range from 2 to 50 µg/ml. The recovery of assay was 91.8 %. The overall accuracy and precision (RSD) of quality control were within 15%. The limit of detection was de 0.031 µg/ml and the limit of quantization was 2.0 µg/ml.

The Cas IIgly is a molecule that is highly bound to plasma protein(>90%). The amount of Cas IIgly bound to albumin protein (albumin assay) was not significantly different from the amount of drug bound to plasmatic protein, it suggest that albumin is the major but not necessary the only binding protein to Casiopeina IIgly in serum. By its speed the ultrafiltration method was a suitable method for determining the extent of binding protein of Cas IIgly

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN.

El cáncer ha llamado la atención de investigadores de todo el mundo, debido al impacto que tiene sobre la salud. Actualmente esta enfermedad está entre las primeras causas de muerte a nivel mundial¹. El cáncer es un grupo de enfermedades, que pueden atacar cualquier tejido corporal y se caracteriza por la multiplicación desordenada de células que no reciben las señales del control de crecimiento la cual es causada por un desorden genético a nivel celular, que involucra la mutación de un pequeño número de genes. Muchos de estos genes normalmente actúan en el control del progreso, del ciclo celular y la pérdida o inactivación de estos genes causa una división celular descontrolada y la formación de tumores².

A pesar del esfuerzo que se ha hecho por encontrar la manera de prevenir y curar esta enfermedad, su naturaleza así como su forma de presentación ha impedido encontrar una línea terapéutica que sea general, segura y eficaz contra este padecimiento.³

La detección de tumores en sus primeras etapas es el método más eficaz, para detener la progresión de los tumores, pues resulta más sencillo detener su malignidad antes de que cause daños irreversibles. Desgraciadamente, no siempre es posible detectar la presencia de tumores en los estadios iniciales y sólo se hace evidente cuando los tumores ya han invadido otras zonas del cuerpo. La cirugía, las radiaciones, la quimioterapia, la inmunoterapia, la crioterapia, etc, son algunas de las terapias actualmente disponibles en el tratamiento contra el cáncer. Por el momento la quimioterapia es la mejor opción para el tratamiento de la mayoría de los tumores humanos, debido a que ofrece una mayor probabilidad de curación, además, de que si se utiliza en combinación con otras terapias como la cirugía, radioterapia o inmunología, puede aumentar el éxito de la terapia en una extensa variedad de tumores^{4,5,6}.

El cisplatino, es un medicamento anticancerígeno de centro metálico, descubierto por Rosenberg⁷. Este fármaco revolucionó la quimioterapia, por su capacidad para atacar diferentes tipos de cáncer que eran resistentes a otro tipo de compuestos; sin embargo, su alta toxicidad provoca caída de cabello, vómito y secuelas como daños en riñones⁸. Por otro lado la administración del cisplatino, puede causar resistencia natural hacia el compuesto, así como resistencia desarrollada después del tratamiento inicial. La esperanza de encontrar un fármaco que ofrezca las ventajas del cisplatino, pero, con efectos adversos menores, hizo que la atención se concentrará principalmente sobre la generación de análogos directos al cisplatino^{9,10}. Sin embargo, se ha observado que los simples análogos del cisplatino no ofrecen ventajas clínicas sustanciales y esa es la razón principal por la cual algunos investigadores han concebido enfoques completamente diferentes en el diseño de fármacos.

Algunos investigadores están trabajando con elementos metálicos esenciales, los cuales se encuentran presentes en el organismo humano pues consideran que si por alguna causa se acumularan en exceso, existen mecanismos que se activan de manera natural para eliminarlos¹¹.

Cualquiera que sea la línea terapéutica, no se debe olvidar que ésta debe tener actividad antitumoral, ser efectiva contra los tumores para los que no existen tratamientos efectivos en la actualidad, y que los efectos secundarios que pueda causar sean menores a los que se presentan con los medicamentos actuales.

En la búsqueda de alternativas, un grupo de investigadores de la Facultad de Química de la UNAM, basándose en los antecedentes y conocimientos del cisplatino, se han enfocado al diseño, síntesis y caracterización de un nuevo grupo de compuestos, a los cuales se les ha dado el nombre de Casiopeínas®.

Las Casiopeínas (Cas) son una familia de compuestos que en la esfera de coordinación contiene, cobre (II) como metal y quelatos de diiminas (NN) con quelatoa aminoacidatos o donadores (OO) como ligantes. Debido a que el cobre es un metal esencial es probable que estos compuestos presenten menor toxicidad, que los compuestos de platino. A la fecha, se han sintetizado alrededor de 100 compuestos de los cuales las Casiopeínas I y II han demostrado actividad antineoplásica y citostática importante^{12,13,14,15}.

La Casiopeína IIgly [Acua(4,7-dimetil 1,10 fenantrolina) (glicina)Cu(II)] NO₃ se ha desarrollado específicamente como un fármaco anticancerígeno que actúa contra células Hela, células tipo CaLo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1; es potencialmente citotóxica e induce apoptosis. El hecho de que la Casiopeína IIgly (Cas IIgly) haya demostrado ser menos tóxica que el cisplatino hacía las células sanas, ha provocado que un grupo de investigadores centren su atención en ella, con la esperanza de que esta tenga una posible aplicación clínica a corto plazo^{16,17}.

Sin embargo para esto existen varias fases por las que debe pasar una nueva droga con efecto biológico, antes de ser utilizada en la fase clínica. Este trabajo esta enfocado al desarrollo, optimización y validación del método analítico que nos permitirá la cuantificación de la molécula para posteriormente realizar el estudio de “El grado de unión a las proteínas plasmáticas”¹⁸.

El estudio del grado de unión de los fármacos a la proteínas es un factor muy importante debido a que únicamente el fármaco libre puede pasar a través de las membranas celulares, alcanzar los receptores y por lo tanto ejercer la actividad terapéutica.

Esto significa que este parámetro tiene una importancia clínica relevante, pues a partir de los resultados generados se podrá diseñar regímenes de dosificación adecuados con el propósito de evitar interacciones farmacológicas o efectos indeseados, siempre en beneficio del paciente^{19, 20}.

Para la determinación del grado de unión a las proteínas plasmáticas se utilizó albúmina bovina sérica (ABS), plasma humano, plasma de perro y de rata a las que se les adicionó una cantidad de Cas II gly para obtener concentraciones de 15, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez preparadas, estas se incubaron a 37° C durante 30 minutos, posteriormente se colocó 1 ml de cada muestra, en los tubos de ultracentrifugación y se centrifugaron durante 30 minutos a 5000 rpm. 50 μL del ultrafiltrado fueron inyectados en una columna de fase reversa y se realizó el análisis bajo las condiciones cromatográficas determinadas durante el desarrollo del método analítico.

CAPITULO II

GENERALIDADES

2.1 CÁNCER

2.1.1 ANTECEDENTES DEL CÁNCER.

El término cáncer se deriva de una palabra griega que significa “Cangrejo”, se le dio este nombre debido a que los tumores de mama al crecer toman la forma de este crustáceo y fue acuñado por Hipócrates en el siglo V, AC.²¹ El cáncer es una enfermedad tan antigua, que incluso se han encontrado tumores en los huesos de los fósiles de los dinosaurios o en las momias descubiertas en Egipto y en Perú²². Sin embargo, de acuerdo con el Dr Gariglio Vidal, esta enfermedad llegó a ser una causa importante de muerte hasta el siglo XX. Antes de 1940 no se ubicaba entre las 10 primeras causas de muerte. Actualmente en nuestro país, el cáncer ha llegado a ser la segunda causa de mortalidad entre la población²³.

Bajo el término cáncer se engloban distintas enfermedades que varían en sus manifestaciones clínicas, pero que comparten mecanismos desencadenantes comunes. Hasta el momento se han descrito más de 100 formas de la enfermedad, de ellos los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90 % de los cánceres y que se generan en los epitelios, siendo los más comunes los que afectan al pulmón, el cuello uterino, las mamas y el intestino grueso²². El restante 10 % de los cánceres humanos se distribuye en dos grupos: los sarcomas que son los más raros y que se originan en estructuras de soporte como el tejido fibroso o vasos sanguíneos, y un grupo heterogéneo en los que se incluyen los cánceres de tejidos productores de las células sanguíneas, las leucemias y los linfomas²⁴.

El cáncer también conocido con el término neoplasia, es una enfermedad de las células que se caracteriza por cambios a nivel genético en uno o varios de los mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de las células. Una célula sana presenta una morfología definida, encaja a la perfección en el entorno de células que la rodean, responde a señales ambientales y produce células hijas con la misma (o virtualmente la misma) secuencia de DNA, sólo cuando el balance de señales estimuladoras e inhibitoras procedentes del exterior favorece la división celular. Sin embargo la acumulación de daños genéticos puede hacer que una célula hija se vuelva insensible a los mecanismos de regulación del crecimiento celular y por lo tanto, pierde su morfología y límites característicos, deja de responder a señales inhibitorias de crecimiento y adquiere la propiedad de replicarse sin cesar²⁵. Una vez que las células empiezan a multiplicarse sin ningún control en algún tejido, forman un tumor, el cual acaba destruyendo el tejido sano de su alrededor o aún peor puede ingresar al sistema circulatorio, y establecer zonas de proliferación alejadas del sitio de aparición original.

Los tumores se clasifican como benignos o malignos de acuerdo a su capacidad para crecer y expandirse.

Los tumores benignos son masas localizadas y pequeñas que no se expanden, en cambio los tumores malignos pueden invadir tejidos circundantes y aún otras partes del cuerpo mediante metástasis²⁶. En términos generales a los tumores malignos se les conoce como cáncer²⁷.

2.2. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

Algunos documentos como el Ramayana de la India o el papiro egipcio Ebers que datan de 2000 a 1500 años a. C demuestran que el estudio y la búsqueda de tratamientos contra el cáncer ha sido objeto de gran interés desde hace tiempo ^{23,24}. Sin embargo a pesar del esfuerzo que se ha hecho, aún no se cuenta con una línea terapéutica que sea general, segura y eficaz contra esta enfermedad debido a la naturaleza que presenta.

Hoy en día los tumores cancerosos pueden ser erradicados por cirugía, radioterapia, inmunoterapia, crioterapia, quimioterapia, o la combinación de alguna de ellas, su selección depende del tipo de cáncer, la distribución y el estado del paciente.

En la actualidad la cirugía es la terapia más confiable y rápida se utiliza para remover los tumores primarios y constituye el tratamiento de elección para tumores sólidos o para aquellos que su crecimiento permanezca localizado. Desafortunadamente si las células cancerosas ya se han esparcido a otras partes del cuerpo, la extirpación del tumor por medio de la cirugía es insuficiente.

La quimioterapia es una terapia en la que se utilizan fármacos para erradicar los tumores cancerígenos. Estos fármacos tienen como objetivo causar una lesión citotóxica letal que pueda disminuir la progresión del tumor. Este ataque generalmente es dirigido contra los sitios metabólicos esenciales a la replicación celular. Por ejemplo la biodisponibilidad de los precursores de las purinas y pirimidinas para la síntesis del DNA o RNA ²⁸. Actualmente la quimioterapia es la mejor opción para el tratamiento de la mayoría de los tumores humanos, debido a que ofrecen mayor probabilidad de curación y se cree que aún con el advenimiento de las nuevas técnicas, la quimioterapia seguirá siendo una buena opción en el tratamiento y prevención de la enfermedad, debido a que una vez que se entienda la naturaleza de la enfermedad, la farmacocinética y farmacodinamia de los fármacos se podrán utilizar con mayor éxito incluso los fármacos ya existentes.

2.2.1 ANTECEDENTES DE LA QUIMIOTERAPIA

Desde hace 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con fármacos, se sabe que con este propósito se empleaban preparaciones de plata, zinc o mercurio. Sin embargo, no se documentó hasta 1865 el uso de un tratamiento sistemático en neoplasias malignas cuando Lissauer administraba arseniato de potasio a pacientes con leucemias y observaba efectos positivos; pese a estos antecedentes la quimioterapia del cáncer como tal se sistematizó 80 años después.

Al término de la Segunda Guerra Mundial una nueva era conocida como, “era moderna de la quimioterapia del cáncer” comenzó, al introducir las mostazas nitrogenadas, agentes alquilantes desarrollados para el uso clínico como consecuencia de la toxicidad hematopoyética observada con la mostaza sulfurada (un gas de guerra) y la aminopterina, un antagonista de los folatos. Estos compuestos produjeron remisiones notables en pacientes con linfoma y en niños con leucemia linfocítica aguda. Desafortunadamente, no se observaron curaciones debido al rápido desarrollo de resistencia a los fármacos. Estos resultados fueron seguidos por un enérgico programa de desarrollo de fármacos anticancerosos, en especial en los Estados Unidos y fueron alentados por el apoyo y las facilidades de evaluación masiva proporcionados por el National Cancer Institute a los investigadores y académicos e industriales.

A partir de 1950 se produce una aceleración con la introducción de los antimetabolitos, la actinomicina D (1955) y el empleo de los glucocorticoides. Desde entonces se han probado más de 30 fármacos en el tratamiento de los pacientes con cáncer entre los que destacan: la citosina-arabinósido y los alcaloides de la Vinca en los años 60 ²⁹.

2.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.

Los fármacos que actualmente se utilizan en el tratamiento del cáncer se clasifican en 9 grupos de acuerdo a su mecanismo de acción: agentes alquilantes, antimetabolitos, depolimerizantes del DNA, antibióticos, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, hormonas, antihormonas e inmunoestimuladores-inmunomoduladores ³⁰ o como agentes que actúan sobre el ciclo celular o los que lesionan al DNA. Ver figura No. 1.

SÍNTESIS DE PURINA Y PIRIMIDINA

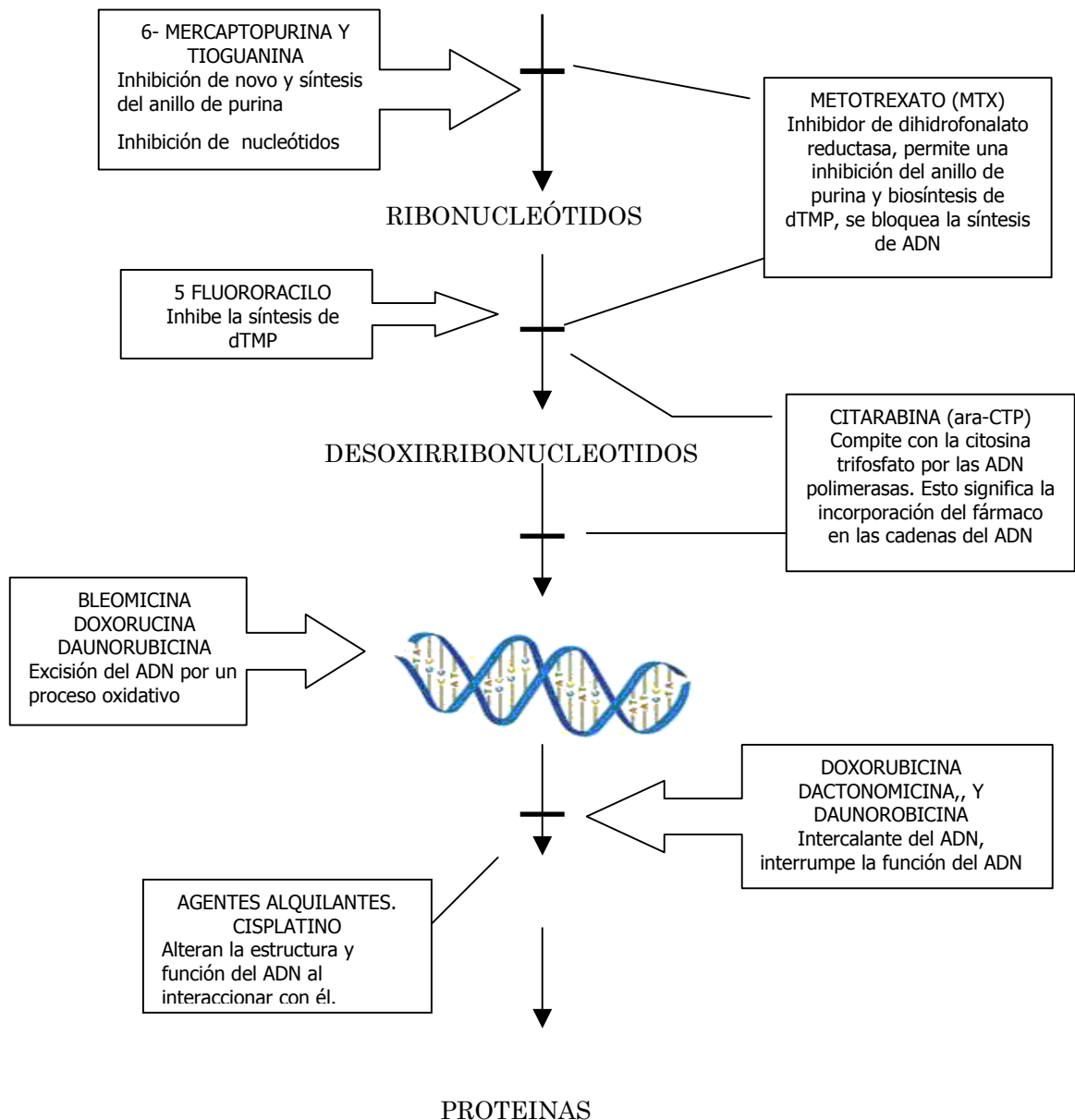


Figura 1. Clasificación de los fármacos antineoplásicos de acuerdo a su mecanismo de acción ²⁸.

Agentes que actúan sobre el ciclo celular. Los agentes que actúan sobre el ciclo celular son fármacos que para ser citotóxicos requieren que las células estén en el ciclo, es decir, atravesando activamente el ciclo celular preparatorio para la división celular²⁹.

Fármacos que lesionan al DNA. Estos fármacos actúan: dañando o alterando la molécula de alguna manera, previniendo la síntesis de ácido nucleico al inhibir una o más de las enzimas

involucradas en la síntesis del DNA o perturbando la función del DNA al incorporar “piezas incorrectas” en la molécula. Los fármacos que interactúan con el DNA previenen el crecimiento celular.

2.2.3 DESVENTAJAS DE LA QUIMIOTERAPIA

La falta de selectividad de los fármacos antineoplásicos es un problema que se presenta en la quimioterapia del cáncer, la cual es ocasionada debido que los fármacos quimioterapéuticos existentes tienen como blanco a los mecanismos utilizados por las células en proliferación, en lugar de atacar anormalidades específicas asociadas a las células tumorales. Esto hace que, la ventana terapéutica entre una célula normal y la maligna sea pequeña, lo que da lugar a efectos colaterales altamente tóxicos como por ejemplo anorexia, vómito, diarrea, alopecia, supresión de la médula ósea y del sistema inmune, así como anafilaxia, nefrotoxicidad y cambios en el sistema urinario²⁹.

Otro problema que se presenta durante la terapia con fármacos, es del desarrollo de resistencia

Los principales mecanismos que tienen las células tumorales para volverse resistentes a los fármacos antineoplásicos son:

- a) La inactivación del fármaco, por ejemplo la mercaptopurina.
- b) Insuficiente activación *in vitro* por pérdida de la actividad de la enzima correspondiente.
- c) El fármaco puede ser metabolizado a formas inactivas.
- d) Disminución de la afinidad del fármaco por sus receptores o aumento del número de estos.
- e) Disminución de la captación del fármaco activo por la célula cancerosa.
- f) Presencia de enzimas reparadoras del daño celular, que son importantes en la resistencia de los agentes alquilantes.
- g) El transporte de membrana puede encontrarse disminuido^{17, 28}. (p. Ej. el cisplatino)

Actualmente el cisplatino es uno de los fármacos quimioterapéuticos más importantes el tratamiento con este fármaco ya sea solo en combinación con etopósido y bleomicina; pueden lograrse tasas de supervivencia global de 80% a 90%

2.2.4 CIS-DIAMINO-DICLORO-PLATINO (II). (CISPLATINO).

Se sabe que, aún cuando fue sintetizado por primera vez en 1845 por Peyrone y en 1898 Werner separó esta molécula en sus isómeros cis- y trans-, fue hasta 1967 cuando el doctor Rosenberg descubrió las propiedades citotóxicas del cisdiaminodicloroplatino³¹. Rosenberg observó que el crecimiento de un cultivo bacteriano se inhibía cuando era sometido a una corriente eléctrica transmitida por electrodos de platino, más tarde se demostró que el efecto inhibitor sobre la multiplicación de las bacterias era consecuencia de que los electrodos de platino producían una sustancia tóxica, este material era el complejo de coordinación con platino, ahora mejor conocido como “**Cisplatino**”. Estudios posteriores realizados en bacterias y las células tumorales de mamíferos revelaron que este complejo de platino tenía actividad antineoplásica.

Este fármaco se encuentra unido en alto grado a las proteínas plasmáticas (> 90%), tiene una constante de unión a la albúmina sérica (K) de $1.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y un número de sitios de unión máximo de (n) 3.3³¹. Se ha propuesto que el mecanismo de acción del cisplatino es semejante al de un agente alquilante e intercalante, y que se enlaza directamente con el nitrógeno de la posición 7 de las guaninas del ADN³².

El cisplatino tiene efectos antitumorales significativos en los cánceres de ovario, testiculares, de cabeza, de cuello, cervical, pulmón y de huesos³². Desgraciadamente, al igual que cualquier fármaco antineoplásico, el cisplatino es muy tóxico y además presenta una solubilidad limitada en solución acuosa.

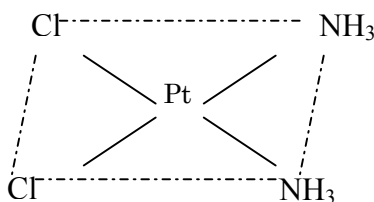


Figura 2. Estructura Química del Cisplatino

Los resultados generados con la investigación sobre esta molécula han permitido llegar a las siguientes conclusiones.

En primer lugar se observó que el metal de aquellos fármacos antineoplásicos que poseen una parte orgánica unida a un metal, actúa como centro de coordinación para las proteínas y los ácidos nucleicos de las células cancerosas. Por otro lado se observó que el uso de quimioterapéuticos cuyo principio es un complejo de coordinación ofrece las siguientes ventajas:

- a) Las dosis que producen efectos biológicos son menores, es decir, se requiere de menor cantidad de sustancia para lograr el mismo efecto.
- b) La molécula inorgánica sufre menor grado de biotransformación después de ser suministrada.
- c) La presencia del metal ofrece una mayor especificidad³³.

El cisplatino también es importante, porque, a partir de su amplia evidencia experimental acumulada surgieron los postulados de Rosenberg y se ha demostrado que los compuestos de coordinación que satisfagan estos postulados tienen potencial antineoplásico.

POSTULADOS DE ROSENBERG:

- a) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- b) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
- c) Son necesarios dos ligantes cis monodentados (uno bidentado) como grupos salientes. Los isómeros trans son inactivos.
- d) La velocidad de intercambio de estos ligantes le dan intervalos específicos de labilidad a cada compuesto.
- e) Los ligantes no intercambiables en las moléculas deben estar fuertemente enlazados³⁴.

La ausencia de fármacos que sean capaces de reducir la tasa de mortalidad, la alta toxicidad y el alto costo, de los existentes ha estimulado la búsqueda de nuevos fármacos.

De manera ideal esta búsqueda pretende encontrar fármacos con las siguientes características:

- Ausencia de resistencia_ cruzada al cisplatino
- Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significantes.
- Disminución de efectos eméticos y renales (tóxicos directos en general)
- Sinergismo en terapias combinadas.
- Bajo potencial oncogénico^{35,36}

Las investigaciones han seguido principalmente dos caminos para reducir los efectos tóxicos de estos fármacos

1.- El desarrollo y la síntesis de análogos que tienen menos efectos tóxicos. Ejemplo los análogos o derivados del cisplatino.

2.- Reducción de la toxicidad por medio del uso de agentes completamente diferentes. Ejemplo, los agentes antieméticos^{29,32,37}.

2.3. CASIOPEÍNAS.

Tomando en cuenta lo anterior en 1975, la Dra. Ruiz Azuara, de la División de Estudios de Posgrado de la facultad de Química de la UNAM, inició un proyecto encaminado al desarrollo de fármacos antineoplásicos a partir de metales de transición, de preferencia biológicamente esenciales, esto con el fin de disminuir su toxicidad y costo^{10,11}. Los compuestos de coordinación desarrollados por Ruíz Azuara mostraban, de manera teórica, una actividad biológica potencial. Dichos compuestos poseen una esfera de coordinación de metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, y Zn). Este grupo de compuestos a base de cobre se encuentran patentados y registrados por la UNAM con el nombre de CASIOPEINAS® [Cu (4.1-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)NO₃].

2.3.1 DISEÑO DE COMPLEJOS DE COORDINACIÓN DE COBRE CASIOPEÍNAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

La familia de compuestos Casiopeínas® es un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) como centro metálico, que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado de tipo diimina (N-N) y otro puede ser un aminoacidato (N-O) o donador (O-O)³⁸.

Este grupo de compuestos fue diseñado pensando en que la planaridad en la geometría de la molécula y el ligante diimina, con carácter hidrofóbico, le conferirían la posibilidad de actuar como intercalante a través de interacciones con las bases púricas y pirimidicas del DNA y el ligante cargado le conferiría una polaridad necesaria para el transporte de la molécula. La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el ligante diimina son responsables de la variación en la actividad biológica. El centro metálico por su parte puede participar en ciclos redox para liberar ERO (Especies reactivas de oxígeno). La reducción del cobre (II) a cobre (I) de las Casiopeínas® provoca liberación de ERO y estas a su vez generan radicales libres, a través de las reacciones de óxido-reducción de tipo Fenton y Haber-Weiss. Los radicales libres permiten la liberación del oxígeno de la desoxirribosa y por consiguiente el rompimiento de la hebra, dando como resultado daños irreparables en su estructura³⁹. Estos efectos no parecen tener relación con daño en la membrana plasmática, adicionalmente el cobre puede no intercambiar alguno de sus ligantes posiblemente el α -a.a. o donador O-O para coordinarse directamente con los donadores por nitrógeno de las bases formando enlaces similares a los observados con el cisplatino.

Finalmente el α -a.a. ó donador por O-O se proponen como responsables de la modulación en la distribución y transporte, y por lo tanto de la selectividad tumoral de la molécula.

Algunos de estos compuestos han demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica en modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*; sin embargo no se sabe como actúa el metabolismo sobre estos fármacos. Existen algunas evidencias de que las Casiopeínas son activadas por las enzimas del metabolismo.

Las Casiopeínas actúan sobre la mitocondria en una manera dependiente del tiempo y la concentración al inhibir el estado 3 mitocondrial (fosforilación oxidativa), la respiración desacoplada y colapsando el potencial de membrana, inhibe la respiración celular y la síntesis de ATP, lo que puede comprometer los procesos dependientes de energía como la duplicación celular ⁴⁰. Estos fármacos también pueden inducir la muerte celular por medio de apoptosis o necrosis. En las primeras etapas de la apoptosis hay cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, Esto permite la liberación del citocromo C y de otras proteínas mitocondriales conocidas como AIF (Factor de inducción de apoptosis) al citosol, estas moléculas activan a una familia de proteasas llamadas caspasas y a su acción proteolítica rompe proteínas estructurales y funcionales clave de la célula lo que provoca su muerte. Por otro lado se ha sugerido que las Casiopeínas pueden inducir apoptosis por una ruta alternativa en la cual no están involucradas las caspasas. En la necrosis las células se hinchan hasta que se rompe la membrana y se liberan las enzimas nocivas que a su vez matan las células circundantes.

Tabla 1. Subfamilias y familias generales de las casiopeínas

Subfamilia	Fórmula General
Casiopeína I	[Cu (4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína II	[Cu (4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína III	[Cu (N-N)(O-O)]NO ₃
Casiopeína IV	[Cu (4,4-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína V	[Cu (5R-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VI	[Cu (5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VII	[Cu (Fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína VIII	[Cu (3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína IX	[Cu (Bipiridona)(O-N)]NO ₃

A la fecha, se han sintetizado alrededor de 100 compuestos los cuales han sido agrupados en subfamilias de acuerdo al tipo de ligantes que contenga la molécula (ver tabla No. 1), con base en los experimentos citostáticos y antineoplásicos *in vitro*, se procedió al desarrollo de los ensayos *in vivo* probando alguno de estos compuestos. Estas subfamilias son tóxicas para bacterias y han demostrado ser activas contra algunas líneas celulares tumorales *in vivo*

(L1210 y Calo) y tumores implantados en ratón (Sarcoma S180, melanócito B16, tumor de Lewis, LW-1 y leucemia linfoide L1210^{41,42}).

Actualmente, tres de estos fármacos entre ellos, la Casiopeína Iigly, ha demostrado actividad antineoplásica en los ensayos exigidos dentro del panel de selección sugerido por el Cancer Institute de los Estados Unidos de América ³⁸.

2.3.2 CASIOPEÍNA Iigly

2.3.2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

La Casiopeína Iigly [[Cu (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina)] NO₃,] tiene un peso molecular de 407.87 g/mol, es un polvo fino de color azul (intenso), libre de partículas extrañas y homogéneo. Su densidad aparente es de 0.425 g/mL y tiene un tamaño de partícula entre >40 <50 micras⁴³.

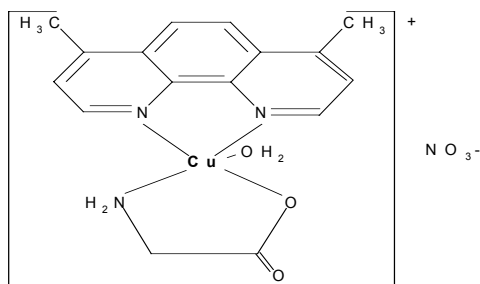


Figura 3. Estructura de la Cas Iigly. [(Acua 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicina).Cu(II)] NO³

2.3.2.2 TOXICIDAD Y FARMACOCINÉTICA DE LA CASIOPEINA IIGLY

La Casiopeína Iigly es potencialmente citotóxica contra las células Hela, células tipo Calo, murinas de leucemia L1210, contra los tipos de cáncer S180, B16 y LW1^{44, 45}

El complejo de cobre de esta molécula, mata a las células de carcinoma de ovario humano y las de leucemia murino por apoptosis y necrosis. La Casiopeína Iigly es altamente activa en líneas celulares resistentes al cisplatino y reduce la expresión de la metalotioneina, la cual es uno de los medios conocidos usados por las células cancerosas resistentes para eliminar a los fármacos anticancerígenos basados en metales⁴⁶. También se une al DNA y aunque esto no es único, lo novedoso de su actividad puede deberse a que reacciona con agentes reductores y rompe la molécula de doble hélice en lugar de inhibir la replicación por cambios estructurales sobre la molécula del ADN o aumentando la reparación del ADN^{47,48,49}. El efecto más importante in vivo de la Casiopeína Iigly es la hemólisis de glóbulos rojos, la cual se debe a la toxicidad del cobre⁵⁰.

La Cas IIgly ha demostrado ser menos cardiotoxica que la andrimicina, la administración de 1 μM de fármaco vía femoral reveló ser inocua ⁵¹.

En un estudio farmacocinético preliminar se concluye que el perfil farmacocinético de la Casiopeína IIgly se ajustó al Modelo Abierto de Dos Compartimentos (MADC) por bolo intravenoso, tiene una vida media de 228.18 minutos y un volumen de distribución de 0.065 litros, su depuración o aclaración (CL) es de 1.14 mL/min, y su Tiempo Medio de Residencia (TMR) es de 262.15 minutos. La Casiopeína IIgly alcanza su estado estacionario a los 120 minutos y su fase de distribución es más rápida que la fase de eliminación⁴⁵. Este fármaco es estable al agua, a fuerza iónica y a temperatura constante a $\text{pH} = 7$ durante 7 días. La DL_{50} en ratón por vía intraperitoneal es de 8.8 mg/Kg/P.C y de 16 mg/ Kg por vía intravenosa⁵². La Casiopeína IIgly inhibe significativamente la proliferación celular, incrementa las especies reactivas de oxígeno (ERO) e induce apoptosis de una manera dosis dependiente ^{40, 53}. La dosis letal 99 (DL99) en perros es de 160 mg/m² (8 mg/Kg). La administración intravenosa de esta dosis preparada en 100 mL de dextrosa al 5%, induce muerte de manera aguda, tal evento es causado por edema pulmonar y/o toxicidad cardiaca, después de un período de 30 a 50 minutos, después del periodo de latencia. Su rango terapéutico es de 1.2 a 3 mg/m² y el verdadero margen terapéutico de 20 a 50 mg/m² ⁵⁴.

Debido a que la Cas IIgly ha demostrado ser citotóxica en células sensibles y resistentes y menos tóxicas que el cisplatino, se decidió continuar con los estudios farmacocinéticos y toxicológicos

El grado de unión a proteínas es el parámetro que nos permitirá conocer el grado de distribución del fármaco dentro del cuerpo y de esta manera se podrá diseñar un régimen de dosificación adecuado con el que se pretende controlar y prevenir las situaciones críticas y/o agudas, disminuir los efectos adversos, así como mejorar la calidad de vida del paciente. ⁵⁵

2.4. UNIÓN A PROTEÍNAS

El conocimiento del grado de unión de los fármacos a proteínas plasmáticas, es importante debido a que los efectos terapéuticos y tóxicos del mismo están directamente relacionados con la concentración de fármaco libre. ^{19, 55}

Una vez que el compuesto llega a la circulación sistémica, bien porque se haya administrado por vía endovenosa o bien porque haya sufrido un proceso de absorción tras su administración por vía oral u otra vía extravascular, se produce la distribución del mismo en las células sanguíneas, proteínas plasmáticas y agua plasmática. ^{56, 57, 58}

La distribución y disposición del fármaco en el cuerpo es regulado por (a) sus propiedades fisicoquímicas que permitirán su acceso a los sitios de unión extravascular, (b) por su grado de unión a las proteínas plasmáticas, el cual depende de la constante de afinidad (K_p)

de la proteína por el fármaco y (c) por su unión a las proteínas de tejidos, un proceso regulado por la densidad de los sitios de unión y la constante de afinidad. (K_t) (Fig 4).

Un fármaco con elevada capacidad de fijación presenta valores de K_p entre 10^5 y 10^7 L/mol, mientras que los fármacos con baja o moderada capacidad de unión tienen un valor de K_p entre 10^2 y 10^4 L/mol

La fracción unida tiene valores comprendidos entre 0 y 1. Un valor de f_u mayor de 0.9 significa un importante grado de unión a las proteínas, mientras que valores inferiores a 0.2 implican que la unión es escasa o prácticamente inexistente²⁰

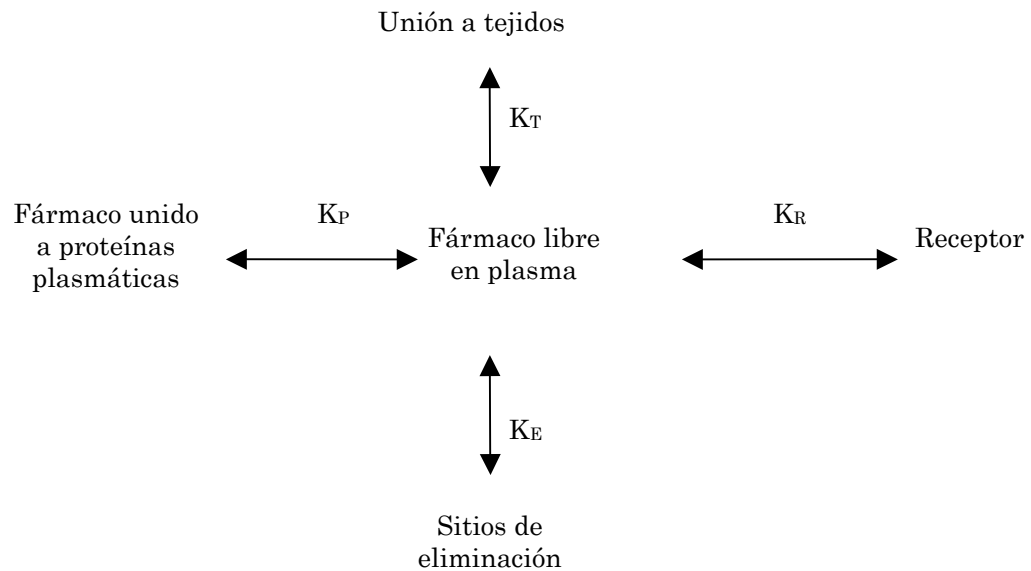


Figura 4. Representación esquemática de la disposición del fármaco en el cuerpo. Donde $K_{P, R, T, E}$ = Constante de afinidad de las proteínas plasmáticas, de los receptores activos, de los tejidos y de los sitios de eliminación, respectivamente, del fármaco

La velocidad de eliminación del fármaco varía de acuerdo a la depuración intrínseca del órgano de eliminación y el valor de la depuración intrínseca también está asociada con la constante de afinidad del sistema enzimático del fármaco (K_E).

La cantidad del fármaco que alcanza el sitio de unión del receptor depende del valor relativo de todas estas constantes de afinidad. Por ejemplo si K_t es significativamente mayor a las demás constantes de afinidad significa que la mayor cantidad de fármaco se encuentra localizado en los tejidos y tendrá un gran volumen de distribución aún cuando la depuración sea potencialmente muy rápida. Aún cuando la K_E es alta la eliminación es lenta porque el

fármaco unido al tejido tiene lento acceso al hígado, como pasa con muchos fármacos flujo dependiente.

Debido a la complejidad de los procesos de equilibrio que regulan la disposición del fármaco, es difícil predecir las repercusiones de las interacciones fármaco- fármacos a nivel de la unión a las proteínas plasmáticas en la respuesta farmacológica, tomando en cuenta únicamente el proceso de desplazamiento, es esencial considerar la contribución de la unión del fármaco por las proteínas del tejido, las características del proceso de eliminación, es decir si es saturable o no. Un cuadro más complejo aparece cuando se trata de predecir la repercusión de los cambios en la unión a las proteínas plasmáticas inducidos por enfermedades ya que es necesario tomar en cuenta la influencia de la enfermedad en (a) la unión del fármaco al tejido, (b) la eficiencia de las rutas de eliminación y (c) la respuesta farmacológica (Tabla 3). Es imposible predecir las repercusiones de los cambios en la unión a proteínas sobre la respuesta del fármaco sin una consideración cuidadosa del efecto simultáneo de la condición patológica sobre la unión a las proteínas plasmáticas y del tejido, sobre la eliminación del fármaco y aún más importante sobre la respuesta misma del fármaco⁵⁹.

Algunos estudios indican que las etapas avanzadas de cáncer están asociadas con una elevación de la AAG y una disminución progresiva de los niveles séricos de albúmina, por otro lado la reducción del tumor por cirugía o quimioterapia reduce los niveles de AAG⁶⁰. Experimentos realizados con furosemida proporcionan pruebas de que los cambios en las proteínas plasmáticas resultan en un cambio significativo en la respuesta farmacológica, sin embargo la pregunta que debemos hacernos es, si cualquier cambio significará un ajuste de dosis. Se ha observado que se puede obtener una respuesta normal a tolbutamida cuando su unión a proteínas plasmáticas es afectada, esto justifica que la alteración del grado de unión a proteínas plasmáticas no necesariamente requiere el ajuste de la dosis.

La unión reversible de un fármaco a macromoléculas tales como proteínas es un proceso en equilibrio, que puede describirse por la ley de acción de masas²⁰.

2.4.1. PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Aunque el plasma humano contiene más de 60 proteínas²⁰, la albúmina, la α -ácido glicoproteína (AAG) y lipoproteínas son consideradas las más importantes en la unión de fármacos. (tabla 2).

La albúmina con una masa molecular de 69 kDa es la proteína plasmática más abundante, el plasma contiene el 40% y el fluido intersticial el 60%^{61, 62}; La mayoría de los fármacos se unen de manera reversible. Aunque la albúmina fija una gran variedad, desempeña un papel fundamental en la fijación de fármacos ácidos (aniónicos y catiónicos). La concentración normal sérica es de 35-50 g / L ⁶³.

Tabla 2. Principales proteínas plasmáticas. ^b pueden disminuir en pacientes con cáncer. ^c se pueden incrementar en pacientes con cáncer

Proteína Plasmática	Fármacos que se unen a la proteína	Peso Molecular (KDa)	Rango normal de Concentraciones en plasma (g/Litro) Molar	
Albumina ^b	ácidos débiles y neutros	69	35 - 50	5 - 7.5 X 10 ⁻⁴
α -1-agg ^c	Básicos	44	0.4 - 1.0	0.9 - 2.2 X 10 ⁻⁵
Lipoproteínas		200 - 3,400	Variable	
Globulinas	Básicos	140	25	Variable
Fibrogeno		400	3	

Los fármacos básicos se unen principalmente a la α 1-ácido glicoproteínas. La concentración de la AAG se puede ser afectada como consecuencia a una gran variedad de condiciones patológicas. La fracción libre de ciertos fármacos básicos puede disminuir en algunas especies animales, después del tratamiento con inductores de enzimas. (Tabla 3).

Tabla 3. Factores que modifican la unión de compuestos a proteínas

CAMBIOS	ALBUMINA	α ₁ -ACIDO GLICOPORTEINA	LIPOPROTEINAS
Aumenta	Tumores benignos Neurosis Paranoia Psicosis Esquizofrenia Deshidratación Ejercicio Hipotiroidismo	Edad (vejez), obesidad, infecciones Cáncer Cirugía Estados Inflamatorios Insuficiencia o falla Renal Transplante renal Neumonía, Estrés Hipotiroidismo, Diabetes mellitus Enfermedades obstructivas del hígado. Artritis reumatoide	Pancreatitis Alcoholismo Antihipertensivos Embarazo. Dieta alta en colesterol
Disminuye	Tumores malignos Edad (neonatos y vejez) En pacientes quemados. Cirrosis Enteropatías Desnutrición Síndrome nefrótico Embarazo Insuficiencia renal Cirugía Desnutrición Hipertiroidismo Trauma	Edad (neonatos) Cirrosis Severa Síndrome nefrótico Anticonceptivos orales Embarazo	Hipertiroidismo Desnutrición

2.4.2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL GRADO DE UNIÓN A PROTEÍNAS

La diálisis al equilibrio, la ultrafiltración, la ultracentrifugación, la filtración en gel, la microdiálisis, etc. son algunos de los métodos que han sido desarrollados para la medir de manera indirecta el grado de unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas. Los métodos más comunes son la diálisis al equilibrio y el de ultracentrifugación porque los resultados se

obtienen en un tiempo menor al de los demás y la preparación de la muestra es de manera simple. Las ventajas y desventajas de cada uno de ellos se resumen en la tabla No. 4 ⁶⁴.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos utilizados en la determinación indirecta del grado de unión a proteínas^{20, 66}

METODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
DIALISIS AL EQUILIBRIO	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Considerada como un método estándar. ▪ Temperatura controlada. ▪ Aparato de diálisis comercialmente disponible. ▪ Técnica ampliamente utilizada. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tiempo para alcanzar el equilibrio. ▪ Degradación de proteínas de unión inestables. ▪ Posible unión del fármaco a los componentes celulares. ▪ Dilución de las proteínas plasmáticas. ▪ Volumen de Shift. ▪ Uso de buffers y cambio de pH.
ULTRAFILTRACION	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utiliza pequeña cantidad de muestra ▪ Técnica simple, rápida (menos de 30 min) y barata. ▪ Kits Comercialmente disponibles ▪ Ampliamente utilizada en la práctica clínica. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Escaso volumen del ultrafiltrado. ▪ Posible unión del fármaco al filtro o al Eppendor. ▪ Temperatura no controlada. ▪ La constante de asociación del fármaco a la proteína puede cambiar cuando esta se concentra. ▪ No necesita buffers.
MICRODIALISIS	Determinación "in vivo"	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La sonda de microdiálisis permanece durante toda la experiencia. ▪ Escaso volumen del dializado
MICROSFERAS DE ALBÚMINA	Técnica simple y barata	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Temperatura no controlada ▪ Unión limitada a la albúmina ▪ Poca relevancia fisiológica

2.4.3. ULTRAFILTRACIÓN

La ultrafiltración fue introducida al mismo tiempo que la diálisis al equilibrio ⁶⁵; pero, la aplicación rutinaria de la técnica fue posible hace poco gracias al mejoramiento del equipo y las membranas.

La separación física de fármaco libre y del fármaco unido se lleva a cabo al colocar plasma añadido del fármaco en estudio en una unidad de ultracentrifugación, que consta de dos compartimentos separados por una membrana semipermeable(ver fig 5) Está membrana

permitirá el paso del agua plasmática y de sustancias de bajo peso molecular, mientras las moléculas de gran tamaño, como las proteínas, quedarán retenidas, la filtración es asistida por una presión positiva generada por centrifugación. La principal ventaja de la Ultrafiltración es la rapidez (aprox. 30 min) el cual es un criterio importante en situaciones de monitoreo clínico y para fármacos inestables. Al igual que en la diálisis al equilibrio las propiedades de la membrana y el volumen son importantes. La adsorción de fármacos en la membrana es problemática a bajas concentraciones, especialmente para los fármacos lipofílicos.

Teóricamente, la concentración del fármaco libre es constante en el ultrafiltrado y el retenido, sin embargo una disminución en la concentración de fármaco libre en el retenido induce la disociación del fármaco unido. Para evitar este problema se recomienda que el ultrafiltrado no exceda del 40% del volumen inicial.

Otra ventaja de la ultracentrifugación es que las moléculas pequeñas, por lo regular pasan libremente a través de la membrana de ultrafiltración, por lo que su concentración debe ser la misma en ambos lados de la membrana durante el proceso e igual en la solución original. De esta manera se deben producir cambios mínimos en el microambiente (p. Ej. pH, fuerza iónica) durante la filtración⁶⁶.

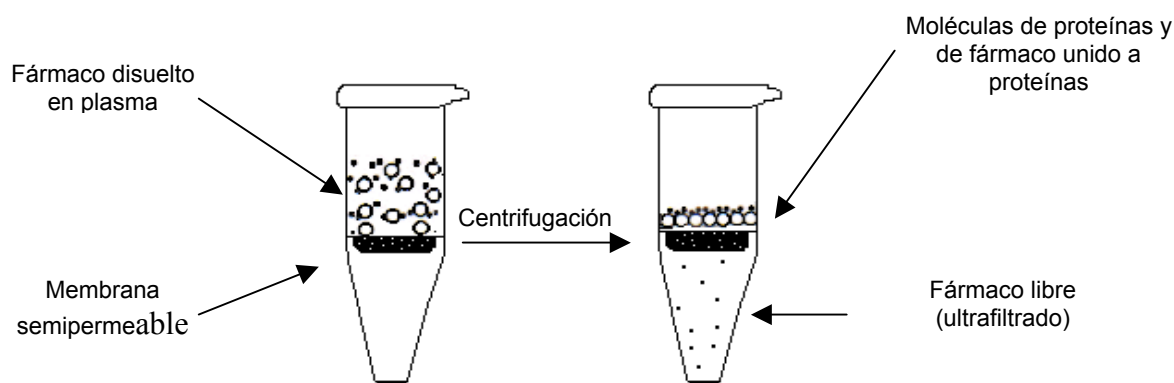


Figura 5. Descripción esquemática de la ultrafiltración. Las moléculas de fármaco (●) no unidas a las proteínas (○) y el agua plasmática pueden pasar a través de un filtro semipermeable, mientras que las moléculas unidas a las proteínas permanecen en el filtro.

En la actualidad hay una gran variedad de técnicas disponibles para la cuantificación de fármacos, incluyendo la cromatografía de líquido de alta resolución (CLAR), la cromatografía de gases, espectrofotometría, fluorometría, inmunoanálisis y métodos radioisotópicos. La elección de alguna de estas técnicas depende de las características fisicoquímicas del fármaco, de la

concentración a medir, de la naturaleza y cantidad del material biológico suero u orina, la disponibilidad de los instrumentos, del costo del ensayo, etc.

2.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DEL ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos es una de las herramientas preferidas sobre otras técnicas por su alta especificidad, sensibilidad, su confiabilidad, la excelente separación de los componentes individuales derivados de una mezcla, etc ⁶⁷.

La CLAR permite identificar, separar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos, con un límite de detección del orden de nanomoles.

2.5.1 PRINCIPIO DE LA CLAR

La separación de los componentes de una mezcla se realiza en base a su masa (cromatografía de gel), su carga (cromatografía de intercambio iónico) o por su capacidad de unirse a otras moléculas (cromatografía de afinidad)⁶⁸. En la cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR) un soluto orgánico o inorgánico se reparte entre una fase móvil líquida y un líquido orgánico adsorbido o enlazado a un soporte. Las dos fases mutuamente inmiscibles entran en contacto, la mezcla de la muestra que se pone en contacto con la fase móvil, produce una serie de interacciones (particiones) repetitivas entre la fase estacionaria y la fase móvil a medida que se desplaza por el sistema arrastrada por dicha fase móvil. Las interacciones se basan en las diferentes propiedades físicas de los componentes de la muestra, estas interacciones determinan la velocidad de migración de cada componente, bajo la influencia de una fase móvil que se desplaza a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retenido es el primero en salir y el material más fuertemente retenido es el último. La CLAR puede dividirse en dos tipos: Fase normal y fase reversa. La fase normal usa una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, mientras que la fase reversa se basa en una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar.

2.5.2 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR

El éxito de CLAR en el desarrollo de un método analítico, depende de la elección correcta de las condiciones de operación: El tipo empaque de la columna, (así como su longitud y diámetro), la fase móvil, (su velocidad de flujo, temperatura de separación), tamaño de la muestra, etc. Para ello, es necesario contar por lo menos con las características de solubilidad del analito, sin embargo entre más conozcamos la molécula más fácil será decidir el mejor

método para su análisis. La estructura química, el peso molecular, el pKa, el comportamiento redox, un análisis preliminar por otras técnicas (espectro Uv-Vis o IR), la naturaleza del análisis, la estabilidad del fármaco, etc; es parte de la información que será de gran utilidad^{69,70}. La selección del sistema cromatográfico líquido adecuado para cierta mezcla de solutos no puede hacerse con absoluta seguridad sin recurrir a pruebas experimentales.

Uno de los principales problemas a los que se presenta el investigador al momento de desarrollar un método es la selección de la columna, la mayoría de las separaciones que se hacen actualmente usan cromatografía de fase reversa y fases de C8 y C18, ya que con ella se obtienen la separación deseada en la mayoría de los casos.

Otro parámetro importante es la dimensión de la columna y el diámetro de las partículas del empaque. El tamaño de partícula más popular es de 5 μm dp, pero las partículas de 3 y 3.5 μm se utilizan ampliamente. Columnas con tamaño de partículas pequeñas generan un alto número de platos teóricos y alta presión. El solvente orgánico juega un papel importante en el control de la selectividad en las separaciones de fase reversa. La cromatografía de fase reversa nos permite seleccionar Metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) y tetrahidrofurano (THF), cada uno de ellos tiene sus ventajas⁷¹.

Si la muestra es un compuesto neutral, de preferencia se debe utilizar agua como fase acuosa, sin embargo en el análisis farmacéutico y muchas otras aplicaciones encontramos frecuentemente compuestos iónicos. Estos compuestos requieren que se mantenga controlado el pH para obtener métodos reproducibles, si se mantiene completamente protonado o completamente ionizados se obtendrán mejores resultados, por lo tanto el pH de la fase móvil debe ser al menos 1.5 unidades abajo o arriba del pKa.

Otros factores que se deben de considerar antes de iniciar el desarrollo del nuevo método, es el control de la temperatura, pues puede afectar la selectividad. Algunas veces es necesario algún reactivo de par iónico o trietilamina.

Tabla 5. Condiciones iniciales para el desarrollo del método por cromatografía de líquidos de fase reversa

<i>Separación variable</i>	<i>Selección inicial preferida</i>
Columna	
Dimensiones	150 x 4.6 mm
Tamaño de partícula	5 μ m
Fase estacionaria	De silica gel químicamente unida ODS (C8 y C18)
Fase Móvil	
Solventes A-B	Agua- Modificador (MeOH, ACN, THF)
% de solvente	Variable
Buffer	Fosfato 25 mM (pH 2.5), ácido trifluoroacético o fórmico al 1%
Aditivos tales como reactivos par iónico y aminas	
Velocidad de flujo	1 o 2 mL por min
Volumen de inyección	
Temperatura	35 ° C

2.5.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Una vez que se ha obtenido exitosamente un sistema, se tiene un método preliminar el cual debe ser optimizado con el objetivo de mejorar al máximo la separación cromatográfica.

En el proceso de optimización los parámetros cromatográficos a ajustar son: la resolución (R), el factor de capacidad (K'), el número de platos teóricos (N) y el factor de selectividad (α)

La resolución (R) Es el parámetro que expresa el grado de separación de los componentes de una mezcla, para lograr una buena R los picos deben alejarse tanto como sea posible y sus anchos de base deben ser pequeños.

Un valor de 0.7 indica que los picos están solapados y cuando el valor es igual o mayor a 1.5, significa que los picos están bien delimitados por lo que tendrá una buena resolución.

El factor de capacidad (K') relaciona volúmenes o tiempos de retención de un componente respecto a la fase móvil. Es el cociente entre las probabilidades de encontrar una molécula determinada de soluto en la fase estacionaria o en la fase móvil, o lo que es lo mismo, el tiempo de permanencia de dicha molécula en la fase estacionaria y en la fase móvil. El K' es modificado al ajustar la fuerza de la fase móvil. El factor de retención proporciona información al analista acerca de la calidad de la separación.

El número de platos teóricos (N). Es una característica importante de la columna, pues define la capacidad de la columna para producir picos anchos o angostos en otras palabras mide la capacidad de la columna para separar los componentes. Entre más angosto sea el pico, mayor será la eficacia de la columna y por lo tanto mayor el número de platos teóricos⁷².

Factor de selectividad (α). Esta depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes, fase móvil, columna, de la afinidad de la muestra y el modo en que interaccionan entre si. Dicho de otro modo la variación de la resolución deberá ser provista de una modificación más o menos profunda en uno de sus componentes fundamentales del sistema cromatográfico, columna o fase móvil⁷³.

2.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Al final el método analítico debe ser validado, para demostrar que este cumple con el propósito para el cual fue diseñado, para garantizar el contenido de los analitos en las muestras y cumplir con los requerimientos de cualquier agencia regulatoria, ya sea de la USP (United States Pharmacopeia), la FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos), la FDA (Food and Drug Administration), ICH (Internacional Conference on Harmonization) o la ISO (Internacional Standar Organization) ⁷⁴. De acuerdo a las organizaciones antes mencionadas, la validación de un método analítico debe cumplir con los parámetros de: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad) y especificidad, los cuales son generados a partir del análisis estadístico (o la comparación de los parámetros con un límite estadístico que ya existe) de los resultados generados durante la validación.

Cuando un fármaco se encuentra en las etapas de su desarrollo no es necesario realizar todas las pruebas que comprenden la validación. Muchos investigadores se concentran en realizar las pruebas de: especificidad, de linealidad, de exactitud y precisión en la etapa preclínica. Los estudios restantes se realizan cuando el fármaco alcanza la fase III, etapa en la cual el fármaco tiene una alta probabilidad de ser un producto comercial⁶⁹.

CAPITULO III.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Cas IIgly compuesto de coordinación, ha mostrado tener actividad antineoplásica en los ensayos exigidos dentro del panel del cernimiento sugerido por el Cancer Institute de los Estados Unidos de América en varios sistemas de prueba tanto *in vivo* como *in vitro*, incluso en líneas celulares resistentes al cisplatino. Por otro lado se ha demostrado que la Cas IIgly, es menos tóxica que el cisplatino hacia las células sanas ^{42,75}.

Esto hace a la Cas IIgly una fuerte candidata a ser utilizada como agente terapéutico en el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo antes de iniciar las pruebas clínicas en humanos las autoridades regulatorias (FDA), exigen realizar una serie de pruebas de laboratorio, en diferentes especies animales en las primeras etapas del desarrollo del fármaco^{76,77}, con la finalidad de demostrar que la nueva molécula es segura y eficaz.

Por lo mencionado anteriormente se justifica continuar con el estudio del grado de unión a las proteínas plasmáticas como prueba biofarmacéutica la cual permitirá conocer la concentración de fármaco libre que es uno de los factores que regula la distribución del fármaco en el organismo.

Debido a que la Cas IIgly es una molécula de reciente creación, hasta el momento no se cuenta con suficiente información ni métodos analíticos en fluido biológico que nos permitan su análisis, por lo tanto, es necesario el desarrollo, la optimización y la validación de una técnica adecuada para la cuantificación del fármaco y la aplicación de este en el estudio de el grado unión a proteínas plasmáticas

3.1.1 HIPOTESIS

Debido a que la Casiopeína IIgly es una molécula compleja que contiene un cromóforo en su estructura, con un peso molecular de 407.87 g/ mol y que es una molécula hidrófoba, se considera una buena opción la cromatografía de líquidos de fase reversa, empleando un detector UV para la cuantificación de esta molécula, por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad

Por otro lado se espera que la Cas IIgly se una en un alto grado a las proteínas plasmáticas debido a que presenta un volumen de distribución pequeño.

CAPITULO IV

OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 OBJETIVOS

- Determinar la solubilidad y estabilidad de la Casiopeína IIgly para llevar a cabo los estudios de unión a proteínas plasmáticas.
- Desarrollar, optimizar y validar el método analítico por CLAR para cuantificar la Casiopeína IIgly en albúmina, plasma humano, de rata y perro.
- Determinar el grado de unión a proteínas plasmáticas totales y albúmina de la Casiopeína IIgly, experimentando con diferentes concentraciones de fármaco, utilizando la técnica de Ultrafiltración.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL.

MATERIAL

Filtros Amicon Ultra - 4 PLGC los cuales contienen una membrana de baja unión de celulosa regenerada con un cut-off de 5, 000 MW.

4.2.1 EQUIPO.

Espectrofotómetro marca Agilent.

Desionizador Milli Q Water System, Millipore No. 01395 - C, Millipore Corporation.

Potenciometro Thermo Orion. Modelo: 410.

Sonicador Fisher Scientific FS60

Vortex Thermolyne, Mod M16715.

Centrifuga Refrigerada, Thermo IEC, modelo: Micromax RF.

Centrifuga Eppendorf. Mod.5416

Equipo para filtración de disolventes, Millipore

Congelador Lab-Line, Frigid-Cab. Cat No. 3552, temperatura – 20 °C.

El sistema cromatográfico utilizado, fue un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1100 de Agilent Technologies, que consta de una bomba cuaternaria (G1311A), un inyector automático (G1313 A), un desgasificador (G1322A) y un detector de arreglo de diodos (DAD) (G1315B). El control del instrumento, la adquisición y manejo de los datos se realizó con el software Chemstation. Para llevar a cabo la separación de los analitos se utilizó una columna de fase reversa la cual se protegió con una precolumna.

4.2.2 REACTIVOS

Casiopéina Hgly, proporcionada por la Dra. Lena Ruiz Azuara.

Metanol grado HPLC. Tecnolab.

Hexansulfonato de sodio. Grado HPLC. Regis Technologies, Inc.

Agua grado HPLC

Acetonitrilo grado HPLC. Tecnolab.

Tetrahidrofurano grado HPLC

Acido acético glacial grado reactivo. T.J Baker

EDTA. R.A. Técnica Química, S. A

4.2.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

Plasma humano donado por el Instituto Nacional de Cancerología.

Plasma de perro y rata, donado por la Unidad de Experimentación Animal.

Albúmina Bovina. Sigma Chemical Co.

4.2.4 SOLUCIONES.

Solución Stock de Casiopeína IIgly de 1000 µg/ml

Solución de Casiopeína IIgly de 100 µg/ml

Solución de albúmina, 45 mg/ml.

Solución de Tween 20 al 0.25 %.

4.3 PRUEBA DE SOLUBILIDAD

La prueba de solubilidad de la Casiopeína IIgly se realizó de acuerdo a la prueba de solubilidad, establecida en la FEUM ⁷⁸ ver tabla No 6. La muestra se agitó con un vortex durante 30 segundos a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos a una temperatura de 25 °C ⁷⁹.

Tabla 6. Determinación de la solubilidad de la molécula en diferentes disolventes orgánicos

Términos	Partes del disolvente en volumen requerida para una parte del soluto
Muy soluble	Menos de una parte
Soluble	De 1 a 10 partes
Poco Soluble	De 11 a 30 partes
Ligeramente Soluble	De 31 a 100 partes
Muy ligeramente soluble	De 101 a 1000 partes
Casi insoluble	Más de 1000 partes

4.4 ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Para determinar el espectro de absorción de la Casiopeína IIgly, se preparó una muestra (0.5 mg/mL) en una solución de metanol/agua 50:50 y posteriormente se hizo un barrido de 200 a 700 nm en un espectrofotómetro UV/Vis utilizando una celda de 1cm.

4.5 ESTUDIO DE ESTABILIDAD PRELIMINAR DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

Para la determinación de la estabilidad de la Cas IIgly, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento; se preparó por triplicado una muestra de Cas IIgly con una concentración de 5 µg/mL en

una solución de MeOH/H₂O 50:50. Después se midió la absorbancia inicial de cada muestra a una longitud de onda de 273 nm. Se fraccionó cada una de ellas en 3 porciones las cuales se almacenaron bajo distintas condiciones (refrigeración y protegidas de la luz, temperatura ambiente y expuesta a los rayos solares) durante un tiempo de acuerdo a lo establecido en el protocolo (1hr, 24 hrs, 3er día, 10 día, 15 día y 21 días). Una vez transcurrido el tiempo las muestras se reanalizaron bajo las mismas condiciones de operación utilizando una curva de referencia recientemente preparada.

Los resultados fueron analizados utilizando los métodos estadísticos apropiados. Uno de ellos es la obtención de intervalos de confianza que describen la diferencia de los resultados de cada una de las condiciones, respecto a los resultados iniciales, basados en la distribución “t” de Dunnett⁸⁰.

Criterio de aceptación.

- a) Su intervalo de confianza incluye el valor de cero.
- b) $d_i < 2\%$, para métodos cromatográficos.

4.6 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE LA CASIOPEÍNA IIgLY.

En el desarrollo del método analítico para identificación y cuantificación de la Cas IIgly en las diferentes matrices, se probaron diferentes tipos de columnas de fase reversa C8 y C18 de diferentes longitudes y tamaños de partícula. Se probaron diferentes fases móviles las cuales se prepararon con diferentes solventes orgánicos (metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano) y agua o algún buffer en diferentes proporciones y velocidades de flujo. Las longitudes de onda que se utilizaron fueron 254 nm (pico máximo de la Casiopeína IIgly) y 273 nm, y se hizo un barrido con el detector de arreglo de diodos. Dichos experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo la extracción de la muestra se probaron diferentes tipos de filtros, los cuales contenían un tipo diferente de membrana, con el fin de elegir aquel que tuviera una membrana en la que la Cas IIgly no se adhiriera o fuera mínima.

Una vez que se determinaron las condiciones cromatográficas y el método de extracción para la cuantificación del ultrafiltrado de la Cas IIgly se procedió a optimizar y validar el método de acuerdo a los métodos bioanalíticos en la guía de la FDA.

4.7 OPTIMIZACION DEL MÉTODO ANALÍTICO.

4.7.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.

Con el propósito de asegurarnos de que el cromatógrafo funcionaba apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales se midió su adecuabilidad. Para esto se preparó una

muestra de Casiopeína Iigly y se inyectó por quintuplicado a diferentes tiempos y finalmente se evaluaron los siguientes parámetros cromatográficos⁸¹:

- 1) Respuesta del analito. El Coeficiente de Variación (CV) debe ser menor de 2.0 %
- 2) Retención relativa (Rr)
- 3) Factor de coleo (T). El cual no debe ser mayor de 2
- 4) No. de platos teóricos (N).
- 5) Resolución. El cual debe ser mayor de 2

4.8 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO.

4.8.1 SELECTIVIDAD.

Para confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar únicamente a la Cas Iigly sin que exista interferencia de los componentes endógenos o exógenos se prepararon blancos de albúmina bovina, de plasma humano, de rata y de perro, y muestras Cas Iigly, Busulfan, 5-fluorocilo, taxol o cisdiaminodicloroplatino, las cuales fueron aforadas con alguna de la matrices y analizadas de acuerdo al método analítico⁸².

4.8.2 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Para asegurarnos de que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración de la Cas Iigly dentro de un intervalo determinado, se preparó por triplicado 1 curva de calibración utilizando 6 diluciones, preparadas de manera independiente en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 µg/mL y se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de operación. La linealidad del sistema se probó 2 días.

Criterios de aceptación:

- a) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple, debe ser mayor a 0.99.
- b) El intervalo de confianza de la pendiente (IC) (β_1). No debe incluir el cero ⁸⁰.

4.8.2.1 TRATAMIENTO DE CARTUCHOS DE ULTRAFILTRACIÓN AMICON Y PUNTAS DE MICROPIPETAS CON TWEEN 20 AL 0.25%.

El presente tratamiento se realizó con la finalidad de evitar que la Cas IIGly se absorbiera a la membrana del filtro de ultrafiltración.

Se colocó 1 ml de la solución de tween 20 en los filtros Amicon (Cut off 5000) y se centrifugó durante 15 minutos a 5,000 rpm, posteriormente se desechó la solución y se repitió esta operación tres veces más. Las puntas se dejaron remojando en esta solución por lo menos durante 10 minutos. Finalmente se desechó la solución.

4.8.3 PRECISION DEL SISTEMA (repetibilidad).

El grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos dentro de una serie de mediciones efectuadas en una misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación (mismo analista, mismo día, mismo laboratorio etc) se determinó utilizando los datos de la linealidad, calculando el CV para cada nivel de concentración.

Criterio de aceptación: $CV \leq 1.5\%$

4.8.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se determinó al analizar 3 muestras (40, 20 y 4 μ g/mL) preparadas por quintuplicado de Cas IIgly en agua. De acuerdo a la NOM -177⁸³, la concentración de dichas muestras debe de estar dentro de la curva, pero, deben ser diferentes a los puntos que conforman la curva. Después se colocó 1 mL de cada una de las muestras en un tubo de ultracentrifugación Amicon, el cual fue previamente acondicionado con tween 20. Posteriormente se centrifugaron durante 30 min a 5,000 rpm y finalmente el filtrado se colocó en un vial ámbar y se realizó el análisis en el cromatógrafo.

Se comparó la cantidad de fármaco que se obtuvo de una curva preparada con muestras filtradas con una sin filtrar con la finalidad de conocer la cantidad de fármaco que se pega al filtro y a la membrana de este.

Criterios de aceptación.

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m \approx 1$, $B \approx 0$, y $r^2 \geq 0.98$.

4.8.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO.

4.8.5.1 REPETIBILIDAD.

Para determinar la variabilidad en un mismo día se analizaron las muestras utilizadas para la linealidad del método.

Criterio de aceptación: El CV no debe ser mayor del 15%⁸³.

4.8.5.2 REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO.

Para determinar la variabilidad en diferentes días se analizaron una vez al día 15 muestras durante dos días diferentes.

Criterio de aceptación.

El C.V no de ser mayor del 15%.

4.8.6 EXACTITUD.

La concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor considerado como verdadero, se expresa como el porcentaje de recobro obtenido al analizar las muestras a las que se les adicionó cantidades conocidas del analito. Para el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, mediante la preparación de muestras con diferentes concentraciones de Casiopeína IIgly Simultáneamente, se analizaron la linealidad del método y el intervalo. El análisis se realizó por triplicado.

Criterio de aceptación: El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro 15% del valor nominal de concentración ⁸³.

4.8.7 ESTABILIDAD

La conservación de las muestras es un factor crítico en la evaluación del método, pues es frecuente que en una corrida en la que se analizan varias muestras haya algún tipo de retraso o que el análisis de realice durante toda la noche. Se considera que no existen problemas si los resultados obtenidos en esta prueba, en los diferentes tiempos de análisis, no difieren de los obtenidos con las muestras analizadas inmediatamente en más de un 20% o el intervalo de confianza incluye el valor de cero. En esta prueba se examinó durante 24 hrs una muestra de Cas II gly la cual permaneció en el automuestreador durante dicho período ⁸⁰.

4.8.8 LIMITE DE DETECCIÓN (LOD).

Para conocer la concentración mínima que proporciona una señal detectable, se cuantificó el nivel del ruido del sistema cromatográfico y se multiplicó por 3.

4.8.9 LIMITE DE CUANTIFICACION (LOQ).

Es la concentración mínima en la cual el método analítico es lo suficientemente preciso y exacto para dar un estimado satisfactorio de una muestra desconocida. El LOQ se define como la concentración más baja que esta incluida en la curva de calibración.

Criterio de aceptación: El valor promedio debe caer dentro del + 20% del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor del 20%.

4.9 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE UNIÓN A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE LA CASIOPEÍNA IIgly, POR EL MÉTODO DE ULTRAFILTRACIÓN.

4.9.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN: ALBÚMINA, PLASMA HUMANO, PLASMA DE PERRO Y DE RATA.

ALBUMINA

Durante el análisis del grado de unión a proteínas de la Casiopeína IIgly a albúmina, fue preparada una solución de albúmina de 45 mg/mL, concentración equivalente a la que se encuentra en el organismo humano. Por triplicado se prepararon muestras de Cas IIgly cuya concentración final fue de 50, 25 y 15 µg/ml las cuales fueron aforadas con la solución de albúmina

PLASMA DE DIFERENTES ESPECIES.

En primer lugar se realizó, la filtración de cada uno de los tipos de plasma con el objeto de limpiarlo lo más posible. Por otro lado en un matraz se colocó la cantidad adecuada de Cas IIgly para obtener las concentraciones requeridas (15, 25 y 50 µg/ml) y finalmente se aforaron con el plasma.

Se seleccionaron las concentraciones de 15, 25 y 50 µg/ml porque el método es sensible en este intervalo.

4.9.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez preparadas las muestras de la Cas IIgly, en albúmina o plasma, se agitaron con un vortex durante 10 segundos y se incubaron a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente se colocó 1 mL de cada muestra en los filtros de ultracentrifugación Amicon los cuales fueron previamente tratados con tween 20, al 0.25 % y se centrifugaron a 5,000 rpm durante 30 minutos a 37°C⁸⁴ Fig 6.

Finalmente se inyectaron 50 µL del ultrafiltrado en la columna de fase reversa, el cual fue monitoreado a una longitud de 273 nm. La corrida se llevó a cabo con una fase móvil isocrática a una velocidad de flujo de 1 mL /min.

Por otro lado se preparó una curva patrón en agua, la cual se corrió bajo las mismas condiciones cromatográficas.

La fracción libre del fármaco (F_L) se calculó con la siguiente fórmula:

$$(F_L) = \frac{Cl}{Cl + Cu}$$

Donde:

Cl = Concentración de fármaco libre.

Cu = Concentración de fármaco unido

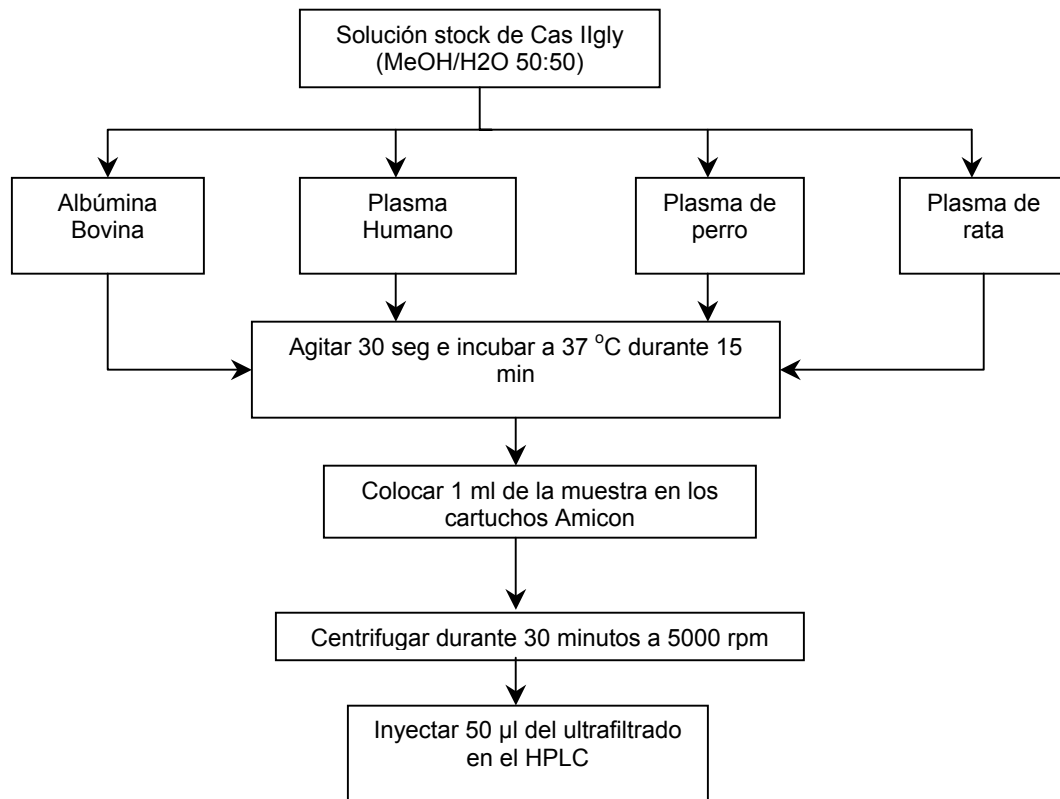


Figura 6. Diagrama de flujo del tratamiento de las muestras de albúmina, plasma humano, de perro y de rata.

CAPITULO V

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 SOLUBILIDAD DE LA CASIOPEINA II.

Tabla 7. Resultados de solubilidad de la Cas IIgly en los diferentes disolventes orgánicos

	MeOH	EtOH	MeOH/Agua (50:50)	Agua	Sol. Amortiguadora de fosfatos	ACN	THF
Muy soluble	x	x	x				
Soluble				x			
Poco Soluble							
Ligeramente soluble					x		
Muy ligeramente soluble							
Casi insoluble						x	x

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla No. 7. la Cas IIgly es una molécula fácilmente soluble en metanol y agua, ligeramente soluble en una solución de fosfatos y casi insoluble en ACN y THF.

5.2 ESPECTRO DE ABSORCIÓN.

El espectro de absorción ultravioleta/ visible de la Casiopeína IIgly (0.5 mg/mL) en solución de metanol/agua 50:50 mostró dos picos máximos uno a 209 y el otro 273 nm y un pico mínimo a 248 nm Ver fig. No 7.

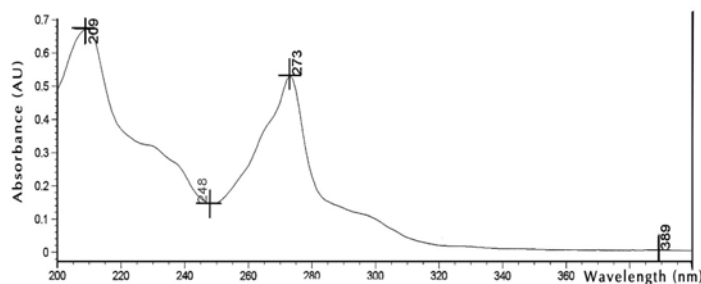


Figura 7. Espectro de adsorción de las Cas IIgly en metanol / agua (50:50) a temperatura ambiente.

5.3 ESTABILIDAD.

En la tabla 8 se presentan los resultados en los que se evaluó la estabilidad de la Casiopeína IIgly preparada en una solución de metanol/agua 50:50 bajo diferentes condiciones. Los límites de confianza de la muestra que se encuentra en condiciones de refrigeración y oscuridad incluyen al cero, esto significa, que la Casiopeína IIgly es estable únicamente bajo estas condiciones.

Tabla 8. Resultados de absorción de la Cas IIgly en condiciones de refrigeración, ambiente y expuestas a la luz.*LSC Límite superior de Confianza, **LIC Límite inferior de confianza

Condición /Tiempo		1er	24 horas	Día 3	Día 10	Día 15	Día 21
Refrigeración	LSC*	0.255	1.058	5.713	6.424	2.569	4.722
	LIC**	-3.864	-6.069	-6.908	-3.319	-5.401	-10.011
Ambiente	LSC.	-3.202	-3.715	-0.372	—	—	—
	LIC	-6.286	-6.632	-7.915	—	—	—
Luz	LSC.	-14.220	-21.652	—	—	—	—
	LIC	-29.933	-21.652	—	—	—	—

Por el contrario en la fig No. 8, se observa claramente un cambio drástico en la absorbancia de la muestra que se expuso a la luz, desde la primera hora de su análisis lo que significa que la Cas IIgly es una molécula fotosensible.

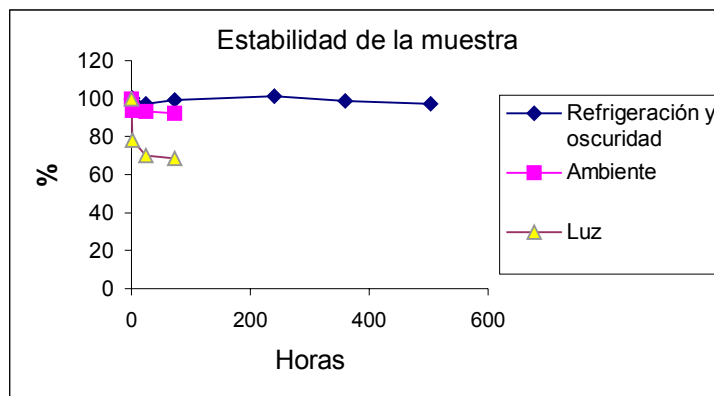


Figura 8. Estabilidad de la muestra en una solución de metanol agua 50:50.

5.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Durante el desarrollo del método cromatográfico se probaron varias fases móviles las cuales fueron preparadas con diferentes solventes orgánicos a diferentes proporciones con diferentes tipos de columnas a diferentes velocidades de flujo y volúmenes de inyección (ver tabla No 9).

Tabla 9. Condiciones cromatográficas probadas durante el desarrollo del método analítico para la cuantificación de la Cas IIgly por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Fase móvil	Longitud de onda	Vol de inyección	Columna	Velocidad de flujo	t _r	Comentarios
MeOH/H ₂ O 50:50 80:20 60:40 20:80	273 y 209 nm	100 µl	C18 symetry 250 x 4 mm waters	0.8 mL 0.9	No detectado	
ACN/H ₂ O (50:50)	273 y 254 nm	100, 50, 15 µl	C18 symetry 250 x 4 mm waters	0.8 mL	No detectado	
MeOH/PO ₄ 40:60 60:40	273 y 254 nm	100, 50, 15 µl	C18 symetry 250 x 4 mm waters	Diferentes	No detectado	
MeOH/H ₂ O 58:42, pH 4.0	273 y 254 nm	100 y 50 µl	C18 symetry 250 x 4 mm waters	0.7 ml	8.6	Pico con hombros
MeOH/H ₂ O/ACN	273 y 254 nm	100, 50, 15 µl	C18 symetry 250 x 4 mm waters	Diferentes		Cortos Tr

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Diferentes pH's ácidos						
MeOH/H ₂ O/ACN 72.5:24:3.5, pH 3.0	273 y 254 nm	15 µl	Econosphere NH ₂ 5 µl, 150 x 4.6 mm	0.7 mL	4 minutos	Hombro ligero
MeOH/H ₂ O/ACN (70:26.5: 3.5) pH 3.0	273 y 254 nm	100	Zorbax SB C18 4-6 x 250 mm, 5	1 mL	2.1	Pico muy coleado
MeOH/H ₂ O/Hexansulfonato de sodio 5 µm 72:25:3, pH 3.0	273 y 254 nm	15 µl	Zorbax SB C18, 250 mm	1 mL	2.554	Tr corto
MeOH/H ₂ O/Hexansulfonato de sodio 5 µm 72:25:3, pH 3.0	273 y 254 nm	15, 50 y 100	C18 symetry 250 x 4 mm waters	15, 50	2.6	Pico retenido
MeOH/Hexansulfonato 0.008 M Diferentes proporciones	273 y 254 nm	15	Nucleosil NH ₂	0.7	1.7 minutos	Pico coleado
MeOH/Hexansulfonato de sodio 0.003 M (50:50)	254 nm	50	Termo Hypersil	1 mL	2.3	Pico chato
MeOH/H ₂ O pH 3.0 25:75	273 y 254 nm	50	Grom sil Amino	0.7 mL	2.095	Pico perfecto
Hexansulfonato de sodio)/(metanol) 45:55 pH 3.35	273 y 254 nm	100, 50, 15 µl	Phenomenex Luna 5µ C18 (2) 100 A de 250 x 4.6 mm	1, 1.5 mL	7	Pico retenido

al estar en plasma. En los 5.4.1 OPTIMIZACION DEL METODO ANALITICO

Los mejores parámetros cromatográficos se obtuvieron con las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna: Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 100 A de 250 x 4.6 mm, protegida por una precolumna Phenomenex de 4 x 2 mm.

Fase móvil: (EDTA / Hexansulfonato de sodio)/(metanol) 45:55 pH 3.35

Velocidad e flujo: 1 ml/min.

Longitud de Onda: 273 nm.

Volumen de Inyección: 50 μ l.

Con esta concentración de EDTA en la fase móvil la Casiopeína IIgly es retenida lo suficiente y se evita que el pico salga al mismo tiempo que algún pico del plasma. Por otro lado el tiempo de corrida no es muy largo. El control del pH en la fase acuosa de la fase móvil es importante, de lo contrario hay problemas de resolución de picos o de coleo.

5.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

5.5.1 ADECUABILIDAD

C.V < 2

Factor de coleo (T). = 1.013

No. de platos teóricos por metro (N). = 22622.

Resolución = 3.069

5.5.2 SELECTIVIDAD

En la figura 9 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar los blancos de agua, los blancos de plasma, albúmina y fase móvil, así como las muestras añadidas con Cas IIgly y otros fármacos, en ellos se observa que las impurezas o sustancias endógenas de la albúmina bovina cuyo tr =1.9 min o de alguno de los blancos no interfieren con la determinación de la Casiopeína IIgly, la cual mostró un tr de 6.8 minutos al encontrarse en agua y de 8.0 minutos al estar en plasma. En los cromatogramas generados en el análisis de Busulfan, 5-fluorocilo, taxol o cisdiaminodicloroplatino se observó un pico hombreado con Tr de 2.0. Finalmente esto significa que el método no interfiere en la determinación de la Cas IIgly. La resolución entre los picos presentes en cualquiera de las matrices y nuestro pico de interés es mayor de 2.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

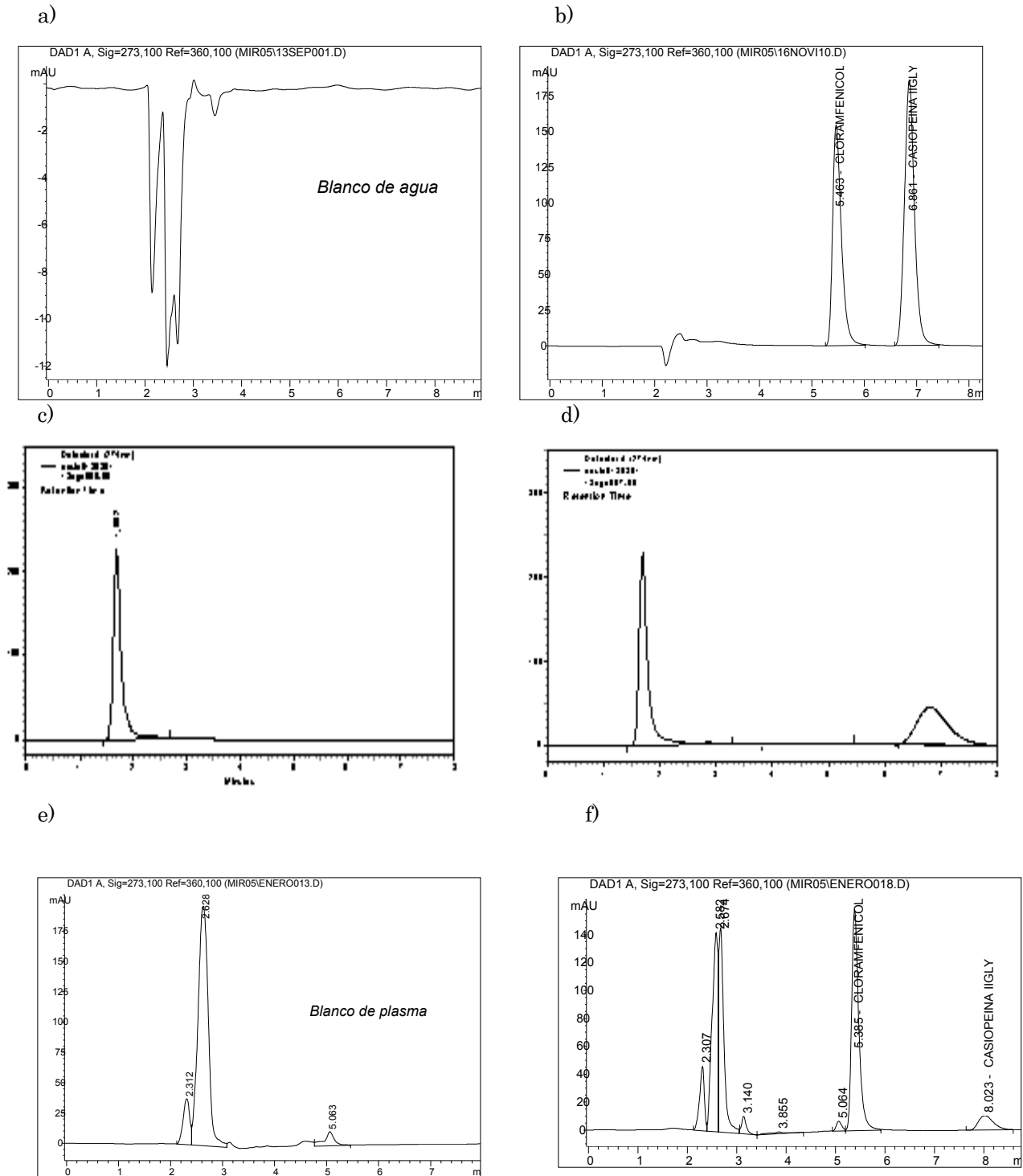


Figura 9. Selectividad del método analítico para la cuantificación de la Cas Igly. a) En el Blanco de agua solo se observa un pequeño pico negativo entre los 2 y 3 minutos b) Agua + Cloranfenicol ($t_r=5.4$ min)+ Cas Igly ($T_r = 6.8$). c) El blanco de albúmina bovina muestra un pico entre el minuto 1.5 y 2.2 . d) al agregar Cas Igly a una solución de albúmina bovina, se observa un pico a los 6.8 minutos en el cual no se encontró ningún otro pico. e) En el blanco de plasma humano se observan 3 picos el primero a los 2.3, el 2do a los 2.6 y el 3ero a los 5.063 minutos d) Al agregar una muestra de Cas Igly al plasma se observan 2 picos adicionales a los 5.3 y 8.023 min, los cuales no se enciman con los picos del plasma.

5.5.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema fue evaluada al analizar las 3 curvas preparadas en soluciones acuosas de Casiopeína Hgly en el rango lineal de 2 a 50 µg/mL, obteniéndose un coeficiente de correlación promedio de 0.9992. La ecuación de la regresión lineal obtenida mediante un análisis de regresión por mínimos cuadrados fue: $y = 99.904X - 130.85$ y el intervalo de confianza se encuentra entre: 98.2773 y 101.53. Ver figura 10.

Dado que el coeficiente de correlación es mayor de 0.99 y que el intervalo de confianza no incluye el cero se considera un sistema lineal en el intervalo de concentraciones de 2 a 50 µg/mL.

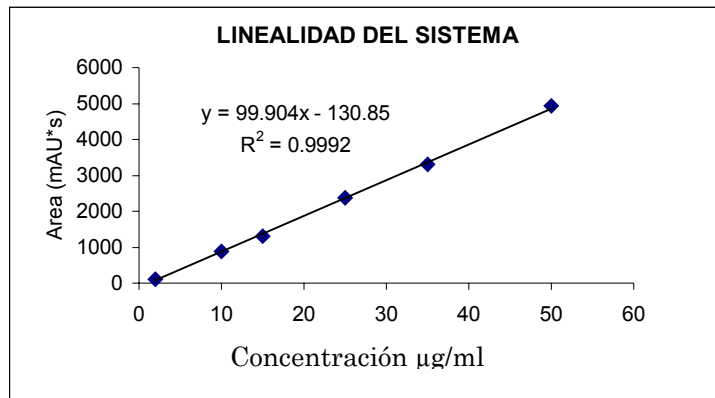


Figura 10. Linealidad del sistema para la cuantificación de Cas Hgly en plasma.

5.5.4 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Los coeficientes de variación en por ciento obtenidos para cada nivel de concentración se presentan en la tabla No. 10, donde se observa que el valor más alto obtenido es 1.4 %. Por lo que se considera un sistema preciso ya que el límite es de 2%.

Tabla 10. Resultados de Precisión del sistema

Conc. (µg/ml)	Área Prom. N= 3	%CV
2	119.3	0.9
10	876.3	1.3
15	1317.5	1.2
25	2365.2	1.4
35	3302.8	1.1
50	4920.6	0.5

5.5.5. LINEALIDAD DE MÉTODO.

En la tabla No. 11, se muestran los resultados de linealidad del método analítico, obtenidos de las 3 curvas de calibración trabajadas con 6 puntos. En esta figura se observa una r^2 de 0.998, este resultado es aceptable.

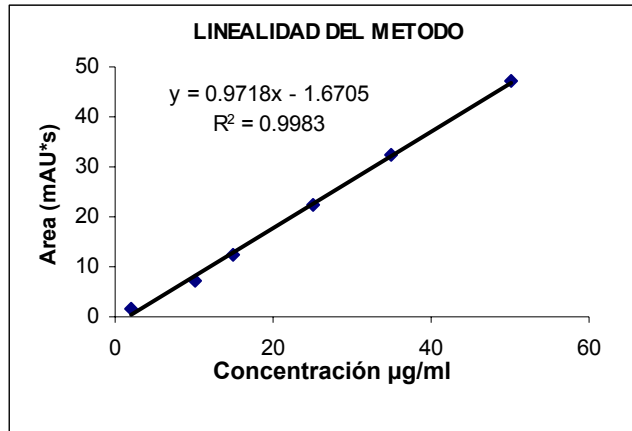


Figura 11. Linealidad del Método la cuantificación de Cas Hgly en plasma

Tabla 11. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de la Cas Hgly.

Conc. en ug/ml	% RECUPERADO					Prom.	Desvest	%C.V
	Mta 1	Mta 2	Mta 3	Mta 4	Mta 5			
4	87.20	87.49	83.83	85.46	86.32	86.06	1.4	1.7
20	89.19	89.17	92.14	91.38	92.13	90.80	1.5	1.6
40	98.89	99.54	98.34	98.34	98.00	98.62	0.6	0.6

5.5.6 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD) DEL MÉTODO Y PORCENTAJE DE RECOBRO

La evaluación de estos parámetros, así como el de la exactitud, se realizó utilizando los resultados obtenidos de las muestras control (Tabla 11), en la cual se observa que % CV es menor a 15% lo que implica que el método es preciso. Al interpolar los datos de las muestras control en las curvas del sistema Vs las curvas del método, se obtiene un porcentaje de 98.6 a 86.06, obteniéndose un promedio de 91.83 %.

5.5.6.1 REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del método analítico fue evaluada durante dos días diferentes por un mismo analista (Ver tabla No. 12). El método analítico se considera reproducible, dado que el CV no fue mayor del 10% al comparar los resultados de ambos días en el rango de

concentraciones estudiado. Lo que llama la atención es que el CV es más alto en la muestra de mayor concentración en el día 2.

Tabla 12. Reproducibilidad intralaboratorio del método analítico de la Cas Igly.

	Conc. en µg/ml	% RECUPERADO					Prom.	Desvest	%C.V
		Mta 1	Mta 2	Mta 3	Mta 4	Mta 5			
Dia 1	4	87.20	87.49	83.83	85.46	86.32	86.06	1.4	1.7
	20	89.19	89.17	92.14	91.38	92.13	90.80	1.5	1.6
	40	98.89	99.54	98.34	98.34	98.00	98.62	0.6	0.6
Dia 2	4	87.38	87.04	86.83	88.08	88.01	87.47	0.5	0.6
	20	87.41	87.98	85.84	88.36	88.18	87.55	0.7	0.9
	40	92.27	94.24	90.17	93.24	93.14	92.61	1.5	1.6

5.5.7 EXACTITUD.

De acuerdo al criterio de aceptación de la sección 4.8.6, el valor promedio de cada nivel de concentración se encuentra dentro de los límites de aceptación que se muestran en la tabla No. 13.

Tabla 13. Exactitud del método analítico para la cuantificación de la Cas Igly.

Conc. en ug/ml	RESULTADOS EN µg/ml					Prom.	%DEA
	Mta 1	Mta 2	Mta 3	Mta 4	Mta 5		
4	3.96	3.98	3.93	3.93	3.92	3.94	0.014
20	17.44	17.50	16.77	17.09	17.26	17.21	0.139
40	35.68	35.67	36.86	36.55	36.85	36.32	0.092

Por lo tanto los resultados demuestran una exactitud y precisión aceptables del método de Cas Igly ya que el DEA es menor del 2%

5.5.8 ESTABILIDAD (Estudio de conservación de las muestras).

El intervalo de confianza contiene el cero, por lo tanto, de acuerdo a la prueba “t” de Dunnett, la muestra es estable durante el tiempo que duró el estudio. Ver tabla No. 14.

Tabla 14. Resultados de estabilidad de las muestras de Cas Igly que permanecieron dentro del inyector durante 8 hrs.

Tiempo de almacenamiento en el inyector (hrs)	LIC	LSC
2	-11.8688	20.5983
4	-10.6217	21.8454
6	-8.92404	23.543
8	-9.35359	23.1134
16	-8.36863	24.0984
24	-7.53028	24.9368

5.5.9 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).

El límite de cuantificación se basa en la concentración mínima cuantificable y validada, en este caso es la concentración más pequeña de la curva de calibración es decir de 2 µg/mL

5.5.10 LIMITE DE DETECCIÓN (LOD).

Este se basa en 3 veces el nivel del ruido que correspondió a una mabs de 0.106 que correspondería a una concentración de 0.031 mabs.

5.6 UNIÓN A PROTEÍNAS.

5.6.1 DETERMINACION DEL GRADO UNION A LA MEMBRANA Y AL FILTRO DE ULTRACENTRIFUGACIÓN.

El grado unión de las Cas IIgly a los filtros de ultrafiltración fue menor del 12 %, lo cual indica que el filtro no influyen la estimación de la fracción unida y por lo tanto el error es despreciable

El rango de concentraciones de trabajo fue seleccionado por su límite de cuantificación

De acuerdo a los resultados de la tabla No. 15 a), el del grado de unión de la Cas IIgly en la albúmina Sérica Bovina fue del 96.81 al 98.12 %, en el rango de concentración trabajado. No fue posible determinar la constante de afinidad ni el número de sitios de unión de la Cas IIgly, ya que no contamos con el número suficientes de datos, que nos den un resultado confiable.

El porcentaje de unión de la Casiopeína IIgly al plasma humano, de rata y perro es de 95.18, 88.68 y 72.78% respectivamente (Tabla 14. b, c y d). Lo que significa que el grado de unión a las proteínas plasmáticas es alto en humanos y ratas y por lo tanto tiene gran importancia clínica, ya que su distribución estará centrada en la circulación sanguínea actuando como un depósito del fármaco. En el caso del plasma de perro el grado de unión que se presenta es bajo, por lo que se considera poco probable que haya problemas de intoxicación, interacción, etc, debido a que el fármaco va a estar distribuido en circulación sanguínea y tejidos u órganos a los que pueda llegar el fármaco libre.

Tabla 15. Resultados del grado de unión de la cas IIgly a la albúmina bovina y a las proteínas plasmáticas humanas, de perro y rata. En diferentes concentraciones (n=3)

. a) MUESTRAS EN ALBUMINA				
Conc. de casiopeína IIgly µg/mL	Conc. de Fármaco libre µg/mL	Conc de Fármaco unido µg/mL	%de Fármaco unido	% C.V
15	0.28	14.72	98.12	0.05
25	1.15	23.85	95.41	0.26
50	1.59	48.41	96.81	0.52
PROMEDIO			96.78	
b) MUESTRAS EN PLASMA HUMANO				
15	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable
25	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable
50 (51.28)	2.47	48.81	95.18	1.5
PROMEDIO			95.18	
C). MUESTRAS EN PLASMA DE PERRO				
15	4.49	10.51	70.05	1.7
25	6.11	18.89	75.55	1.6
50	13.63	36.37	72.73	2.5
PROMEDIO			72.78	
d). MUESTRAS EN PLASMA DE RATA				
15	2.49	12.51	83.42	0.89
25	2.29	22.71	90.85	0.52
50	4.12	45.88	91.76	1.06
PROMEDIO			88.68	

En las concentraciones estudiadas el % de unión a proteínas fue constante en cada caso.

Los resultados de la albúmina son muy semejantes a los encontrados a las proteína totales de humano, lo que indica que la Cas IIgly se une en su mayor parte a la albúmina y solo en un pequeño porcentaje a otro tipo de proteínas plasmáticas.

Las diferencias observadas en el porciento de unión de la molécula a las proteínas plasmáticas entre las diferentes especies, muy probablemente se deben a que la constante de afinidad y el número de sitios de unión es diferente en cada una.

Para aquellos fármacos que tienen un alto grado de unión y una estrecha ventana terapéutica como es el caso la individualización del régimen de dosificación es muy importante, pues de esta manera se obtendrán concentraciones plasmáticas seguras, es decir que no excedan a la concentración mínima tóxica ni a la concentración mínima crítica, en donde el fármaco no es efectivo. Con la cuidadosa individualización del fármaco se podrá evitar la

fluctuación de las concentraciones causadas por la variación intersujeto en la absorción del fármaco, distribución o procesos de eliminación. Los pacientes con cáncer debido a la naturaleza dinámica de la enfermedad las concentraciones de la albúmina y la AAG pueden tener un grado de variabilidad, incluso dentro de un mismo sujeto de acuerdo al progreso de la enfermedad y al tratamiento que este recibiendo, por lo que se recomienda monitorear la concentración de fármaco libre durante su administración. Se ha observado que la concentración plasmática de la albúmina es 29 % más baja en pacientes con cáncer y la disminución es progresiva a medida que progresa la enfermedad, lo cual parece deberse a una disminución de la síntesis de la albúmina ⁶³. La reducción del tumor por cirugías o quimioterapias disminuye los niveles de AAG. La mayoría de los pacientes con cáncer están sometidos a una terapia polifármaco, esto significa que puede haber competencia entre 2 o más fármacos por el mismo sitio de acción ^{20, 67, 85}.

Para aquellos fármacos que muestran una farmacocinetica no lineal un pequeño cambio en la dosis puede causar un gran cambio en la respuesta terapéutica, que puede provocar efectos tóxico o incluso la muerte del paciente.

Los resultados del grado de unión a proteínas para cada una de las concentraciones estudiadas presentaron un CV menor del 3%, esto nos indica que el método de ultrafiltración es reproducible.

El conocimiento del número de sitios de acción, su constante de asociación y la determinación del tipo de unión que tiene la molécula, nos podrá permitir adecuar con mayor precisión la dosificación para cada paciente de acuerdo a su estado fisiológico y edad.

No debemos olvidar que los pacientes con cáncer debido a la naturaleza dinámica de la enfermedad las concentraciones de albúmina y AAG pueden tener un grado de variabilidad, incluso dentro de un mismo sujeto de acuerdo al progreso de la enfermedad y al tratamiento que esté recibiendo.

El conocimiento del número de sitios de unión de nuestra molécula, su constante de afinidad y determinar si la unión es reversible o irreversible, nos permitirá adecuar con mayor precisión la dosificación para cada paciente de acuerdo a su estado fisiológico y edad. Por lo que es necesario buscar un método de cuantificación de la molécula más sensible.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

La Casiopeína IIgly resulto ser un compuesto fotosensible, pero si se almacena en las condiciones adecuadas se mantiene estable.

El método cromatográfico para la cuantificación de la Casiopeína IIgly es selectivo, lineal, exacto, reproducible y repetible en el rango de 2- 50 µg/mL, es sensible y específico durante la ultrafiltración. El límite de cuantificación fue de 0.031 µg/mL y el de detección de 2 µg/mL. El porcentaje de extracción fue del 91.8. La Casiopeína IIgly presentó un Tr de aproximadamente 6.8 minutos. Las muestras del compuesto pueden ser detectadas a 254 o 273 nm, debido a que el método es tolerable a esas longitudes de onda.

De acuerdo a los resultados obtenidos que se determinaron por el método de ultrafiltración, la Casiopeína IIgly, es una molécula que se encuentra altamente unida a las proteínas plasmáticas humanas, principalmente a la albúmina.

Por ejemplo, se ha observado que la concentración plasmática de albúmina es 29 % más baja en pacientes con cáncer y la disminución es progresiva a medida que progresa la enfermedad, lo cual parece deberse a una disminución de la síntesis de la albúmina⁶³ y la reducción del tumor por cirugía o quimioterapia disminuye los niveles de AAG.

Por otro lado, sabemos que la mayoría de los pacientes están sometidos a una terapia polifármaco, esto significa que puede haber competencia de algún fármaco más, por el mismo sitio de unión^{20,66, 85}.

Por lo anteriormente descrito se recomienda monitorear la concentración de fármaco libre durante la administración del fármaco para evitar un efecto indeseable.

En el caso del plasma de perro el grado de unión que se presenta es bajo, por lo que se considera poco probable que haya problemas de intoxicación, interacción, etc.

El método de ultrafiltración utilizado para la determinación del grado de unión de la Casiopeína IIgly a las proteínas plasmáticas, es adecuado debido a su rapidez.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ 1997. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México: Epidemiología. Secretaria de Salud, México.
 - ² Klug WS y cols. 1996. Essential of genetics. Second edition. Prentice Hall. USA.
 - ³ Rodríguez A, Ruiz A, Gómez R, Macías R. 2004. Efecto de seis Casiopeínas de las familias I, II y III, sobre el ciclo celular en células Hela. 1er. Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer Pp 206- 209.
 - ⁴ Page, Curtis y col. 1998. Farmacología Integrada. Harcourt Brace. Madrid España.
 - ⁵ Balls, M; Riddell R, y Worden, A, N. 1983. Animals and Alternatives in toxicity Testing. Academic Press, London.
 - ⁶ Terán T. 1999. Objetivos de los centros Oncológicos en México. Cancerología, 45(1): 8-10.
 - ⁷ Ruíz R. 1992. Naturaleza Química y Clasificación de los Agentes Quimioterapéuticos. Cáncer y Quimioterapia. Pág. 13. Mem. Fac. de Química UNAM
 - ⁸ Baranda A, Pozas H y Quintero R. 2004. Evaluación de la actividad citotóxica de amidas α,β insaturadas derivadas de furano en líneas celulares tumorales. 1er. Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer. Pp 95- 97.
 - ⁹ Farrell N. 1996. Interactions of Metal Ions with Nucleotides, Nucleic Acids and their Constituents, vol. 32. Marcel Dekker, Basel, 603.
 - ¹⁰ Broomhead y col. 1993. Dinuclear complexes of platinum having anticancer properties. DNA- Binding studies and Biological activity of Bis (4,4'-dipirazol 4'methane-N,N')-bis [dichoro platinum II) and related complexes. J. Inorg. Biochem. 49: 221.
 - ¹¹ Rodríguez A Ruiz A, Gómez R, Macías R, Téllez A, Cortés B, Ortiz M, Gracia M. 2004. Evaluación por citometría de flujo, de la muerte celular inducida por Casiopeínas. 1er. Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer. Pp 106- 108.
 - ¹² Ruiz-Azuara L. 1993. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención, SECOFI no. 172248. Dic. 9.
 - ¹³ Ruiz-Azuara L. 1994. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención, SECOFI no. 172967. Enero 26.

-
- ¹⁴ Ruiz-Azuara L. 1997. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complex from phenylphenantroline to be used as anticancerigenic agents. U.S. patent, Ap21 (1992) Number 5, 107, 005. U.S. patent Re 35, 458, Feb 18.
- ¹⁵ Ruiz-Azuara L. 1996. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylate phenantroline complex to be used as anticancerigenic agents. U.S. Patent, Patent No. 5, 576, 326. Nov 19.
- ¹⁶ Ruiz-A, Gracia-M, De la Rosa, M.E, Sumano, H, Gómez, C, Arenas, F, Gómez, E, y Cruces, M. 1993. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of copper (II) new drugs: casiopeinas I, II, III. J. Inorg. Bioch. 406.
- ¹⁷ Pérez F. G, García-R, M.C. y Altamirano L. 2004. Estudio comparativo del daño genotóxico inducido por el cisplatino y por la casiopeína III-ia; en ratones machos, hembras, hembras preñadas y fetos de la cepa cd-1. 1er. Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer. Pp 88- 91.
- ¹⁸ William D. 2004. Handbook of anticancer pharmacokinetics and pharmacodynamics. Humana Press Inc. USA, Pp 11, 12 y 182.
- ¹⁹ Aïache, Devissaguet y Guyot. 1982. Biofarmacia. 2ª ed. Editorial Manual Moderno. Pp 36-39
- ²⁰ Doménech B. J. Biofarmacia y farmacocinética Vol II. Ed. Síntesis España 467-499.
- ²¹ Becker, Kleinsmith. 2000. The world of the cell. 4ª ed. USA. Pp 533-583.
- ²² Flores R y Obaya A. 1996. Carcinogénesis Química. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 6: 31-37.
- ²³ Carrillo A. 2001. Cáncer no es sinónimo de muerte. Ciencia y desarrollo. 158: 78-81.
- ²⁴ Doll R. y Peto. 1981. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risk of cancer in The United States today” J Natl. Cancer Inst. 66: 1193-1308.
- ²⁵ Webster K, Cavenee y Raymond L. 1995. Bases Genéticas del Cáncer. Investigación y ciencia. Mayo. Pp 44-51
- ²⁶ Lodish, Berk y col. 2002. Biología celular y molecular. 4ª ed. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires Argentina , Pp 1054-1082.
- ²⁷ Karp G y Smith. 1996. Farmacología. “Biología celular y molecular”. 2da ed. Mc Graw-Hill interamericana. México. Pp. 671-699.
- ²⁸Harvey R y Campe P. 1997. Pharmacology. 2da. Ed. Lippincott-Raven. Pp. 373-399.
- ²⁹ Smith Reynard. 1993. Farmacología. Ed. Panamericana. Buenos Aires Pp 887-901.

-
- ³⁰ Katzung. 1998. Farmacología Básica y Clínica. El Manual Moderno SA de CV . México Pp 1005-1012
- ³¹ Foye. W.O 1995. Cancer Chemotherapeutic Agents. ACS Professional reference book. USA pp 3, 4 y 121, 129.
- ³² O'Dwyer P.J; Jonson S.W and Hamilton T. C. 1997. Pharmacology of cancer chemotherapy: cisplatin and its analogues. In: Cancer, principles and practice of oncology, De Vita Jr.V.T; Hellman S. and Rosenberg S.S (Eds.) 5th ed.pp.418-509. Lippincot_raven. Philadelphia, USA.
- ³³ Hudges M. 1980. The inorganic Chemistry of Biological Processes.
- ³⁴ Ruíz A. L. Diseño Síntesis y Caracterización de las Casiopeínas. Resumen 1.
- ³⁵ Rosenberg G, Van Camp L, Truska J. 1969. Platinum compounds a new class of potent antitumor agents; Nature. 22, 26: 383-386.
- ³⁶ Prestayko A. 1980. Cis platin: Current status and new developments. Academic Press.
- ³⁷ Pratt W y Ruddon, R. 1979. The cancer problem: The anticancer drugs. Oxford university press. 3 – 11 New York.
- ³⁸ Ruiz-Ramírez L, de la Rosa M.E, Gracia I, Mendoza A, Pérez G, Ferrer-Sueta G, Breña M, Gutierrez P. 1995. Casiopeinas, Metal Based-Drugs a New Class of Antineoplastic and Genotoxic Compounds. J. of Inorganic Biochemistry, 59: (2-3) 206.
- ³⁹ Trejo Solís y col. 2004. Casiopeína -gIIy induce apoptosis sobre células de glioma C6 de rata *in vitro* e *in vivo* a través de mecanismos dependiente e independiente de caspasas.1ER. Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer. Pp 140.
- ⁴⁰ Hernández A. M 2002. Evaluación del efecto de las casiopeínas sobre el metabolismo energético en mitocondrias y células. 1er Congreso de casiopeínas Pp. 141-142
- ⁴¹ Ruíz A. L. 1993. Cytostatic, mutagenic, antineoplastic activities and preliminar toxicity of cooper (II) New drus: Casiopeínas I, II y III. Journal of Inorganic Biochemistry, 51: (1-2), 406.
- ⁴² Ruiz Ramírez L; Gracia de la mora y col. 1991. The antitumor activity of several transition metal Complexes. Journal of Inorganic Biochemistry, 43: 615.
- ⁴³ Fuentes N, Rodríguez R, Ruiz-Ramírez, Portilla L. M. 2004. Evaluación fisicoquímica de nuevos compuestos con actividad antineoplásica (casiopeína II gly y casiopeína III-i). 1er Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer. Pp 222- 225.
- ⁴⁴ Santiago, M. 2004. Efecto genotóxico de los tratamientos agudo y subcrónico de la

casiopeína II-gly en machos, hembras, hembras preñadas y fetos de ratón CD-1. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza. UNAM. México.

⁴⁵ Reyes L, Fuentes I, Ruiz L y Macías L. 2003. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina II-gly in rat plasma. *J. Chromatogr. B.* 791: 111-116.

⁴⁶ Kelley S.L y col. 1988. Overexpression of metallothionein confer resistance to anticancer drugs. *Science* 241: 1813-1815.

⁴⁷ De Vizcaya Ruiz y col. 1998. A. L1210 and CH1 Cells treated with novel copper-based anticancer compound-casiopeina II die by apoptosis. *Anticancer Research* 18: 48-53.

⁴⁸ Rivero Müller A y col. 1998. Degradation of DNA by copper-based anticancer agent casiopeína II. *Human and Experimental Toxicology* 17: 531.

⁴⁹ De Vizcaya Ruiz y col. 2000. Induction of apoptosis by novel copper-based Anticancer Compound, Casiopeina II in L1210 Murine Leukemia and CH1 Human Ovarian cells. *Toxicology in vitro* 14: 1-5.

⁵⁰ De Vizcaya Ruíz A.M.G. 1999. Distribution toxicity and mode of action of the novel copper-based compound: Casiopeina II-gly PhD Thesis, School of biological sciences, university of Surrey, U.K

⁵¹ Hernández Esquivel L. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212 (2006) 79-88.

⁵² Quiroz R G. 1996. Toxicidad aguda de casiopeína II por administración intravenosa en ratones. Estudio anatómico-histológico "2a. Jornada de trabajo en casiopeínas. Pp 37-41.

⁵³ De vizcaya-Ruíz A, Rivero- Muller. 2000. The effect of casiopeína II on the mode of cell death and on integrity of DNA. 4ª Jornada de trabajo en casiopeínas. Pp 67-68.

⁵⁴ Héctor Sumano. Acute Toxicity study of two casiopeinas in anesthetised dogs and preventive effects of carvedilol

⁵⁵ Luis J García y col. 1999. Unión a proteínas plasmáticas de la DL- 3- Hidroxi-etil-3-fenil-propionamida (HEPP). Un nuevo anticónculvante. *Journal of the Mexican Chemical Society.* Pp 39-42.

⁵⁶ Brouwer E y col. 2000 Measurement of fraction unbound paclitaxel in human plasma. *Drug metab. Dispos.* 28: 329-354.

-
- ⁵⁷ Lima J. 1981. Concentration- dependence of Disopyramide binding to plasma protein and its influence on kinetics and dynamics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 741-747.
- ⁵⁸ Evans. W.E. J. 1992. Differences in Teniposide disposition and pharmacodynamics in patients with newly diagnosed and relapse accurate lymphocytic leukemia. *Pharmacol Exp. Ther.* 260: 71-77.
- ⁵⁹ Patrick du Souich, Joseph Verges and Sergio Erill. 1993. Plasma Protein Binding and Pharmacological Response. *Clin. Pharmacokinet.* 24 (6): 435-440.
- ⁶⁰ Benet L. 1985. *Pharmacokinetic Basis for Drug Treatment.* Raven Press. New York. Pp 174 – 187.
- ⁶¹ Olsen H, Andersen A. 2004. Pharmaceutical-grade albumin:impaired drug-binding capacity in vitro. *BMC Clinical Pharmacology.*
- ⁶² Tillement J.P. 1978. Diseases and drug protein binding. *Clin. Pharmacokinet.* 3: 144-154.
- ⁶³ Peters T. 1975. Serum albumin. In: *The plasma protein* (F.W; Putnam, ed), Academic Press. New York. pp 133-181.
- ⁶⁴ Wang Z y col. 2003. Flow Injection chemiluminescence detection for studing protein binding of terbutaline sulfate with on line microdialysis sampling *J Pharm. Biomed. Anal.* 33: 765 – 773.
- ⁶⁵ Desireé. 2004. development and validation of a method to determine the unbound paclitaxel fraction in human plasma. *Analytical Biochemistry* 324: 11-15
- ⁶⁶ Barre J. 1988. Problems in therapeutic drug monitoring: Free drug level monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* Vol. 10. No. 2. 133-143.
- ⁶⁷ Boylan. S 1996. *Enciclopedia of Pharmaceutical Technology* Vol 7 & 13 Ed. Dekker, inc. USA, Pp. 249-251, 151-177.
- ⁶⁸ Snyder L.R. 1979. *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* 2da Ed. John Wiley & Sonns. Inc. USA. Pp. 16-19
- ⁶⁹ 1996. A practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry News& features*, May 1. 305A-309A.
- ⁷⁰ Leon Shargel Susana. *Applied Bioprpharmaceutics & Pharmacokinetics.* 5ta ed. Mc Graw - Hill. USA.
- ⁷¹ John W Dolan. *Staring Out Right, part I-selecting the tools.*

-
- ⁷² Brian A Bidlingmeyer. 1992. Practical HPLC Methodology and applications . Wiley Interscience. USA
- ⁷³ Rubinson KA. 2004. Análisis Instrumental. 1era Ed en español. Prentica Hall. Madrid España. Pp 588
- ⁷⁴ Sadeck C. 2002. The HPLC Solvent Guide. 2da Ed. Wiley Interscience. Pp. 63-73
- ⁷⁵ Mejía C. y Ruíz L. 2004. Efecto *in vitro* de las casiopéinas IIgly y IIIia en el meduloblastoma humano. 1ER. Congreso Nacional de Química Médica. Dedicado a la investigación de cáncer. Pp 188- 191.
- ⁷⁶ Shein –Chung Chow. 2000. Enciclopedia of Biopharmaceutical Statistics. Marcel Dekker, INC.
- ⁷⁷ FLORIN Marcel Musteta, etal. 2006. Determination of drug plasma protein binding by solid phase microextraction. J.Pharm. Sci. 95, 1712-1722
- ⁷⁸ Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2004. Octava edición. Vol I Pág 57.
- ⁷⁹ Yalkowsky. 1999. Solubility and volatilization in aqueous medium. Oxford University Press. American Chemical Society, Washington D.C 47-431.
- ⁸⁰ García M. A, Soberón E. Métodos Analíticos Guía de Validación. 2002 Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. A.C. Pp 20-36.
- ⁸¹ Wieling. J, Hendriks G. 1996. Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma. Journal of chromatography A, 730: 381-394.
- ⁸² Karnes T y Shiu G. 1991. Validation of bioanalytical Methods. Pharmaceutical Research, 4: 421-426.
- ⁸³ NOM-177-SSA1-1998. “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable
- ⁸⁴ Zhou D y Famei L. 2004. Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis 35: 879-885 protein binding study of clozaine by capillary electrophoresis in the frontal analysis mode.
- ⁸⁵ Cui Y.F. 2004. Análisis of competitive binding of ligands to human serum albumin using NMR relaxation measurements. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 34: 247-254.