

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DETECCION E IDENTIFICACION DE LOS
METABOLITOS DE LA T-514 DEL GENERO
KARWINSKIA "IN VIVO" E "IN VITRO"

POR

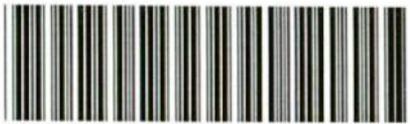
Q.C.B. MAGDALENA GOMEZ SILVA

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR
EN CIENCIAS con Especialidad en Farmacología
y Toxicología

Diciembre del 2000

Q.C.B. MAGDALENA GOMEZ SILVA

TD
QP981
.K37
G6
2000
c.1



1080111676

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

DETECCION E IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS DE LA T-514 DEL GENERO KARWINSKIA "EN VIVO" E "IN VITRO"

FACULTAD DE MEDICINA

18990
K34
2000

Aprobación de la Tesis:



DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ

Co-Director de Tesis

DETECCION E IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS DE LA T-514 DEL GENERO KARWINSKIA "EN VIVO" E "IN VITRO"

DR. MAGDALENA GOMEZ SILVA

POR

Q.C.B. MAGDALENA GOMEZ SILVA

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Farmacología y Toxicología



Diciembre del 2000

TD

QP981

.K37

G6

2000



**DETECCION E IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS DE LA T-514 DEL
GENERO *Karwinskia* "IN VIVO" E "IN VITRO"**

Aprobación de la Tesis:



DRA. LOURDES GARZA OCAÑAS
Director de Tesis



DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ
Co-Director de Tesis



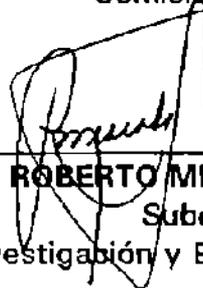
DR. OSCAR TORRES ALANIS
Comisión de Tesis



DRA. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA
Comisión de Tesis



DRA. ROSALBA RAMIREZ DURON
Comisión de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

**DETECCION E IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS DE LA T-514
DEL GENERO *KARWINSKIA* "IN VIVO " E "IN VITRO"**

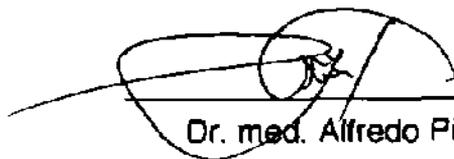
Presentado por

Q.C.B. MAGDALENA GOMEZ SILVA

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología
de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., bajo la dirección de la Dr. med.
Lourdes Garza Ocañas y la co-dirección del Dr. med. Alfredo Piñeyro-López.**



**Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Director de Tesis**



**Dr. med. Alfredo Piñeyro-López
Co-Director**

DEDICATORIA

A Gaby con todo mi amor.

A mis padres.

Al Dr. Alfredo Piñeyro y a Lulú.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su protección y su presencia.

A Gaby por existir.

A mi papá que ya no está pero fue un pilar en mi vida y seguirá siéndolo.

A mi mamá por su dedicación, su comprensión y su ayuda incondicional.

A mi hermana Irma, a mi cuñado Pedro, a Hugo, Marilú y Claudia por ser mis cómplices.

A mis hermanos, Octavio, Guillermo, Jorge, Isaías, Eunice y Elías.

A mi maestro Dr. Alfredo Piñeyro López, por haberme dado el privilegio de recibir sus conocimientos, su atención y su comprensión.

A la Dra. Lourdes Garza Ocañas por su empeño y obsesividad.

Al Dr. Oscar Torres por sus valiosos comentarios a esta tesis.

A Rigo y Vlady por su paciencia, su cariño y amistad.

A Rosalba por sus valiosos comentarios en la parte química.

A la Dra. Waksman por la realización de los espectros de $^1\text{HRMN}$ y por sus valiosos comentarios a este trabajo.

A los miembros de la Comisión de Tesis.

A mis amigos José Alberto, Blanca, Everardo y Blanquita.

A mis compañeros del post-grado: Tere, Sachiko, Martha, Víctor, Lalo y Marco.

A Laura Mónica, Adriana, Judith, Maydé , Vivi y al Dr. Gilberto Arevalo por su ayuda.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 26254-M) y al Paicyt

U.A.N.L. (proyectos SA089-98 y 99) .

Magdalena Gómez Silva

Fecha de graduación: diciembre 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

DETECCION E IDENTIFICACION DE LOS
METABOLITOS DE LA T-514 DEL GENERO
KARWINSKIA "IN VIVO " E "IN VITRO"

Número de páginas: 153

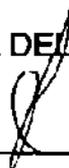
Candidato para la obtención del grado de Doctor en
Ciencias con Especialidad en Farmacología y
Toxicología.

Area de Estudio: Farmacología y Toxicología.

Propósito y Método del Estudio: La T-514 (Peroxisomicina A1) es una antracena dimérica para la cual se ha demostrado un efecto de citotoxicidad selectiva hacia células de origen neoplásico. Lo anterior ha sido motivo de que este compuesto haya sido postulado como potencial agente antineoplásico. En este trabajo se describen los resultados de la evaluación del metabolismo de la T-514 *in vitro* (microsomas y cultivo primario de hepatocitos) e *in vivo* (plasma de perro y de humano) con la finalidad de determinar si este compuesto se metaboliza y si los productos de degradación del mismo son los responsables de su acción selectiva hacia células tumorales. Se presenta el procedimiento para la evaluación del metabolismo en ambos sistemas. Se obtuvieron dos compuestos (M1 y M2) en microsomas de rata y uno (M1) en los de mono, los cuales fueron analizados por CCF, UV-Visible, y RMN de ¹H. Se presentan los resultados de la valoración de la citotoxicidad selectiva en dos líneas celulares humanas de origen hepático (benignas y neoplásicas), por medio de evaluación morfológica y de la prueba de reducción del MTT.

Contribuciones y Conclusiones: En base a los resultados obtenidos se concluyó que la T-514 se metaboliza en presencia de enzimas microsomales obteniéndose dos productos de degradación de la misma (M₁ y M₂). Los productos de degradación de la T-514 obtenidos en este estudio no mostraron citotoxicidad selectiva en las líneas celulares estudiadas; por lo anterior se descarta que los mismos sean los responsables del efecto de selectividad hacia las células tumorales.

FIRMA DEL ASESOR



Dr. med. Lourdes Garza Ocañas

2.2.1.2 Procedimiento para la determinación de proteínas -----	33
2.2.1.3 Procedimiento para la incubación de los microsomos con la T-514 y obtención de muestras para la determinación de la T-514 y sus potenciales productos de degradación -----	33
2.2.1.4 Procedimiento para la obtención del cultivo primario de hepatocitos de rata -----	36
2.2.1.5 Exposición del cultivo primario de hepatocitos a la T-514 -----	38
2.2.1.6 Obtención de las muestras para la determinación de la T-514 y sus metabolitos-----	39
2.2.1.7 Extracción líquido-líquido de la muestras del modelo <i>in vitro</i> -----	41
2.2.1.8 Procedimiento para la evaluación de la citotoxicidad selectiva de los metabolitos de la T-514 en células de origen benigno y neoplásico -----	42
2.2.1.9 Exposición de la T-514 a las soluciones amortiguadoras según Sørensen (pH 7.3, 5.0 y 3.5) y al plasma de perro (<i>in-vitro</i>), y obtención de muestras para la determinación de la T-514 y sus probables productos de degradación-----	45
2.2.2 Modelo <i>in vivo</i> -----	46

2.2.2.1 Administración de T-514 a los perros Beagle	46
2.2.2.2 Obtención de muestras sanguíneas de perros Beagle	47
2.2.2.3 Administración de T-514 a pacientes del Protocolo I 1/15	47
2.2.2.4 Obtención de muestras sanguíneas de pacientes del Protocolo I 1/15	48
2.2.2.5 Procedimiento para la extracción de la T-514 y de sus posibles metabolitos por precipitación de proteínas en el caso del modelo <i>in vivo</i>	49
3. RESULTADOS	50
3.1 Modelo <i>in vitro</i>	50
3.1.1 Evaluación del metabolismo de la T-514 en microsomas hepáticos	50
3.1.1.1 Microsomas hepáticos de ratón	50
3.1.1.2 Microsomas hepáticos de rata	52
3.1.1.3 Microsomas hepáticos de cobayo	57
3.1.1.4 Microsomas hepáticos de perro	59
3.1.1.5 Microsomas hepáticos de mono	61
3.1.1.6 Microsomas hepáticos de origen humano	65
3.1.1.7 Comparación de la actividad de microsomas de diferentes especies incubados con la T-514	67
3.1.2 Evaluación del metabolismo de la T-514 en cultivo primario de hepatocitos de origen animal y humano	70

3.1.2.1 Cultivo primario de hepatocitos de rata	70
3.1.2.2 Cultivo primario de hepatocitos de origen humano	72
3.1.2.3 Resultados de la incubación de la T-514 en solución amortiguadora a pH 7.3, a pH 5.0 y a pH 3.5	81
3.1.2.4 Resultados del análisis de los productos de degradación de la T-514 obtenidos en la solución amortiguadora de fosfatos	88
3.1.2.4 Determinación de la citotoxicidad de los productos de degradación de la T-514 obtenidos de la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.3 y evaluación de su selectividad	95
3.1.2.3 Resultados de la incubación de la T-514 en plasma de perro	96
3.2 Sistemas <i>in vivo</i> .	97
3.2.1 Monitoreo de la T-514 en plasma de perro, después de su administración intravenosa	97
3.2.2 Monitoreo de la T-514 en plasma de pacientes del protocolo I 1/15	98
4. DISCUSION	100
5. CONCLUSIONES	111
APENDICE 1	113
APENDICE 2	116
REFERENCIAS	145

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A1) -----	13
2 Diagrama del procedimiento para la obtención de microsomas hepáticos-----	32
3 Diagrama del procedimiento para la obtención de muestras a partir de microsomas hepáticos -----	35
4 Diagrama del procedimiento para el cultivo primario de hepatocitos de rata -----	37
5 Diagrama para la exposición del cultivo primario de hepatocitos a la T-514-----	38
6 Diagrama para la obtención de muestras a partir del cultivo primario de hepatocitos -----	39
7 Diagrama para la obtención de muestras control de medio de cultivo-----	40
8 Diagrama de extracción líquido-líquido para las muestras <i>in vitro</i> -----	41
9 Determinación de T-514 en los microsomas de hígado de ratón-----	52
10 Determinación de T-514 en los microsomas de hígado de rata-----	54
11 Cromatogramas obtenidos de las muestras de T-514 incubada en microsomas de rata (12.5 µg/ml)-----	55
12 Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos	

M1 y M2 detectados en los microsomas de rata	56
13 Determinación de T-514 en los microsomas de hígado de cobayo	57
14 Determinación de T-514 en los microsomas de hígado de perro Beagle	59
15 Determinación de T-514 en los microsomas de hígado de mono	62
16 Cromatogramas obtenidos de las muestras de T-514 incubada en microsomas de mono (12.5 µg/ml)	63
17 Espectros UV-Vis de la T-514 y del compuesto M1 detectados en los microsomas de mono	64
18 Determinación de T-514 en los microsomas de hígado de origen humano	66
19 Comparación de la actividad de microsomas (250 µg/ml) de diferentes especies incubados con T-514	68
20 Comparación de la actividad de microsomas (125 µg/ml) de diferentes especies incubados con T-514	69
21 Comparación de la actividad de microsomas (12.5 µg/ml) de diferentes especies incubados con T-514	70
22 Determinación de T-514 en cultivo primario de hepatocitos de rata	71
23 Determinación de T-514 en cultivo primario de hepatocitos de origen humano	73
24 Cromatogramas obtenidos de las muestras de	

hepatocitos de origen humano expuestos a la T-514 -----	74
25 Espectros UV-Vis de la T-514 y del compuesto M1 detectados en los hepatocitos de origen humano -----	75
26 Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 en el medio donde se cultivaron los hepatocitos de origen humano-----	77
27 Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en el medio donde se cultivaron los hepatocitos de origen humano-----	78
28 Cromatogramas obtenidos de las muestras del medio control incubado con T-514-----	79
29 Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en el medio control-----	80
30 Determinación de la T-514 en soluciones amortiguadoras según Sørensen -----	81
31 Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 incubada en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 -----	83
32 Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 -----	84
33 Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 incubada en microsomas de rata (1) y en la	

solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 (2)-----	85
34 Cromatogramas obtenidos de las muestras de T-514 incubada en la solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.0-----	86
35 Espectros UV-Vis de la T-514 y compuesto M1 detectados en la solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.0-----	87
36 Cromatogramas de los compuestos obtenidos de la T-514 incubada en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 (1), del estándar de la T-510 (2) y del estándar de la T-496 (3) -----	90
37 Espectros UV-Vis de la T-510 y del compuesto M2-----	91
38 Cromatogramas obtenidos de la T-496 incubada en solución amortiguadora de fosfatos a pH 10 (1) y de la T-514 incubada en solución de fosfatos a pH 7.3 (2)-----	93
39 Espectros UV-Vis del compuesto M1 y del compuesto de degradación de la T-496 -----	94
40 Determinación de la T-514 en plasma de perro <i>in vitro</i> -----	96
41 Determinación de la T-514 en plasma de perro <i>in vivo</i> -----	98
42 Determinación de la T-514 en plasma de pacientes del protocolo I 1/15 -----	99

LISTA DE FIGURAS EN APENDICE 2

Figura	Página
1 Cromatogramas de T-514 en microsomas de ratón (250 $\mu\text{g/ml}$)-----	117
2 Cromatogramas de T-514 en microsomas de ratón (125 $\mu\text{g/ml}$)-----	118
3. Cromatogramas de T-514 en microsomas de ratón (12.5 $\mu\text{g/ml}$)-----	119
4 Cromatogramas de T-514 en microsomas de rata (250 $\mu\text{g/ml}$) -----	120
5 Cromatogramas de T-514 en microsomas de rata (125 $\mu\text{g/ml}$) -----	121
6 Cromatogramas de T-514 en microsomas de rata (12.5 $\mu\text{g/ml}$) -----	122
7 Cromatogramas de T-514 en microsomas de cobayo (250 $\mu\text{g/ml}$)-----	123
8 Cromatogramas de T-514 en microsomas de cobayo (125 $\mu\text{g/ml}$)-----	124
9 Cromatogramas de T-514 en microsomas de cobayo (12.5 $\mu\text{g/ml}$)-----	125
10 Cromatogramas de T-514 en microsomas de perro (250 $\mu\text{g/ml}$) -----	126
11 Cromatogramas de T-514 en microsomas de perro (125 $\mu\text{g/ml}$) -----	127

12 Cromatogramas de T-514 en microsomas de perro (12.5 µg/ml)-----	128
13 Cromatogramas de T-514 en microsomas de mono (250 µg/ml)-----	129
14 Cromatogramas de T-514 en microsomas de mono (125 µg/ml)-----	130
15 Cromatogramas de T-514 en microsomas de mono (12.5 µg/ml)-----	131
16 Cromatogramas de T-514 en microsomas de origen humano (250 µg/ml)-----	132
17 Cromatogramas de T-514 en microsomas de origen humano (125 µg/ml)-----	133
18 Cromatogramas de T-514 en microsomas de origen humano (12.5 µg/ml)-----	134
19 Cromatogramas de T-514 en hepatocitos de rata-----	135
20 Cromatogramas de T-514 en el medio donde se cultivaron los hepatocitos de rata-----	136
21 Cromatogramas de T-514 en el medio control-----	137
22 Espectro de ¹ HRMN del compuesto M1-----	138
23 Espectro de ¹ HRMN del compuesto M1-----	139
24 Espectro de ¹ HRMN del compuesto M1-----	140
25 Espectro de ¹ HRMN del compuesto M1-----	141
26 Espectro de ¹ HRMN del compuesto M1-----	142
27 Cromatogramas de T-514 en plasma de perro <i>in vivo</i> -----	143

28 Cromatogramas de T-514 en plasma de pacientes

del protocolo I 1/15 ----- 144

ABREVIATURAS

%	Por ciento
±	Más-menos
\bar{X}	Promedio
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad aplicada para sedimentar una partícula dada.
$\mu\text{g/ml}$	Microgramos por mililitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
°C	Grados Celsius
Al	Aluminio
CCF	Cromatografía en Capa Fina
cel/ml	Células por mililitro
Cols.	Colaboradores
CO ₂	Dióxido de carbono
CCP	Cromatografía en capa preparativa
CT ₀	Concentración citotóxica 0%
CT ₅₀	Concentración citotóxica 50%
CT ₁₀₀	Concentración citotóxica 100%
DE	Desviación estándar
DNA	Acido desoxirribonucleico

g	Gramos
HP	Hewlett-Packard
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
¹HRMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
hrs	Horas
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
KOH	Hidróxido de potasio
M	Molar
MEM	Medio Esencial Mínimo
mg/m²	Miligramos por metro cuadrado
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MTT	bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolio
n	Número de muestras
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosforilado reducido
NaCl	Cloruro de sodio
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos

PM	Peso molecular
Rf	Razón de la distancia que recorre la muestra con respecto al eluente
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
Tr	Tiempo de retención
U/ml	Unidades por mililitro
UV-Vis	Ultravioleta visible