

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Metabolismo

Desde Paul Ehrlich se sabe que los fármacos actúan en el organismo frente a células que efectúan la respuesta observada. Para producir esta respuesta los fármacos pueden actuar frente a la célula blanco tal como se administran, o bien requieren de una biotransformación previa para poder generar la respuesta actuando como metabolito (s) de la sustancia original¹.

Este proceso de biotransformación o metabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado, el cual contiene altas concentraciones de sistemas enzimáticos, los cuales son capaces de utilizar a los compuestos exógenos como sustrato y generalmente transformarlos a compuestos más

fácilmente excretables. Otros órganos con capacidad metabólica importante son el riñón, el intestino y el pulmón².

Del proceso metabólico se han descrito 2 fases: la fase I o degradativa, en la que se incluye la oxidación, la reducción y la hidrólisis y la fase II o sintética, que incluye la acilación, la alquilación y la conjugación con compuestos endógenos tales como el ácido glucurónico, el glutatión, el ácido acético o el ácido sulfúrico².

Dentro de la fase I las reacciones de oxidación se producen principalmente en la fracción microsomal del hígado y en menor grado en la mitocondria, el núcleo y la membrana plasmática. Todas estas son reacciones catalizadas por el sistema de monooxigenasas u oxigenasas de función mixta las cuales se encuentran en la superficie del retículo endoplásmico liso. Este sistema microsomal es, con mucho el que interviene en el metabolismo de la mayoría de los fármacos³.

La actividad del sistema de monooxigenasas de función mixta requiere de la presencia de un flujo de electrones, los cuales son aportados por la NADPH-citocromo P-450 reductasa a partir del NADPH hasta un complejo formado por el sustrato o fármaco con una hemoproteína denominada citocromo P-450. En este proceso de oxidación por el sistema del citocromo P-450 también está involucrada la formación de radicales libres (intermediarios reactivos); es decir, la liberación de productos de reducción del oxígeno (O_2) que no están acoplados a sustratos de hidroxilación, como son el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre otros. El anión superóxido se origina a partir del oxígeno, el cual es un compuesto con una gran capacidad para formar radicales libres. Por lo tanto, la formación del anión superóxido, peróxido de hidrógeno y en especial el radical hidroxilo (OH^\cdot), conlleva un alto potencial tóxico para las células y tejidos a los que lesiona, ya sea por acción directa mediante la inactivación de sistemas enzimáticos o bien de manera indirecta por la estimulación del proceso de peroxidación de lípidos².

Las reacciones de reducción también se llevan a cabo en la fracción microsomal hepática y ocurren con menos frecuencia que las oxidativas. Algunas de las enzimas responsables del proceso de reducción son la citocromo P-450 reductasa y la NADPH-citocromo c-reductasa²⁴.

Las reacciones de hidrólisis son producidas por hidrolasas que se encuentran ampliamente distribuidas en el plasma y los tejidos, las cuales pueden ser esterasas, amidasas, glucosidasas o peptidasas².

Dentro de las reacciones de la fase II, la conjugación se lleva a cabo principalmente en los microsomas o en el citosol de las células hepáticas, pero también puede ocurrir en otros órganos tales como el pulmón y el riñón. El proceso se lleva a cabo por medio de las enzimas denominadas transferasas, las cuales catalizan el acoplamiento de una sustancia endógena activada, como el uridin 5´difosfato [UDP] con un fármaco o compuesto exógeno⁴.

En términos generales, las reacciones de biotransformación generan metabolitos inactivos más polares, que son fácilmente excretables^{2,3,4}. Sin embargo, en algunos casos se producen metabolitos con potente actividad biológica o con propiedades tóxicas, los cuales en el caso de algunos fármacos son los responsables de la acción farmacológica o de la toxicidad de los mismos. Al respecto, algunos fármacos utilizados actualmente en la quimioterapia del cáncer como la Adriamicina, Daunorrubicina, Doxorrubicina y Mitomicina C y sus análogos, reaccionan con la enzima citocromo P-450 reductasa en presencia de NADPH, para formar metabolitos activos (radicales semiquinónicos o de otro tipo), los cuales son productos intermediarios responsables de su efecto antitumoral y de algunos de sus efectos tóxicos, particularmente hacia corazón^{5,6,7,8}.

1.2 Estudio del metabolismo de fármacos en desarrollo.

El estudio del metabolismo de los fármacos en desarrollo, puede llevarse a cabo *in vivo* e *in vitro*. Por su tiempo, costo y menor complejidad

en el análisis de los resultados, los estudios *in vitro* generalmente preceden a los estudio *in vivo*.

Entre los sistemas utilizados con mayor frecuencia para el estudio del metabolismo *in vitro*, se encuentran los microsomas hepáticos (obtenidos de diversas especies), el cultivo primario de hepatocitos y el sistema denominado rebanadas de hígado en cultivo. La FDA (Food and Drug Administration) establece en su guía denominada "Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process: Studies In Vitro", las técnicas y criterios para la realización de estudios *in vitro* de medicamentos en desarrollo. En dicha guía propone al citocromo P-450 y a los microsomas hepáticos como las principales herramientas en este rubro, ya que las enzimas responsables del metabolismo de la mayoría de los medicamentos de uso humano están contenidas en estos sistemas.

Los microsomas de hígado se obtienen como una fracción subcelular de este tejido, la cual es obtenida por medio de ultracentrifugación diferencial. Todas las enzimas del sistema citocromo P-450 son colectadas en la fracción microsomal. Se ha descrito que las enzimas del citocromo P-450

conservan su actividad en los microsomas y/o en el hígado aislado, si éstos se mantienen almacenados a baja temperatura (-80°C). Por otra parte, para el desarrollo de estudios mas completos en cuanto a metabolismo se refiere, pueden utilizarse sistemas hepáticos intactos, en los cuales los cofactores son autosuficientes y la orientación natural para la actividad enzimática está preservada. En este contexto, tanto los hepatocitos aislados, como las rebanadas de hígado en cultivo son considerados los modelos más adecuados. El cultivo de rebanadas de hígado es un sistema complejo en cuanto al mantenimiento de su viabilidad celular y capacidad metabólica. Por otro lado, el cultivo primario de hepatocitos es considerado una variante de gran utilidad por la conservación de su capacidad metabólica, lo cual ha sido ampliamente demostrado. Al respecto, Dallner y cols.⁹ demostraron que los hepatocitos en cultivo primario conservan la actividad del citocromo P-450, de la NADPH citocromo C reductasa y de la Glucosa-6-fosfatasa. Por otro lado, Gram y cols.¹⁰ demostraron que las reacciones de desmetilación e hidroxilación están preservadas en este tipo de cultivos. La capacidad de los hepatocitos para formar conjugados con ácido glucurónico y la conservación

de la actividad de la L-piruvatocinasa (específica del parénquima hepático) ha sido reportado por Van Berkel y cols¹¹.

El cultivo primario de hepatocitos ha sido utilizado para el estudio de diversos procesos celulares que incluyen, la síntesis de DNA^{12,13}, eventos de transcripción de genes y efectos hormonales^{14,15,16}, procesos secretorios^{17,18,19}, metabolismo y efectos de xenobióticos como el etanol y diversos medicamentos^{20,21,22}, así como, evaluación de hepatotoxicidad y de efectos carcinogénicos y mutagénicos²³. En relación a la uso de los sistemas *in vitro* para la evaluación del metabolismo de diversos fármacos, Vrignaud y cols.²⁴ investigaron el metabolismo de la Doxorubicina en cultivo primario de hepatocitos de ratón y de rata y encontraron dos metabolitos de la misma en ambas especies. Jamis-Dow y cols.²⁵ por otro lado, utilizaron rebanadas de hígado humano, así como, microsomas de hígado de origen humano y de rata, para estudiar el metabolismo del Taxol (compuesto con actividad antitumoral); lo que permitió además conocer la interacción de este compuesto con otros medicamentos, y las diferencias metabólicas interespecie. En este estudio se estableció que el Taxol es metabolizado por el sistema del citocromo P-450 a 6-alfahidroxitaxol y que el proceso

metabólico fue diferente en los microsomas de origen humano y en los de rata. Por otro lado Valles y cols.²⁶ evaluaron el metabolismo de Mofaroteno en cultivo primario de hepatocitos y en microsomas hepáticos obtenidos de diferentes especies y compararon los resultados con los datos obtenidos *in vivo* en las mismas especies y encontraron una buena correlación entre los perfiles metabólicos obtenidos *in vivo* (rata, perro y humano) y los obtenidos *in vitro*, en los microsomas de hígado y hepatocitos de la especie correspondiente. En el mismo estudio se investigaron las diferencias metabólicas interespecie, en microsomas de hígado de ratón, rata, perro, mono y de humano, y se demostró que los perfiles metabólicos tanto cualitativa como cuantitativamente fueron similares en los microsomas hepáticos de mono y de humano. Fischer y cols.²⁷ utilizaron el cultivo primario de hepatocitos y microsomas hepáticos de origen humano para predecir la interacción del metabolismo del Verapamil en presencia de Cimetidina. En dicho estudio se observó que el metabolismo del Verapamil se inhibió con Cimetidina y que esta inhibición fue similar a la reportada para estudios *in vivo*. Los mismos autores reportaron que el cultivo primario de hepatocitos es un sistema que permite evaluar tanto las reacciones de la

fase I como las de la fase II del metabolismo, y de esta forma hacer predicciones cuantitativas de varias vías metabólicas, las cuales se acercan estrechamente a las situaciones que ocurren en el humano. Mas-Chamberlin y cols.²⁶ estudiaron el metabolismo de la Dihidro-alfa-ergocriptina, 9,10[9,10,3H(N)] en cultivo de hepatocitos de rata y humano, así como, en microsomas de rata, de mono y de humano y encontraron que en ambos sistemas *in vitro* (cultivo de hepatocitos y microsomas) el compuesto fue extensamente metabolizado. Al respecto reportaron, basados en los patrones cromatográficos, la formación de ocho metabolitos en los microsomas de origen humano, de los cuales siete también se encontraron en los microsomas de rata y seis en los de mono. Basados en lo anterior los autores llegaron a la conclusión de que los metabolitos detectados en los microsomas de origen humano también fueron producidos en los microsomas de rata y de mono. Con lo anteriormente mencionado se puede concluir que tanto los microsomas hepáticos como el cultivo primario de hepatocitos son sistemas de gran utilidad para la realización de estudios toxicológicos y de metabolismo.

Ya que los resultados del estudio del metabolismo de un compuesto *in vitro* no son directamente extrapolables al fenómeno *in vivo*, dichos estudios generalmente brindan información que precede a los estudios *in vivo*²⁸.

Para la evaluación del metabolismo de un compuesto *in vivo* se han utilizado animales de diferentes especies entre los que se encuentran el ratón, la rata, el cobayo, el conejo, el perro, y el mono, entre otros. En general se acepta que entre mas cercana sea la especie al humano mayor será la posibilidad de extrapolar conclusiones del proceso metabólico.

1.3 T-514 del género *Karwinskia*.

Al género *Karwinskia* pertenecen plantas de la familia de las Rhamnaceas, distribuidas prácticamente en todo el territorio mexicano, en el Suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y en parte de Centro América. La *Karwinskia* fue descrita por primera vez en el siglo XVIII por el sacerdote Jesuita Francisco Javier Clavijero en el libro "Historia de la Antigua o Baja California"³⁰ como una planta tóxica. Dreyer y cols.³¹ en 1975 aislaron del endocarpio de la *Karwinskia humboldtiana* cuatro compuestos

antracenónicos diméricos a los que llamaron por su peso molecular T-496, T-514, T-516 y T-544. Posteriormente Waksman y cols.³² y Rivas y cols.³³ han hecho modificaciones a las técnicas originales de aislamiento para la obtención de éstas y otras antracenonas, entre ellas dos diastereoisómeros y dos isómeros posicionales de la T-514.

De todos los compuestos aislados a la fecha, la T-514 originalmente descrita por Dreyer y cols.²⁸ (figura 1) ha resultado de particular interés por su toxicidad selectiva hacia células de origen tumoral³⁴. Dicha toxicidad selectiva se estudió inicialmente en líneas celulares de hígado, pulmón y colon de origen neoplásico y benigno. Al comparar los resultados obtenidos con este compuesto con los de otros agentes antineoplásicos como la Vincristina, el 5-Fluoruracilo, la Doxorrubicina, la Epidoxorrubicina y la Mitomicina, se observó un mayor Índice Terapéutico para la T-514 lo cual hizo suponer que esta sustancia podría ser un potencial medicamento antineoplásico³⁵. Lo anterior fue motivo de una patente otorgada por la Comunidad Económica Europea en 1995, así como, por los Estados Unidos de Norteamérica y Japón en 1996 y 1997, respectivamente.

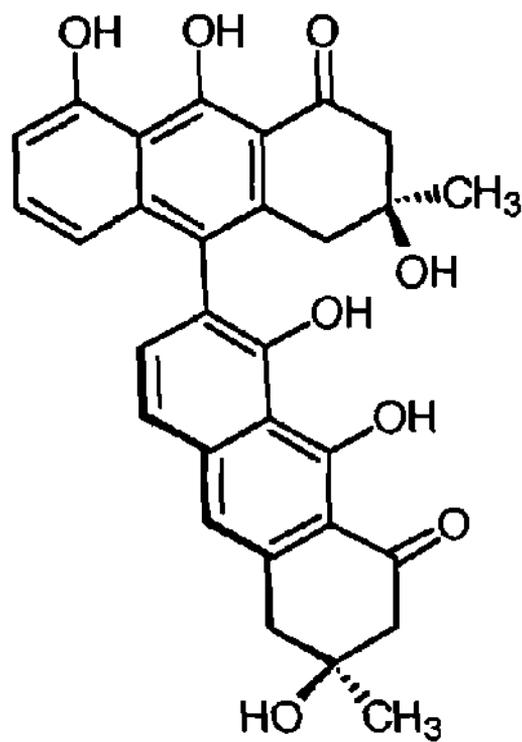


Figura 1. Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A1).

La toxicidad selectiva de la T-514 reportada por Piñeyro y cols. se corroboró en estudios *in vitro* realizados en el National Cancer Institute (NCI) en un panel de 60 líneas celulares de origen neoplásico. Actualmente la T-514 se encuentra en estudios de fase clínica I en pacientes con carcinoma avanzado sin tratamiento alternativo³⁸ (Protocolo I 1/15 inscrito en la

Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL).

Ya que se ha demostrado que la T-514 tiene características que la hacen un producto de interés farmacológico en la terapéutica del cáncer, resulta de particular importancia el conocer su comportamiento farmacocinético el cual incluye, su absorción, distribución, metabolismo y excreción, así como, su farmacodinamia o mecanismo de acción lo que permitiría el manejo adecuado y racional de este compuesto como fármaco.

En relación al posible mecanismo de acción de la T-514, Sepúlveda y cols.^{37,38} reportaron que ésta produce una marcada disminución en el número de peroxisomas de hepatocitos de rata y de mono. Adicionalmente Sepúlveda y cols.³⁹ demostraron en estudios efectuados en levaduras metilotróficas (*Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*), que la T-514 afecta de manera selectiva e irreversible la integridad de la membrana peroxisomal. Este efecto selectivo sobre la membrana peroxisomal llevó a los investigadores a renombrar a la T-514 como Peroxisomicina A1 donde la

letra A y el número 1 provienen de la nomenclatura para estereoisómeros de esta naturaleza establecida por Steglich y Gill⁴⁰.

Moreno y cols.⁴¹ establecieron que la T-514 produce inhibición de tipo no competitivo sobre la catalasa hepática obtenida de animales de tres especies. Posteriormente, Moreno y cols.⁴² realizaron estudios *in vivo* en ratones intoxicados con T-514 y demostraron, tanto por métodos bioquímicos como histoquímicos, que la T-514 no produce inhibición de la catalasa hepática, por lo anterior sugirieron que la catalasa no estaba involucrada en forma directa en el daño peroxisomal.

Garza y cols.⁴³ estudiaron el efecto de la T-514 sobre la lipidoperoxidación microsomal hepática. Adicionalmente los mismos autores reportaron la producción de radicales libres por la T-514 en cultivo primario de hepatocitos y la disminución de la citotoxicidad de este compuesto en presencia de superóxido-dismutasa y catalasa⁴⁴. Basados en lo anterior postularon la implicación del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno en la toxicidad producida por este compuesto. Al respecto es importante

mencionar que se ha reportado la producción de radicales libres, daño al DNA e inducción de lipidoperoxidación como parte del mecanismo de acción antitumoral de algunos agentes antineoplásicos como la Mitomicina C y las antraciclinas (Doxorrubicina y Daunorrubicina)^{5,6,7,8}.

Por otra parte Guerrero y cols.⁴⁵ reportaron un proceso de autooxidación de la T-514 en sistemas no enzimáticos, así como, en microsomas hepáticos. También relacionado con el posible mecanismo de acción de este compuesto, Martínez y cols.⁴⁶ reportaron que induce apoptosis en líneas celulares de origen tumoral.

Ya que a la fecha no se conoce si la T-514 es metabolizada por el hígado, y dado que ésta se relaciona estructuralmente con compuestos polifenólicos aromáticos con actividad antitumoral ya conocida²⁹, los cuales ejercen su acción a través de metabolitos activos producidos en el organismo, se planteó el siguiente protocolo, con el propósito de investigar el posible metabolismo de la T-514 *in vitro* e *in vivo*. Además de lo anterior, se

propone aislar a los metabolitos de la T-514 (si los hubiere) e investigar la posible acción selectiva de los mismos hacia células de origen tumoral.

Para propósito de esta tesis la peroxisomicina A1 será mencionada como T-514.

1.4 HIPOTESIS

La T-514 se metaboliza en el organismo y sus metabolitos son los responsables de su acción selectiva hacia células tumorales.

1.5 OBJETIVO GENERAL

Detección de los metabolitos de la T-514 *in-vitro* e *in-vivo*.

1.6 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer las condiciones del sistema de cultivo primario de hepatocitos de rata y de humano para su exposición a la T-514.
2. Exponer a los hepatocitos de rata y/o humano cultivados *in vitro* a la T-514.
3. Determinar la presencia de la T-514 y/o de sus metabolitos en hepatocitos de rata y su medio de cultivo por medio de HPLC.
4. Determinar la presencia de la T-514 y/o de sus metabolitos en hepatocitos de humano y su medio de cultivo por medio de HPLC.

5. Exponer a los microsomas hepáticos de ratón, rata, cobayo, perro, mono y de humano a la T-514.
6. Determinar la presencia de la T-514 y/o de sus metabolitos en los microsomas hepáticos de las especies mencionadas en el punto 5 por medio de HPLC.
7. Administrar la T-514 a perros Beagle.
8. Determinar la presencia de la T-514 y/o de sus metabolitos en plasma de perro Beagle, por medio de HPLC.
9. Determinar la presencia de la T-514 y/o de sus metabolitos en plasma de pacientes del Protocolo I 1/15 del ensayo fase clínica I, por medio de HPLC.
10. Aislar los metabolitos que se hubiesen detectado *in vitro* e *in vivo*.

11. Evaluar la citotoxicidad selectiva de los metabolitos que se hubiesen detectado en los sistemas *in vitro* e *in vivo*.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Material Biológico

Ratas Wistar (ambos sexos) de 8-12 días de nacidas, para el cultivo primario de hepatocitos.

Ratas Wistar macho (150-200 g de peso), para la obtención de microsomas hepáticos.

Mono *Macaca mulata* macho (1.758 Kg de peso), para la obtención de microsomas hepáticos.

Perros Beagle machos (10-13 Kg de peso).

Plasma de pacientes del Protocolo I 1/15 (Pacientes con carcinoma avanzado sin tratamiento alternativo).

Microsomas de ratón, cobayo, perro beagle y humano, obtenidos de In Vitro Technologies, Inc., Baltimore, MA, EUA.

Cultivo primario de hepatocitos de origen humano, obtenidos de In Vitro Technologies, Inc.

Líneas celulares hepáticas de origen humano: Chang liver (CCL13) y Hep G₂ (HB8065) obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA, EUA.

2.1.2 Reactivos, material y equipo.

2.1.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados tanto en el Modelo *in vitro* como en el Modelo *in vivo* se obtuvieron de Sigma Chemical Co., San Louis, MO, EUA, Merck Darmstadt, RFA, Productos Químicos Monterrey, SA, México, BIO-RAD, CA, EUA y de In Vitro Technologies, Inc.

Sigma Chemical Co.:

Medio Williams E

Medio Esencial Mínimo (MEM)

Colagenasa

Suero de ternera

Penicilina

Estreptomina

Fungizona

Fosfato de potasio monobásico

Fosfato de sodio dibásico

Acido cítrico monohidratado

Cloruro de potasio

Benceno

Merck Darmstadt:

Etanol calidad gradiente

Metanol grado HPLC

Acetato de Etilo grado HPLC

Productos Químicos Monterrey, S.A.:

Hidróxido de potasio

Acido clorhídrico

Acetona

Eter de petróleo

BIO-RAD:

Kit para determinación de proteínas

In Vitro Technologies, Inc.:

Medio de cultivo para hepatocitos humanos (lote 14L5)

T-514:

La T-514 se aisló y purificó en el *Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL* y se almacenó a -20°C , protegida de la luz hasta su uso.

2.1.2.2 Cultivo Primario y aislamiento de microsomas.

Para el cultivo primario de hepatocitos y el aislamiento de los microsomas de rata y mono se usó el siguiente material y equipo:

Cajas de Petri desechables.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml (Pyrex)

Placa de calentamiento con agitador magnético PC 101 (Corning)

Equipo de disección

Pipetas Pasteur desechables

Membranas de filtración de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore)

Tubo para centrifuga de polipropileno de 15 ml con tapón de rosca (Corning)

Tubos para ultracentrifuga de polialomero (Beckman)

Cámara de Neubauer

Invertoscopio Axiovert 100 (Carl Zeiss)

Campana de flujo laminar

Incubadora modelo 5410 (Napco)

Ultracentrifuga L8-M (Beckman)

Desmembranizador sónico Modelo 300 (Fisher)

Homogenizador Con-Torque (Eberbach) con vaso de vidrio (Potter-Elvehjem) y émbolo de teflón

Espectrofotómetro Bio Assay Reader HTS7000 (Perkin Elmer)

Centrifuga Spinchron (Beckman)

Potenciómetro modelo ø 320 (Beckman)

Balanza analítica modelo AB240 (Mettler Toledo)

Espectrofotómetro Beckman DU7500 con arreglo de diodos y controlador de temperatura Peltier.

2.1.2.3 Extracción de la T-514 de muestras biológicas.

Para la extracción de la T-514 del medio de cultivo, de las células, de los microsomas y del plasma se utilizó el siguiente material y equipo:

Tubos de vidrio de 5 ml con EDTA (Vacutainer®)

Tubos de vidrio 13X150 con tapón de rosca (Pyrex)

Tubos de vidrio 13X100 con tapón de rosca (Pyrex)

Tubos Eppendorf de 1.5 ml

Pipeta automática, 10-100 μ l (Eppendorf)

Pipeta automática, 20 μ l (Eppendorf)

Pipeta automática, 100-1000 μ l (Eppendorf)

Puntillas para pipetas automáticas

Microcentrífuga 5415C (Eppendorf)

Rotavapor 011(Buchi)

Vortex (Scientific/Products)

Membranas de 0.45 μ m de tamaño de poro (Millipore)

2.1.2.4 Técnicas Cromatográficas.

La técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución se designará con las siglas HPLC.

HPLC Analítico I:

Cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard Modelo 1090 con arreglo de diodos, columna ODS Hipersil con 5 μ m de tamaño de partícula, de 100 mm de longitud y con un diámetro de 2.1 mm (HP). Viales de 2 ml y septas de teflón para viales (HP).

Eluente 1a Condiciones:

A = Metanol

B = Agua -Acetonitrilo-Acido acético (70:30:1.6)

| Tiempo (min) | %A | %B |
|--------------|-----|----|
| 0-4 | 65 | 35 |
| 4-6 | 100 | 0 |
| 6-8 | 100 | 0 |
| 8-10 | 65 | 35 |

Flujo: 0.4 ml/min

Temperatura: 26.9°C

Longitud de Onda : 410, 269, 310 nm.

HPLC Analítico II:

Cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard Modelo 1100 con detector UV-Vis de longitud de onda variable. Columna ODS Hipersil con 5 μm de tamaño de partícula de 100 mm de longitud y con un diámetro de 2.1 mm (HP). Viales de 2 ml y septas para viales (HP). Las condiciones usadas para este sistema fueron las mismas que las descritas para HPLC I.

CCF.

Cromatofolios Al de sílica gel 60 WF₂₅₄ (Merck). Espesor de 0.2 mm

Eluente **1b** Benceno-Acetona (3:1).

Detección CCF:

Lámpara UV de 253.7 y 375.0 nm: GELMAN SCIENCES, INC. Modelo

No. 51438. Revelador: solución KOH en etanol al 5 %.

CCP:

Sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck, para cromatografía en placa, con un espesor de capa de 0.5 mm.

Eluente **1b** Benceno-Acetona (3:1).

2.2 METODOS

2.2.1 Modelo *in vitro*.

Para el estudio del metabolismo de la T-514 *in vitro* se seleccionaron los siguientes modelos:

Cultivo primario de hepatocitos de rata y de humano.

Microsomas hepáticos de origen animal (mono, ratón, cobayo, perro) y humano.

2.2.1.1 Procedimiento para la obtención de microsomas hepáticos.

Los microsomas hepáticos se aislaron de acuerdo a procedimientos previamente descritos⁴⁷. Se utilizaron ratas Wistar macho y un mono *Macaca mulata* macho; las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y el mono por medio de inyección intracardiaca de KCl al 10% a una dosis de 0.3 mg/Kg. La pared abdominal de ambas especies se abrió con unas tijeras de disección y el hígado se perfundió *in situ* con una solución de KCl 0.154 M (pH 7.4) a través de la vena Porta. Posteriormente el hígado se extrajo, se pesó y se homogenizó. El homogenizado se centrifugó a 28,000 g durante 30 min, se eliminó el precipitado y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 105,000 g durante 60 min. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado, el cual contenía los microsomas. Estos se resuspendieron en 5 ml de KCl 0.154 M (pH 7.4) y se determinó la

concentración de proteínas microsomales. En la figura 2 se muestra el diagrama del procedimiento experimental.

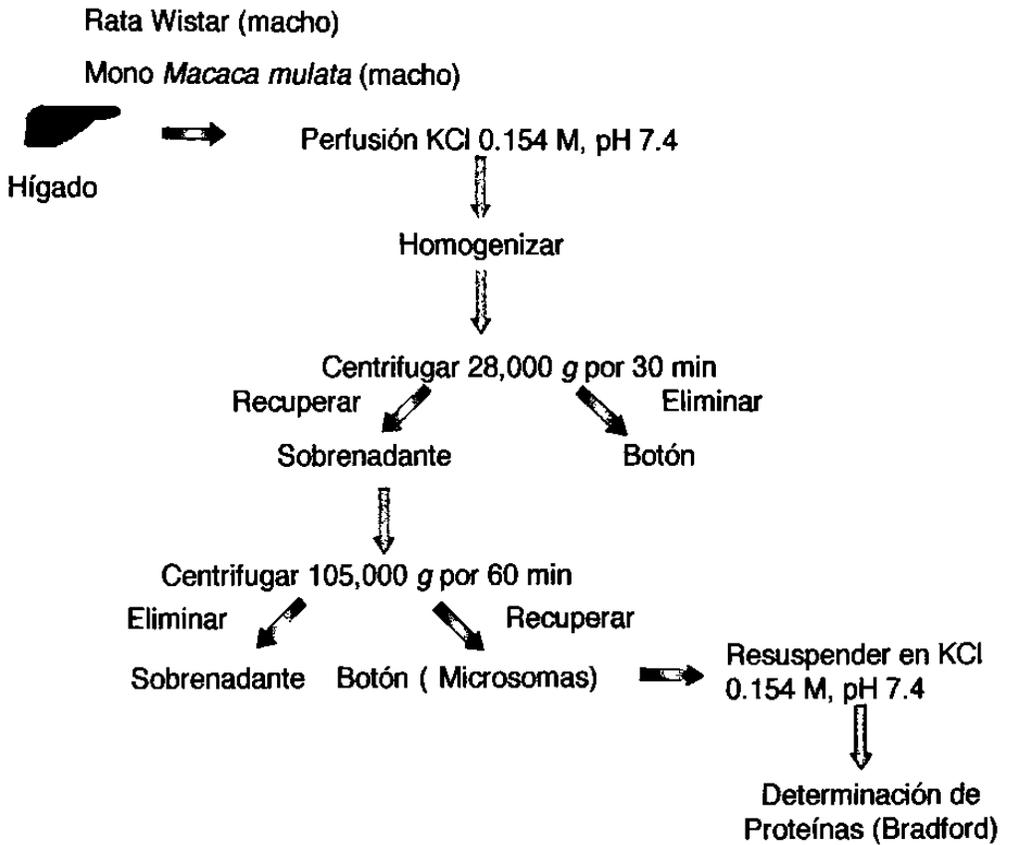


Figura 2. Obtención de microsomas hepáticos

2.2.1.2 Procedimiento para la determinación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas en los microsomas se llevó a cabo por el método de Bradford⁴⁹, para lo cual se prepararon curvas de calibración de estándares de albúmina sérica bovina. Este método se basa en la medición espectrofotométrica del complejo coloreado que se obtiene al reaccionar el azul brillante de Coomassie G-250 con los residuos de aminoácidos básicos.

2.2.1.3 Procedimiento para la Incubación de los microsomas con la T-514 y obtención de muestras para la determinación de la T-514 y sus potenciales productos de degradación (metabolitos).

Se utilizaron tres concentraciones de proteínas microsomales: 12.5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ en KCl 0.154 M a un pH 7.4, las cuales se expusieron a la

T-514 (25 μ M). Se utilizaron tres muestras para cada concentración evaluada, y el experimento se realizó en dos ocasiones. La T-514 se disolvió en etanol-KCl 0.154 M a un pH 7.4 en una proporción 1:1.

Las muestras de microsomas control tuvieron las mismas concentraciones de proteínas (12.5, 125 y 250 μ g/ml), y a éstas solo se les agregó el solvente (etanol-KCl).

También se incubó a la T-514 (25 μ M) en KCl 0.154 M a un pH de 7.4, en ausencia de microsomas.

Todas las muestras se incubaron a 37°C durante los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24, hrs.

Al llegar al tiempo establecido, las muestras se sacaron de la incubadora y se agregaron 0.5 ml de metanol para detener la actividad microsomal. Posteriormente las muestras se sometieron a extracción líquido-

líquido con Acetato de Etilo para proceder a su análisis por HPLC con el eluyente 1a. La figura 3 muestra el diagrama del procedimiento experimental.

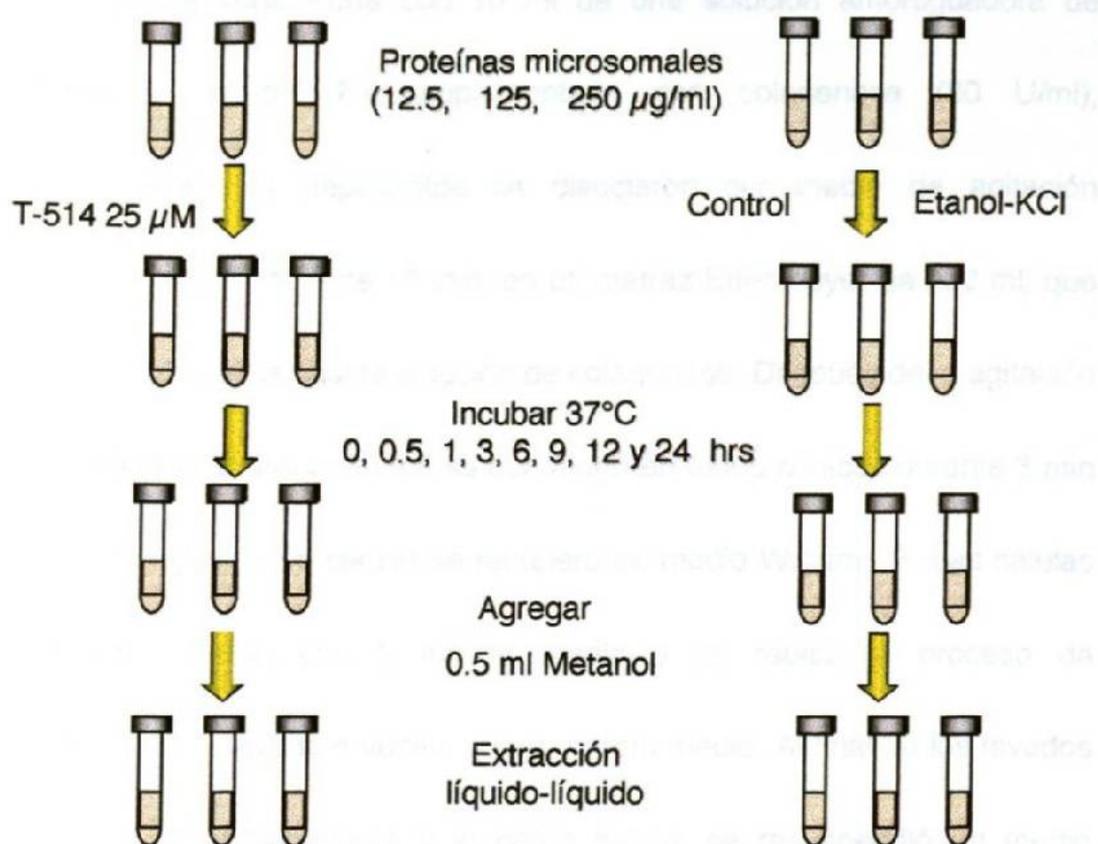


Figura 3. Obtención de muestras de microsomas hepáticos

2.2.1.4 Procedimiento para la obtención del cultivo primario de hepatocitos de rata.

Para la obtención del cultivo primario de hepatocitos de rata se sacrificaron por decapitación 6 ratas Wistar de 8-12 días de nacidas, de acuerdo al método descrito por Acosta y cols.⁴⁹. El hígado se perfundió *in situ* por la vena Porta con 10 ml de una solución amortiguadora de fosfatos a un pH 7.4, suplementada con colagenasa (80 U/ml), posteriormente los hepatocitos se disociaron por medio de agitación magnética a 37°C durante 10 min, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, que contenía 25 ml de la misma solución de colagenasa. Después de la agitación se recuperó el sobrenadante y se centrifugó en tubos cónicos durante 3 min a 3000 rpm y el botón celular se recuperó en medio Williams E. Las células se resuspendieron con 5 ml de medio y se repitió el proceso de centrifugación y lavado 4 veces, con el mismo medio. Al final de los lavados se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio Williams E suplementado con insulina, hidrocortisona y suero de ternera (10% v/v) como nutrientes. La densidad celular se ajustó a 1×10^6 cel/ml mediante conteo celular en un hemocitómetro, previa determinación de la

viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul de tripano⁵⁰. Los hepatocitos se sembraron en cajas de Petri en el medio Williams E suplementado. Las cajas de Petri conteniendo las células se incubaron a 37 °C durante 72 hrs en un ambiente de 95 % aire y 5 % CO₂. Los hepatocitos se lavaron cada 24 hrs con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. A las 72 hrs se evaluó la adhesión y morfología celular mediante observación en un microscopio invertido, y posteriormente, el medio se cambio por medio Williams E fresco. Las figuras 4 y 5 muestran el diagrama del procedimiento experimental.

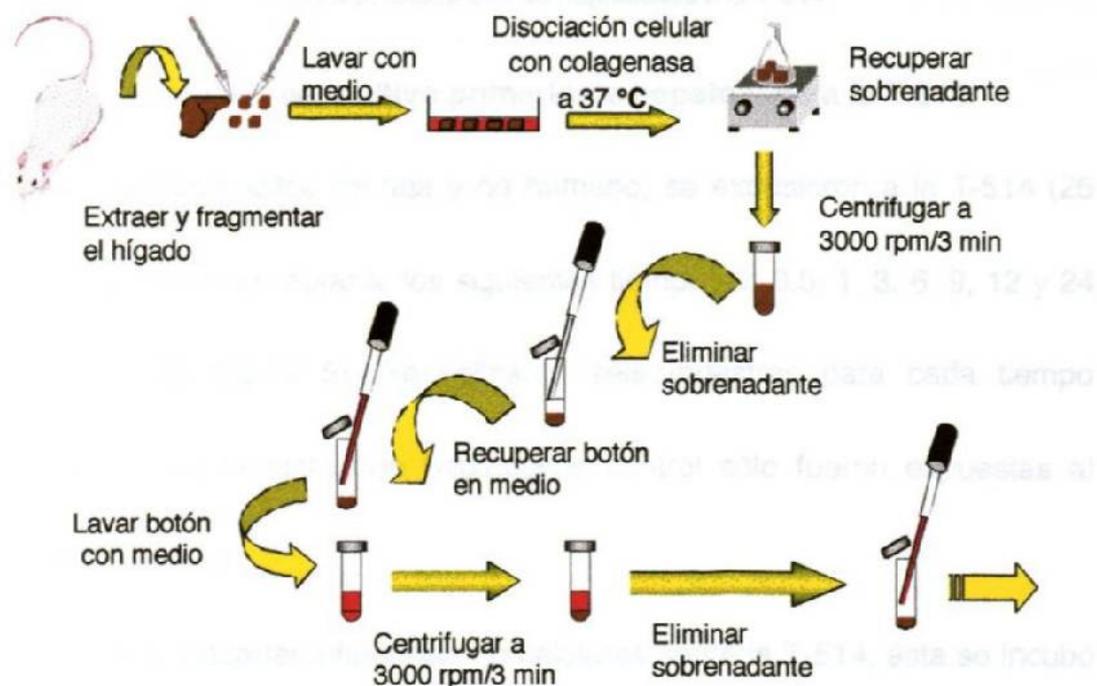


Figura 4. Cultivo primario de hepatocitos

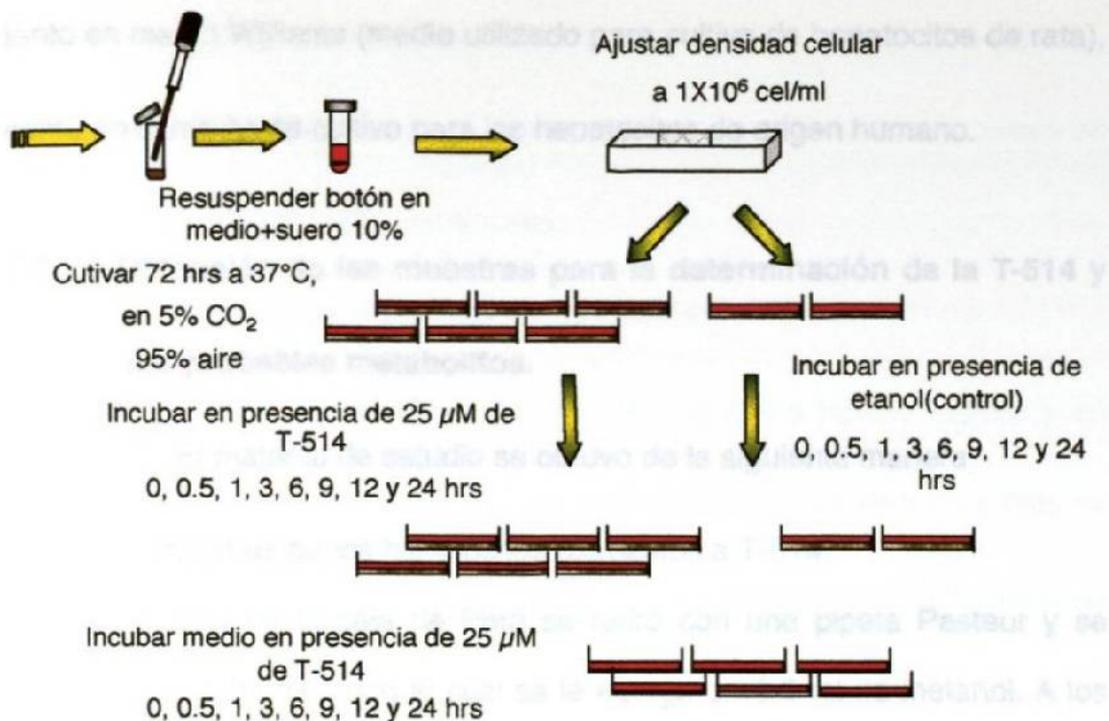


Figura 5. Exposición de hepatocitos a la T-514.

2.2.1.5 Exposición del cultivo primario de hepatocitos a la T-514.

Los hepatocitos de rata y de humano, se expusieron a la T-514 ($25 \mu\text{M}$) y se incubaron durante los siguientes tiempos 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 hrs a 37°C (figura 5). Se utilizaron seis muestras para cada tiempo evaluado. Las muestras de hepatocitos control sólo fueron expuestas al solvente (etanol).

Para descartar influencias no celulares sobre la T-514, ésta se incubó a la misma concentración y tiempos a los que fueron incubadas las células,

tanto en medio Williams (medio utilizado para cultivo de hepatocitos de rata), como en el medio de cultivo para los hepatocitos de origen humano.

2.2.1.6 Obtención de las muestras para la determinación de la T-514 y sus probables metabolitos.

El material de estudio se obtuvo de la siguiente manera:

1.- Muestras de los hepatocitos expuestos a T-514:

El medio de la caja de Petri se retiró con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de vidrio al cual se le agregaron 0.5 ml de metanol. A los hepatocitos se les agregó 1 ml de PBS y las membranas de las células se lisaron con ultrasonido por 30 seg, la suspensión se transfirió a un tubo de vidrio, la caja se lavó con 0.5 ml de metanol y éste se agregó al tubo (figura 6).

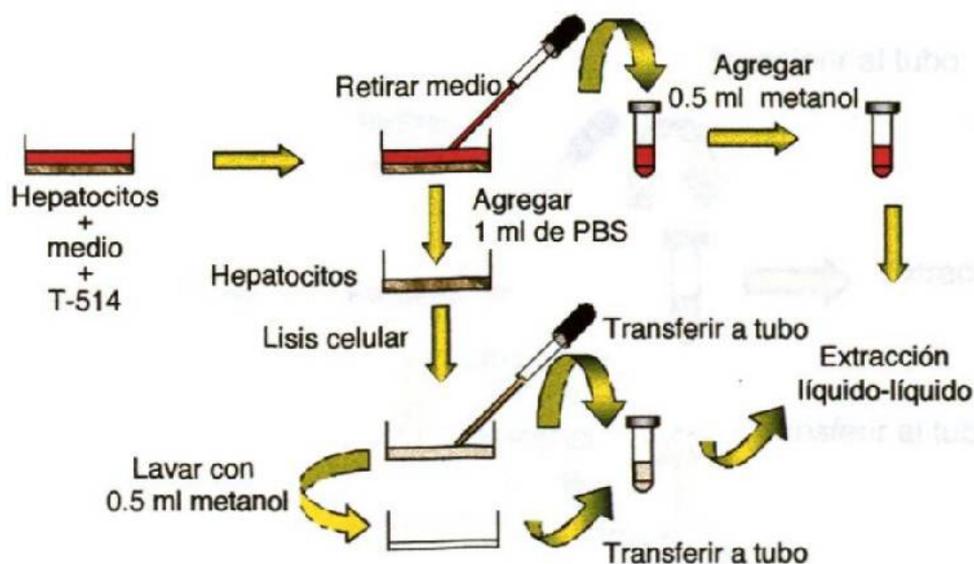


Figura 6. Preparación de muestras de cultivo primario de hepatocitos

2.2.1.2.- Muestras control (hepatocitos en medio con etanol, sin T-514):

Las muestras control se prepararon de la misma forma como se mencionó para las muestras anteriores.

3.- Muestras de medio control con T-514:

El medio se retiró de las cajas de Petri con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de vidrio, la caja se lavó con 0.5 ml de metanol y éste se agregó al tubo, posteriormente las muestras se extrajeron con Acetato de Etilo para proceder a su análisis por HPLC I con el eluyente 1a y así seleccionar aquellas en las que se detectara algún producto diferente a la T-514 (figura 7).

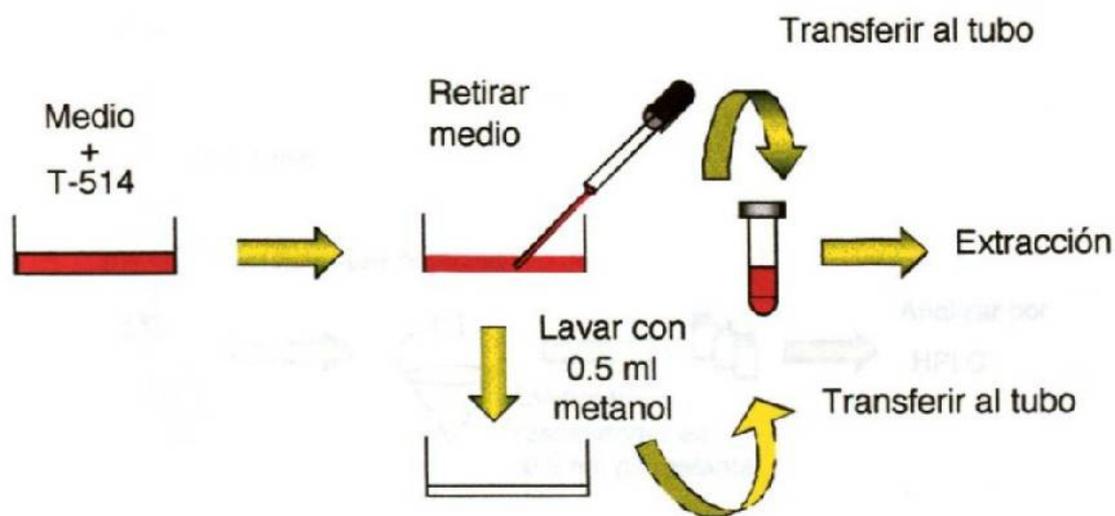


Figura 7. Preparación de muestras del medio control.

2.2.1.7 Extracción líquido-líquido de las muestras del modelo *In vitro*.

Las muestras de microsomas, hepatocitos o medio de cultivo solo, fueron extraídas en dos ocasiones con 5 ml de Acetato de Etilo, se agitaron en un vortex durante 1 min y se recuperó la fase orgánica. Posteriormente las muestras se evaporaron a sequedad por rotación al vacío y los extractos se resuspendieron en 0.5 ml de metanol. Los extractos obtenidos se filtraron a través de membranas de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro y se transfirieron a un vial para su posterior análisis por HPLC I con el eluente 1a (figura 8).

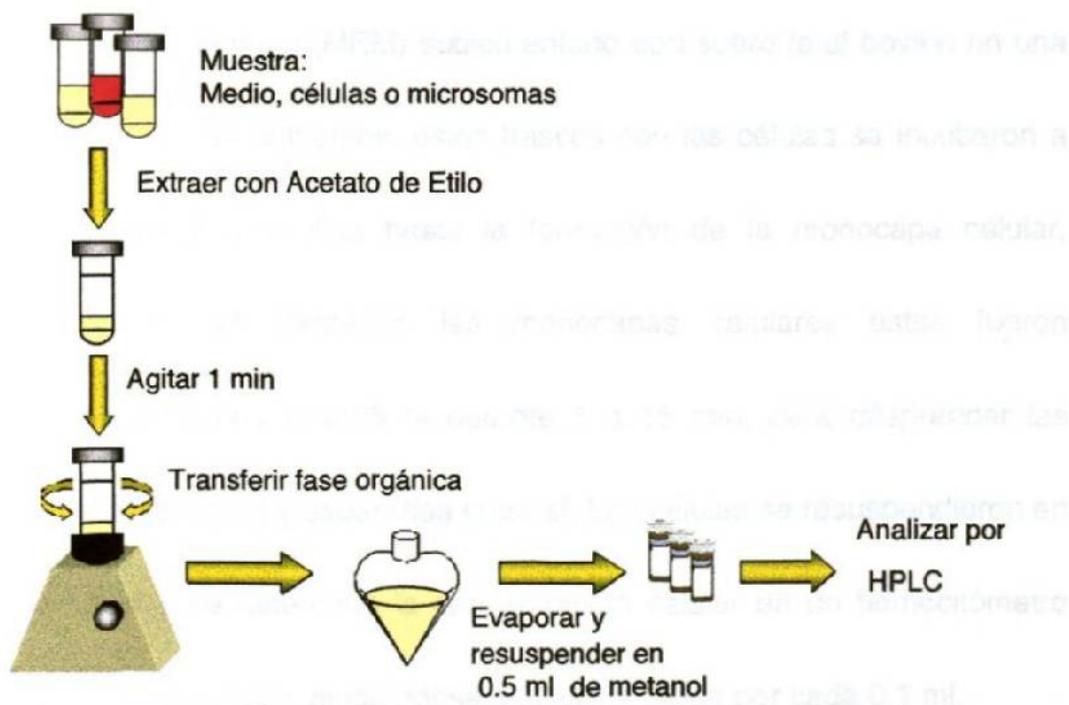


Figura 8. Extracción líquido-líquido

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.

Para la evaluación de la citotoxicidad selectiva se realizaron los siguientes pasos:

a)- Cultivo de células de hígado de Chang (origen benigno) y de células de Hepatoma G2 (origen neoplásico).

Las células de ambas líneas se sembraron en frascos de cultivo con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino en una relación 9:1, como nutrientes; estos frascos con las células se incubaron a 37°C durante 2 a 3 días hasta la formación de la monocapa celular, posteriormente ya formadas las monocapas celulares éstas fueron expuestas a tripsina al 0.25 % durante 5 a 15 min, para desprender las células del recipiente y separarlas entre sí. Las células se resuspendieron en medio MEM y se determinó la concentración celular en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), ajustándose a 20×10^3 células por cada 0.1 ml.

Posteriormente se agregó 0.1 ml de la suspensión celular (20,000 células) a cada celdilla de la placa de 96 celdillas y las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 hrs hasta la formación de la monocapa celular lo cual se comprobó por revisión microscópica.

b)- Exposición celular a los productos de degradación (metabolitos) de la T-514 y determinación de la CT_{60} .

El medio de cultivo de las placas se retiró y se agregaron 100 μ l de medio MEM a las 96 celdillas; posteriormente se agregó el producto de degradación (metabolito) de la T-514 disuelto en etanol. Se evaluaron 12 concentraciones (160 μ g/ml hasta 0.078 μ g/ml) y se dejaron celdillas control, en las cuales sólo se agregó el solvente (etanol). Las placas se incubaron a 37°C durante 72 hrs. La evaluación de las 12 concentraciones se realizó en dos ocasiones en experimentos separados.

c)- Evaluación de la citotoxicidad selectiva.

Evaluación morfológica: una vez transcurrido el tiempo de incubación (72 hrs), las células se revisaron microscópicamente con diferentes factores de amplificación (100x, 200x y 300x). El criterio de citotoxicidad evaluado fue la adhesión celular a la placa, las celdillas donde todas las células estaban

desprendidas, se consideraron como celdillas con concentración citotóxica total (CT_{100}), y las celdillas con adhesión celular igual a las células de las celdillas control, se consideraron como celdillas con concentración no citotóxica (CT_0).

Prueba de reducción del MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio): se evaluó la capacidad de las enzimas deshidrogenasas succínicas mitocondriales de las células viables para reducir al MTT a un compuesto azul (Formazan), producto que se midió espectrofotométricamente a 570 nm de acuerdo al método de Mosmann⁵¹.

Las celdillas donde todas las células estaban muertas y cuya absorbancia correspondió a cero fueron consideradas como concentración citotóxica total (CT_{100}), y la CT_0 se obtuvo de las celdillas donde la medición de la viabilidad celular dio una absorbancia igual a la de los controles.

La concentración citotóxica cincuenta por ciento (CT_{50}) se calculó como el promedio geométrico entre la CT_{100} y la CT_0 de acuerdo al criterio previamente establecido por Ekwalf⁵². Como criterio de selectividad se estableció una diferencia mínima de tres veces entre las CT_{50} obtenidas de las células de origen benigno y neoplásico.

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 (*In-vitro*), y obtención de muestras para la determinación de la T-514 y sus probables productos de degradación.

Además de la autooxidación reportada para la T-514⁴⁶, se ha reportado en la literatura para ciertas sustancias la existencia de una degradación "espontánea" en condiciones fisiológicas, dependiente tanto del pH como de la temperatura, llamada efecto Hoffmann^{53,54,55,56,57} por tal motivo previo a la administración de la T-514 a los perros (modelo *in vivo*), se prepararon soluciones amortiguadoras según Sørensen⁶⁸, de fosfatos a pH 7.3, que remeda a las condiciones fisiológicas extracelulares, de citratos para el pH 3.5 que remeda las condiciones fisiológicas intracelulares y de fosfatos a pH 5.0. Adicionalmente se prepararon muestras de plasma de perro con y sin dilución (1:10) en solución fisiológica (NaCl 0.9 %). Las soluciones amortiguadoras y el plasma (diluido y no diluido) se incubaron a 37°C en presencia de T-514 (25 μ M) disuelta en etanol, a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 hrs. Se utilizaron tres muestras para cada tiempo

evaluado y se prepararon muestras control con cada una de las soluciones y con el plasma a los que sólo se les añadió el solvente.

Las muestras de las soluciones amortiguadoras se filtraron a través de membranas de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro, las muestras plasmáticas se procesaron por precipitación de proteínas como se describe en el punto 2.2.2.5, posteriormente las muestras se analizaron por HPLC I con el eluyente 1a.

2.2.2 Modelo *in vivo*.

Para el estudio del metabolismo de la T-514 *in vivo*, se usaron perros Beagle y plasma de pacientes del Protocolo I 1/15.

2.2.2.1 Administración de T-514 a los perros Beagle.

Se utilizaron 4 perros Beagle machos (con un peso promedio de 12.32 Kg.), a los cuales se les uniformizó la alimentación, y se mantuvieron en ciclos de 12 hrs luz/obscuridad. Los perros se mantuvieron en ayuno

durante 16 hrs previo a la administración de la T-514 por vía intravenosa a una dosis única de 2 mg/Kg de peso.

2.2.2.2 Obtención de muestras sanguíneas de perros Beagle.

Se tomaron muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante, a los siguientes tiempos: 0 (previo a la administración de T-514), 1, 15, 30 y 60 min y a las 2, 3, 4, 5, 6, y 12 hrs. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm, el plasma se transfirió a tubos de vidrio y posteriormente la T-514 y sus posibles metabolitos se extrajeron por medio de precipitación de proteínas como se describe en el punto 2.2.2.5. Los extractos se analizaron por HPLC II con el eluyente 1a y posteriormente por HPLC I con el eluyente 1a.

2.2.2.3 Administración de T-514 a pacientes del Protocolo I 1/15.

Para la evaluación del metabolismo de la T-514 en el humano se utilizaron muestras de plasma de dos pacientes del Protocolo I 1/15 a los que se les administró la T-514 en solución de Haemaccel®, a una dosis de

33 mg/m² por infusión continua durante 4 hrs para el primer paciente y durante 8 hrs para el segundo paciente.

2.2.2.4 Obtención de muestras sanguíneas de pacientes del Protocolo

I 1/15.

Se tomaron muestras sanguíneas con EDTA como anticoagulante, a los siguientes tiempos: 0 (previo a la administración de T-514), 0.25, 0.50, 1, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 hrs.

Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm y el plasma se transfirió a tubos de vidrio. Posteriormente, la T-514 y sus posibles metabolitos se extrajeron del plasma por medio de precipitación de proteínas como se describe en el punto 2.2.2.5, para su análisis por HPLC II y posteriormente HPLC I ambos con el eluyente 1a.

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 *in vivo*.

Para la extracción de la T-514 y sus posibles metabolitos de las muestras del modelo *in vivo* se utilizó el método reportado por Salazar y cols.⁶⁹ modificado para el presente trabajo, para lo cual se colocaron 250 $\mu\text{g/ml}$ de plasma de perro o de humano en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 500 μl de acetonitrilo al plasma de perro o 500 μl de metanol al plasma de humano. Los tubos se agitaron durante 30 seg en el vortex y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min, posteriormente el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y se centrifugó a 7000 rpm durante 3 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro y se transfirió a un vial para su posterior análisis por HPLC. En este caso las muestras se analizaron primero por HPLC II con el eluente 1a y posteriormente por HPLC I con el eluente 1a.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 MODELO *IN VITRO*.

3.1.1 Evaluación del metabolismo de la T-514 en microsomas hepáticos.

3.1.1.1 Microsomas hepáticos de ratón.

Los resultados de la exposición de la T-514 a los microsomas hepáticos de ratón, a tres diferentes concentraciones de proteínas microsomales (250, 125 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$), se muestran en la figura 9.

Se observó que hubo un decaimiento en la concentración de la T-514, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizadas. En la curva de detección de la T-514 obtenida de su incubación

con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó que el decaimiento fue abrupto y la desaparición de la T-514 ocurrió a las 6 hrs de incubación.

En la curva de 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales también se observó un decaimiento abrupto, pero menos violento que el observado con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$.

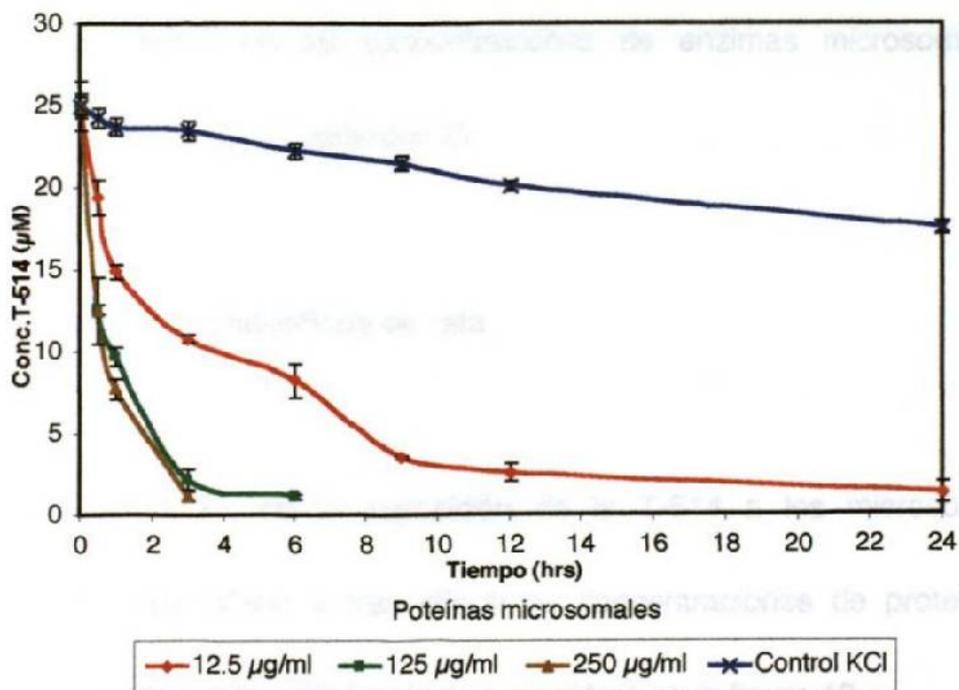


Figura 9. Determinación de T-514 en microsomas hepáticos de ratón. $\bar{X} \pm \text{DE}$ n=3.

Por otro lado en la curva de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó que el decaimiento de la T-514 fue más lento que el observado con las dos concentraciones anteriores.

En la curva obtenida de la detección de la T-514 en las muestras control sólo se observó un ligero decaimiento en la concentración de la misma. En esta especie no se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 con ninguna de las concentraciones de enzimas microsomales utilizadas (figuras 1, 2 y 3, apéndice 2).

3.1.1.2 Microsomas hepáticos de rata.

Los resultados de la exposición de la T-514 a los microsomas hepáticos de rata Wistar a tres diferentes concentraciones de proteínas microsomales (250, 125 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$) se muestran en la figura 10.

Se observó que hubo un decaimiento en la concentración de la T-514, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizada.

En la curva de detección de la T-514 obtenida de su incubación con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó un decaimiento abrupto de la misma.

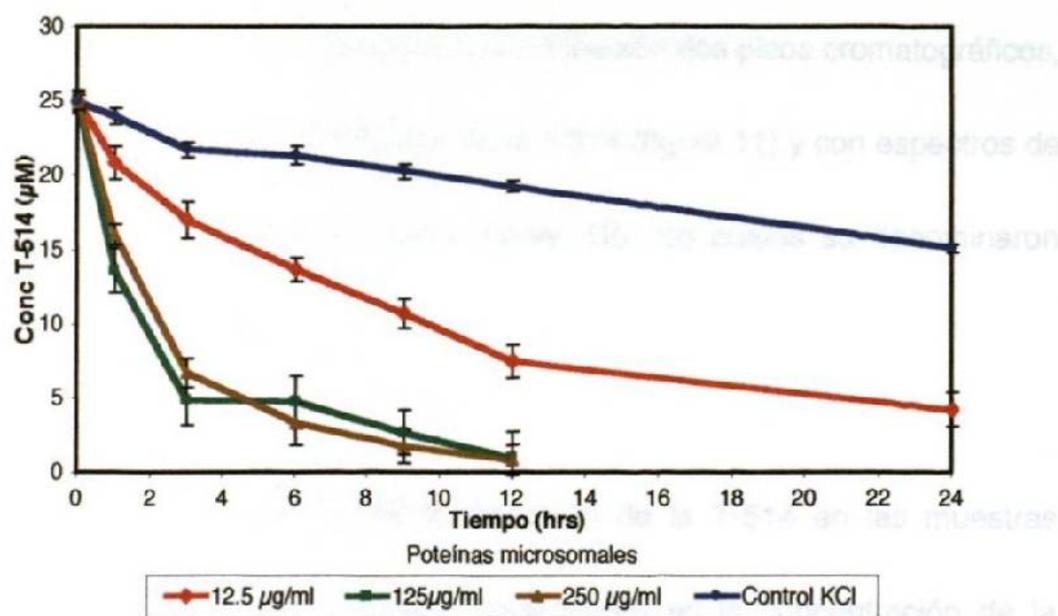


Figura 10. Determinación de T-514 en microsomas de hepáticos de rata. $\bar{X} \pm \text{DE}$. $n=3$

En la curva con la concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales también se observó un decaimiento abrupto de la T-514 en función de tiempo, y no se observó diferencia marcada entre el decaimiento

de la T-514 con esta concentración y la de 250 $\mu\text{g/ml}$. Con estas concentraciones no se detectaron picos cromatográficos distintos al de la T-514 (figuras 4 y 5, apéndice 2).

En la curva de detección de la T-514, con la concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales, el decaimiento de ésta fue más lento lo que se observó claramente en sus cromatogramas (figura 6, apéndice 2) y además se detectaron a las 24 hrs de incubación dos picos cromatográficos, a tiempos de retención distintos al de la T-514 (figura 11) y con espectros de UV-Vis parecidos al de la misma (figura 12), los cuales se denominaron compuestos M1 y M2.

En la curva obtenida de la detección de la T-514 en las muestras control sólo se observó un ligero decaimiento en la concentración de la misma.

Current Chromatogram(s)

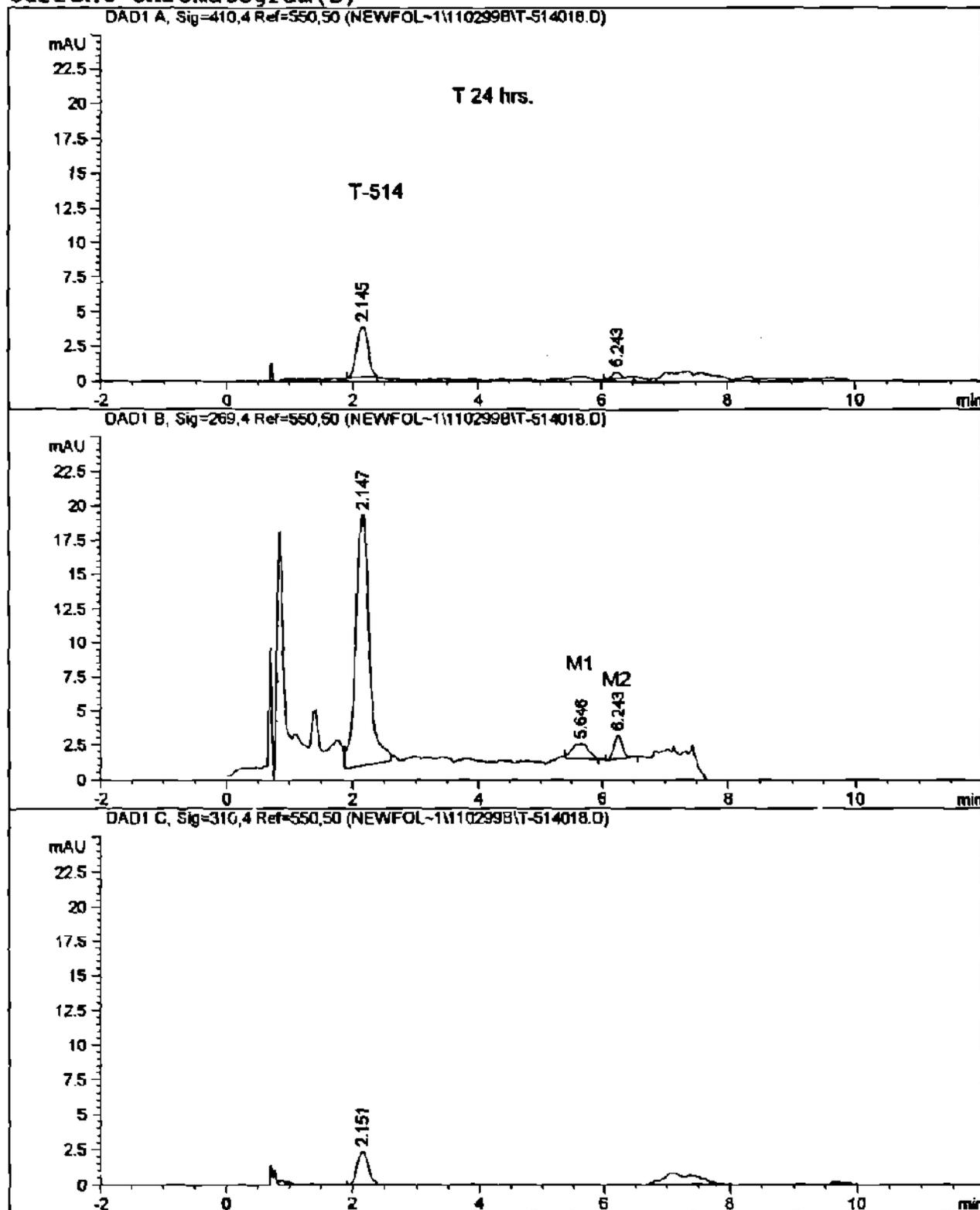


Figura 11. Cromatogramas obtenidos de las muestras de T-514 incubada en microsomas de rata (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

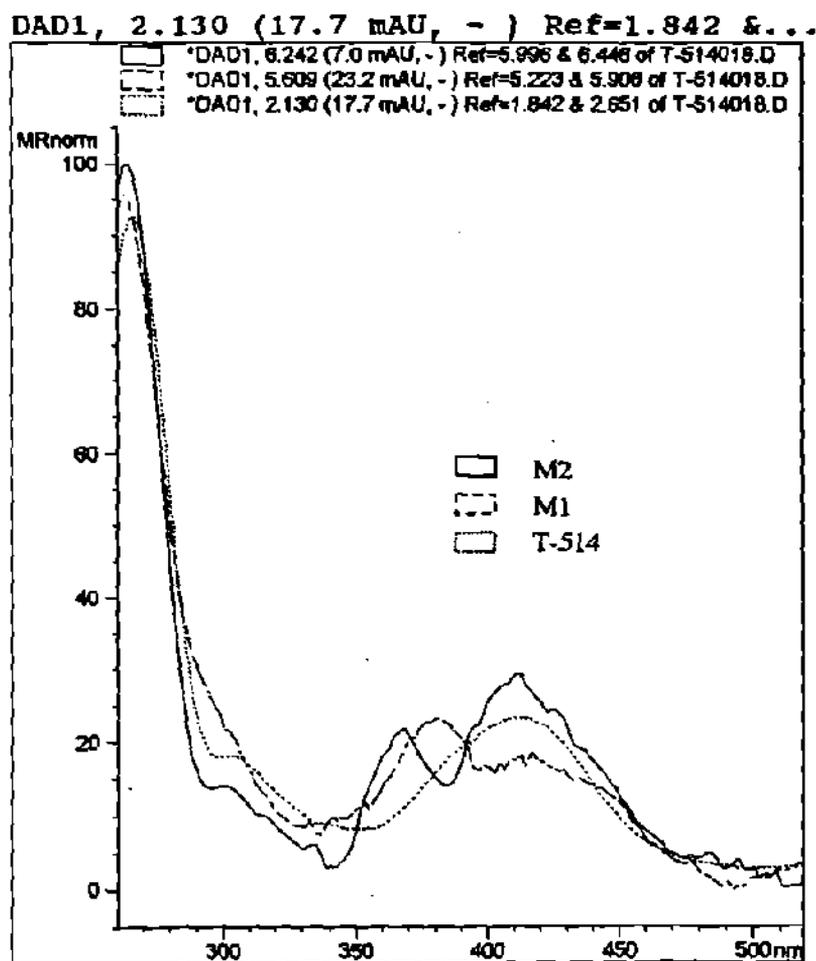


Figura 12. Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en los microsomas de rata.

3.1.1.3 Microsomos hepáticos de cobayo.

Los resultados de la exposición de la T-514 a los microsomas hepáticos de cobayo a tres diferentes concentraciones de proteínas microsomales (250, 125 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$) se muestran en la figura 13.

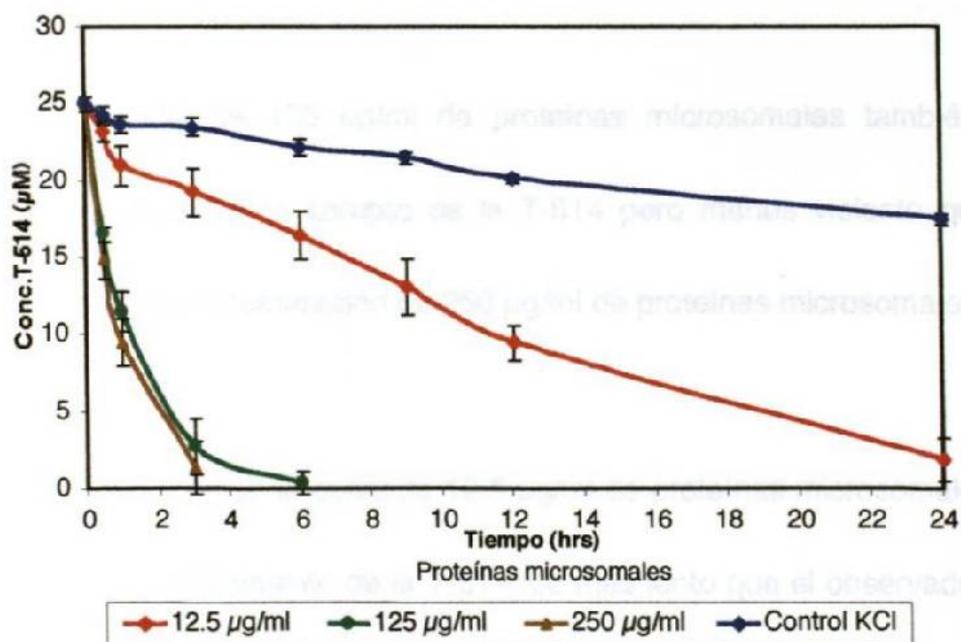


Figura 13. Determinación de la T-514 en microsomas hepáticos de cobayo. $\bar{X} \pm \text{DE}$. $n=3$

Se observó que hubo un decaimiento en la concentración de la T-514, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizada.

En la curva de detección de la T-514 obtenida con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó un decaimiento abrupto de la misma y su desaparición a las 6 hrs de incubación.

En la curva de 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales también se observó un decaimiento abrupto de la T-514 pero menos violento que el observado con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales.

Por otro lado en la curva de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó que el decaimiento de la T-514 fue más lento que el observado con las dos concentraciones anteriores.

En las muestras control sólo se observó un ligero decaimiento en la concentración de la T-514. En esta especie no se detectaron picos

cromatográficos distintos a la T-514 con ninguna de las concentraciones enzimáticas utilizadas (figuras 7, 8 y 9, apéndice 2).

3.1.1.4 Microsomas hepáticos de perro.

Los resultados de la exposición de la T-514 a los microsomas hepáticos de perro, a tres diferentes concentraciones de proteínas microsomales (250, 125 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se muestran en la figura 14.

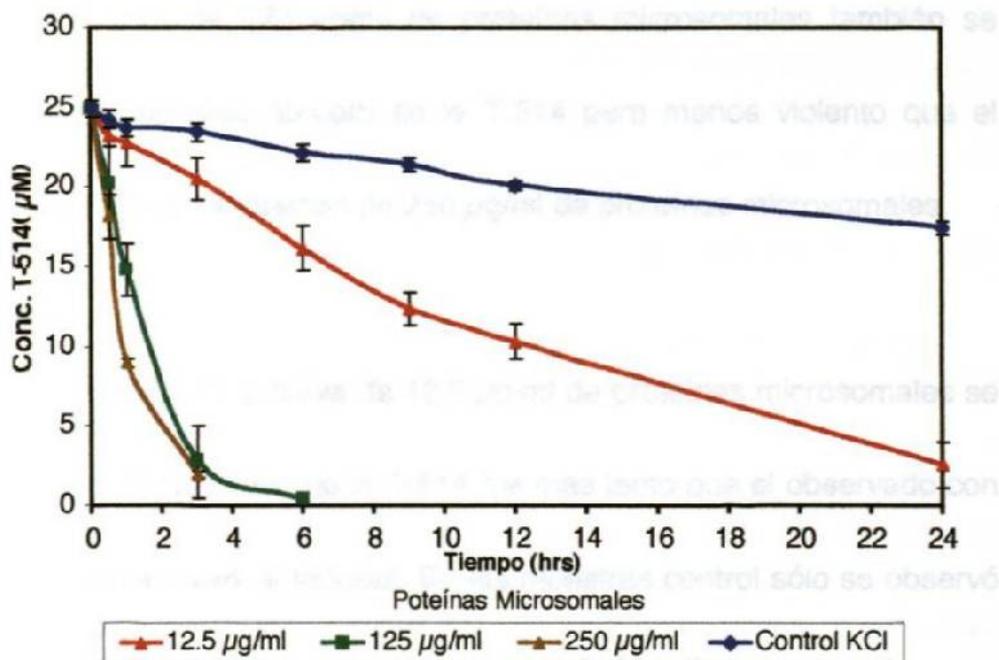


Figura 14. Determinación de la T-514 en microsomas hepáticos de perro. $X \pm DE$. $n=3$.

Se observó que hubo un decaimiento en la concentración de la T-514, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizada.

En la curva de detección de la T-514 con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó un decaimiento abrupto de la misma y su desaparición a las 6 hrs de incubación.

En la curva de 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales también se observó un decaimiento abrupto de la T-514 pero menos violento que el observado con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales.

Por otro lado en la curva de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó que el decaimiento de la T-514 fue más lento que el observado con las dos concentraciones anteriores. En las muestras control sólo se observó un ligero decaimiento en la concentración de la T-514. En esta especie no se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 con ninguna de las concentraciones enzimáticas utilizadas (figuras 10, 11 y 12, apéndice 2).

3.1.1.5 Microsomas hepáticos de mono.

Los resultados de la exposición de la T-514 a los microsomas hepáticos de mono a tres diferentes concentraciones de proteínas microsomales (250, 125 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$) se muestran en la figura 15.

En este caso al igual que en los microsomas de las otras especies se observó que hubo un decaimiento en la concentración de la T-514, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizadas.

En la curva de detección de la T-514, obtenida de su incubación con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se observó un decaimiento abrupto de la misma, mientras que en la curva de 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales el decaimiento fue abrupto, pero menos violento.

A estas concentraciones no se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 con ninguna de las concentraciones enzimáticas utilizadas (figuras 13 y 14, apéndice 2).

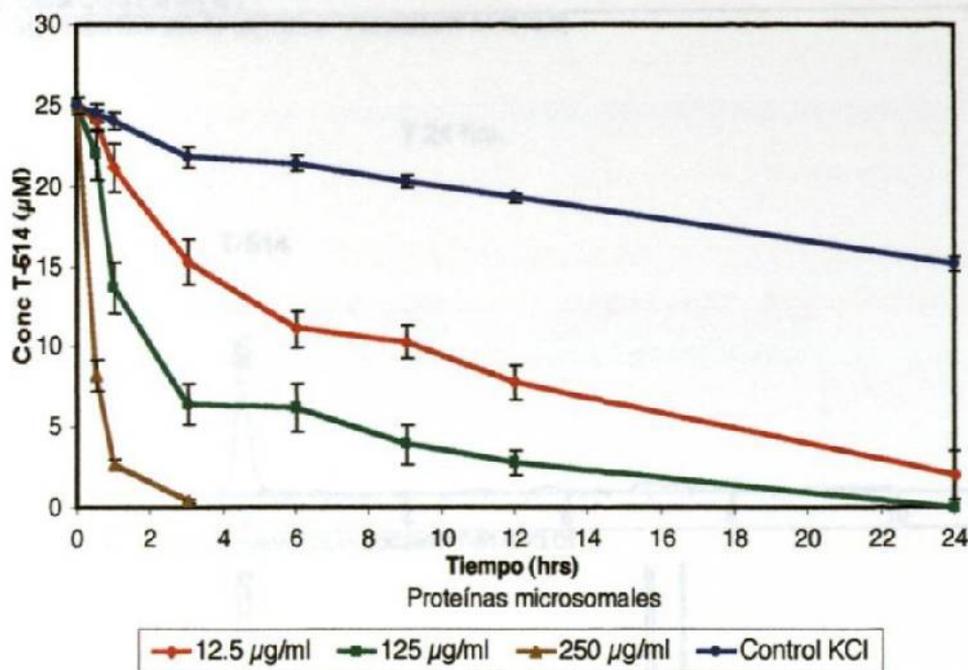


Figura 15. Determinación de T-514 en microsomas hepáticos de mono. $\bar{X} \pm DE$. n=3

En la curva obtenida con 12.5 µg/ml de proteínas microsomales se observó que el decaimiento de la T-514 se enlenteció notoriamente lo que se pudo observar claramente en los cromatogramas correspondientes (figura 15, apéndice 2). Además en este caso, se detectó a las 24 hrs de incubación, un pico cromatográfico a Tr distinto al de la T-514 (figura 16) y con un espectro UV-Vis parecido al de la misma (figura 17), el cual correspondió al pico del compuesto M1 detectado en los microsomas de rata. En las muestras control sólo se observó un ligero decaimiento en la concentración de la T-514.

Current Chromatogram(s)

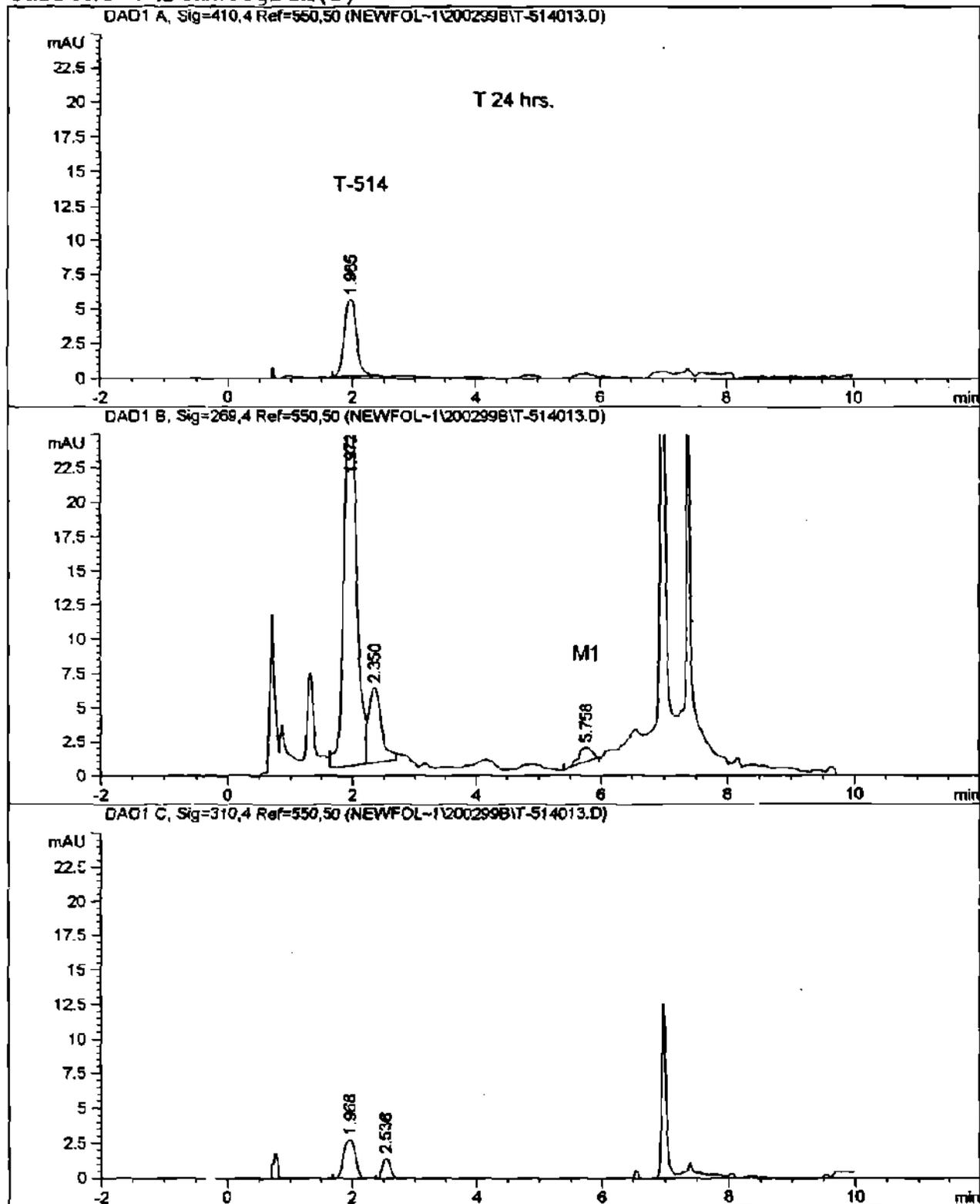


Figura 16. Cromatogramas obtenidos de las muestras de T-514 incubada en microsomas de mono (12.5 $\mu\text{g/ml}$).

DAD1, 1.963 (24.6 mAU, -) Ref=1.667 &...

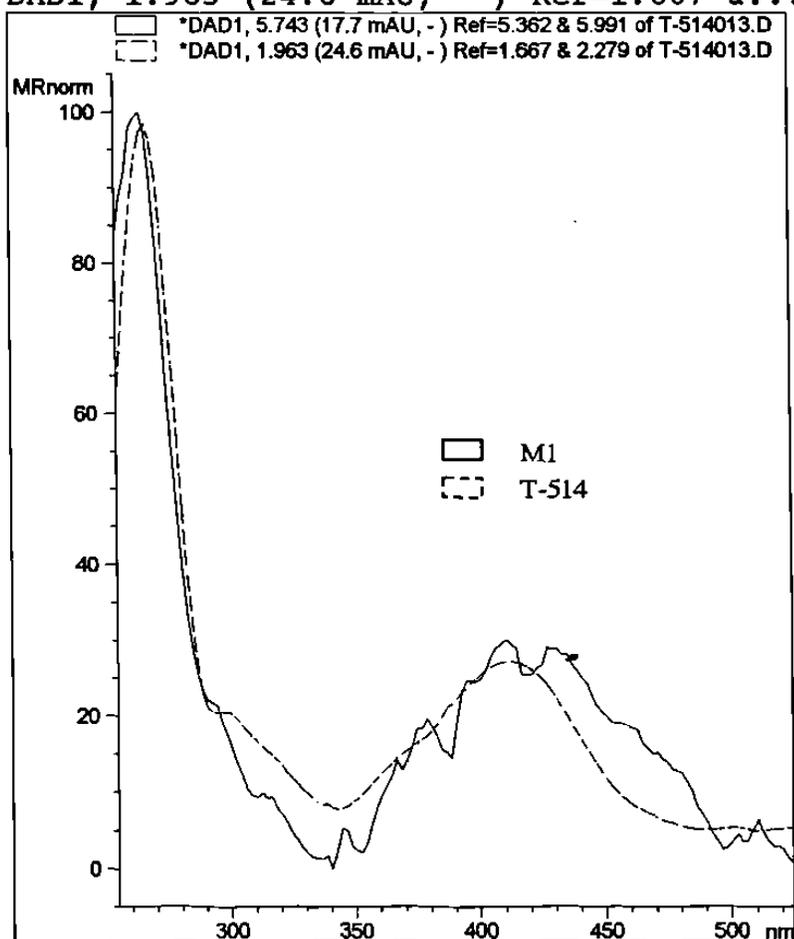


Figura 17. Espectros UV-Vis de la T-514 y del compuesto M1 detectados en los microsomas de mono.

3.1.1.6 Microsomas hepáticos de origen humano.

Los resultados de la exposición de la T-514 a los microsomas hepáticos de origen humano, a tres diferentes concentraciones de proteínas microsomales (250, 125 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$) se muestran en la figura 18.

Se observó que hubo un decaimiento en la concentración de la T-514, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizada.

El decaimiento en la concentración de la T-514 fue abrupto en el caso de la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales y se observó su desaparición cromatográfica a las 12 hrs de incubación.

Con la concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales también se observó un decaimiento abrupto, pero menos violento que el observado con la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$.

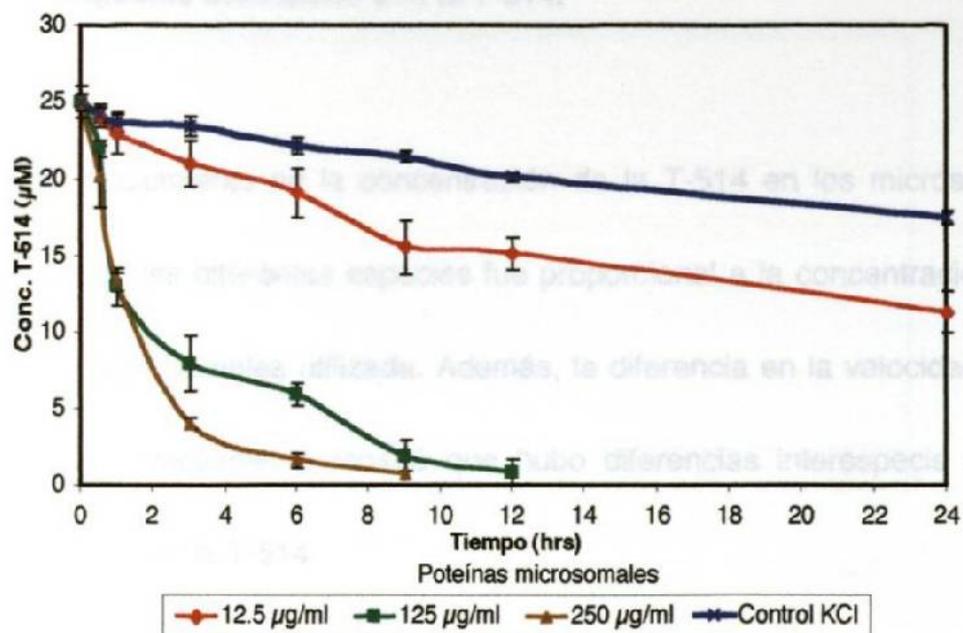


Figura 18. Determinación de T-514 en microsomas hepáticos de origen humano. $\bar{X} \pm DE$, n=3

Por otro lado en la curva de 12.5 µg/ml de proteínas microsomales se observó que el decaimiento de la T-514 fue más lento que el observado con las dos concentraciones anteriores.

En las muestras control sólo se observó un ligero decaimiento en la concentración de la T-514. En los microsomas de origen humano no se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 con ninguna de las concentraciones enzimáticas utilizadas (figuras 16, 17 y 18, apéndice 2).

3.1.1.7 Comparación de la actividad de microsomas de diferentes especies incubados con la T-514.

El decaimiento en la concentración de la T-514 en los microsomas hepáticos de las diferentes especies fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizada. Además, la diferencia en la velocidad con la ocurrió el decaimiento mostró que hubo diferencias interespecie en la transformación de la T-514.

En el caso de la concentración mayor de proteínas microsomales (250 $\mu\text{g/ml}$) el decaimiento de la T-514 fue abrupto y ésta solo pudo ser detectada hasta las 3 hrs en los microsomas de mono, ratón, cobayo y perro. Por otro lado en los microsomas de rata y de origen humano la T-514 aún pudo ser detectada a las 9 hrs (figura 19).

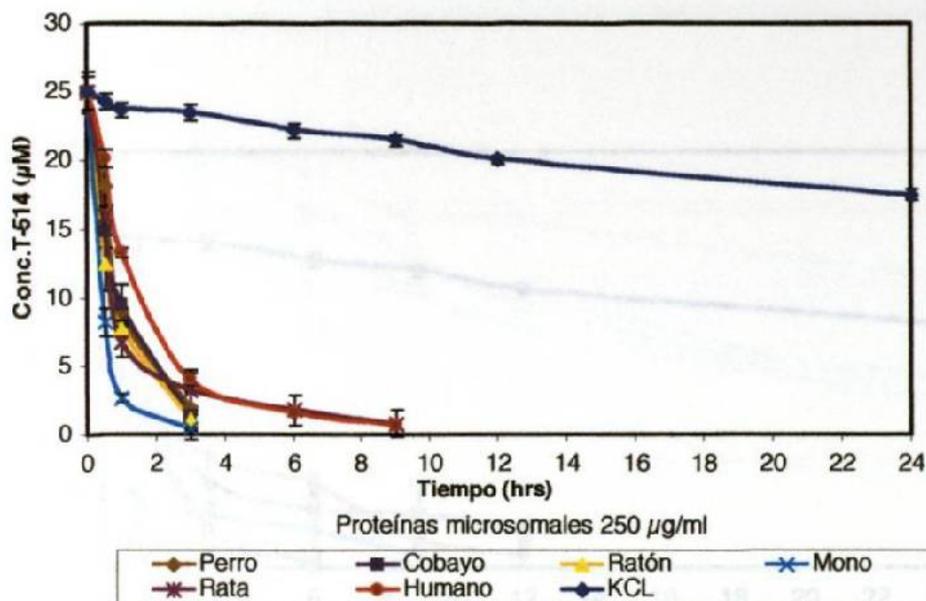


Figura 19. Gráfica comparativa de la detección de T-514 en microsomas hepáticos de distintas especies expuestas a 25µM de T-514. $\bar{X} \pm DE$. n=3

Con la concentración de 125 µg/ml de proteínas microsomales la velocidad en el decaimiento de la T-514 fue menor y ésta pudo ser detectada hasta las 6 hrs en los microsomas de ratón y cobayo, hasta las 9 hrs en los de mono y hasta las 12 hrs en los de rata y humano (figura 20).

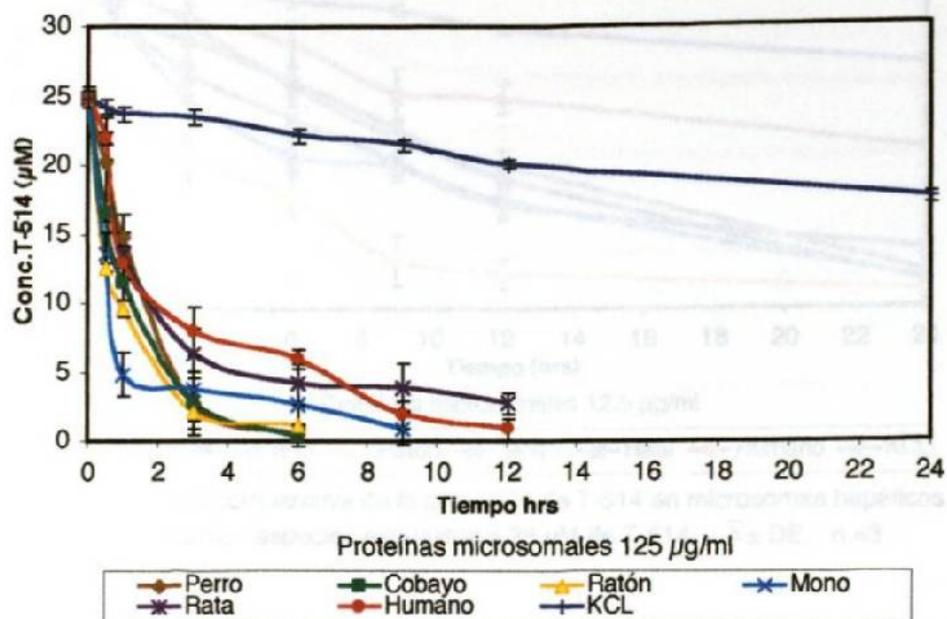


Figura 20. Gráfica comparativa de detección de T-514 en microsomas hepáticos de distintas especies expuestas a 25µM de T-514. $\bar{X} \pm DE$. n=3

Con la concentración de 12.5 µg/ml de proteínas microsomales la velocidad del decaimiento de la T-514 fue menor y en este caso permitió la detección de la T-514 aún a las 24 hrs. El decaimiento más rápido en la concentración de la T-514 se observó en los microsomas de ratón. Por otro lado el decaimiento más lento se produjo en los microsomas de origen humano (figura 21).

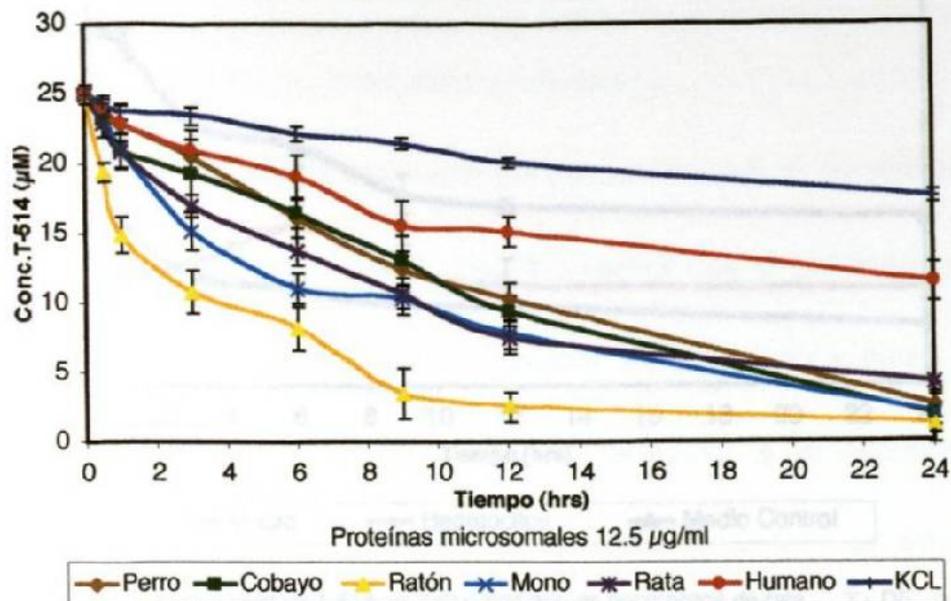


Figura 21. Gráfica comparativa de la detección de T-514 en microsomas hepáticos de distintas especies expuestas a 25 µM de T-514. $\bar{X} \pm DE$. n = 3

3.1.2 Evaluación del metabolismo de la T-514 en cultivo primario de hepatocitos de origen animal y humano.

3.1.2.1 Cultivo primario de hepatocitos de rata.

Los resultados de la exposición del cultivo primario de hepatocitos de rata a la T-514 se muestran en la figura 22.

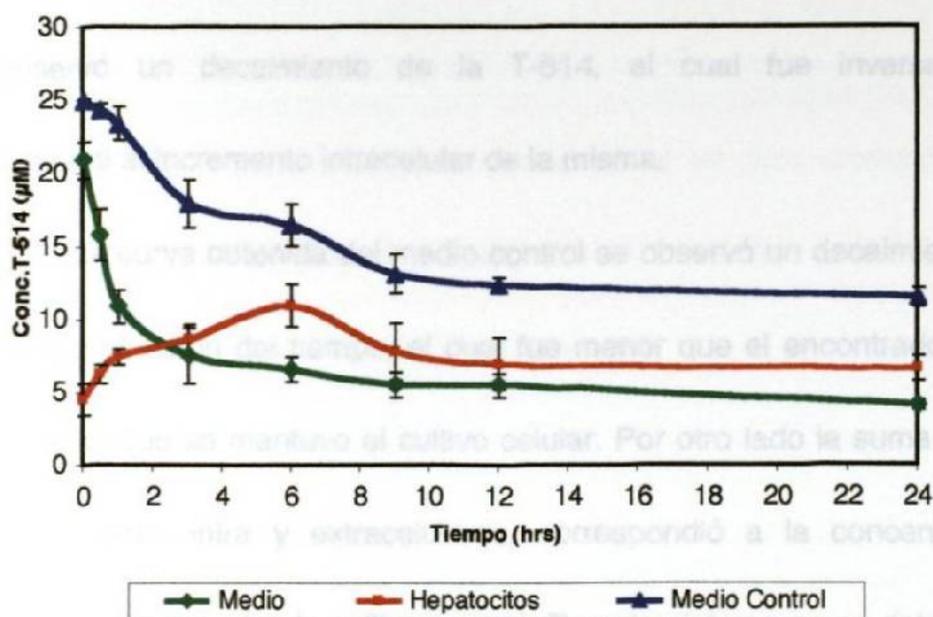


Figura 22. Determinación de T-514 en cultivo primario de hepatocitos de rata. $\bar{X} \pm DE$. $n=6$.

En la curva de la concentración de T-514 obtenida de la monocapa celular expuesta a la misma, inicialmente se observó un incremento progresivo de la T-514 en las células hasta alcanzar su máxima concentración intracelular a las 6 hrs y a partir de ese momento se observó un decaimiento en su concentración, para posteriormente entrar en fase de equilibrio.

En la curva obtenida del medio en el que se mantuvo el cultivo celular se observó un decaimiento de la T-514, el cual fue inversamente proporcional al incremento intracelular de la misma.

En la curva obtenida del medio control se observó un decaimiento de la T-514 en función del tiempo, el cual fue menor que el encontrado en el medio en el que se mantuvo el cultivo celular. Por otro lado la suma de las concentraciones intra y extracelulares, correspondió a la concentración encontrada en el medio de cultivo control. En este sistema no se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 (figuras 19-21, apéndice 2).

3.1.2.2 Cultivo primario de hepatocitos de origen humano.

Los resultados de la exposición del cultivo primario de hepatocitos de origen humano se muestran en la figura 23.

En la curva de concentración de T-514 obtenida de la monocapa celular, inicialmente se observó un incremento progresivo de la concentración de T-514 en las células a partir de la hora, hasta alcanzar su

máxima concentración intracelular a las 9 hrs y a partir de ese momento hubo un decaimiento en la concentración, para posteriormente entrar en fase de equilibrio. En este caso se encontró además un pico cromatográfico (figura 24) que apareció a partir de las 9 hrs de incubación el cual tuvo un espectro UV-Vis parecido al de la T-514 (figura 25).

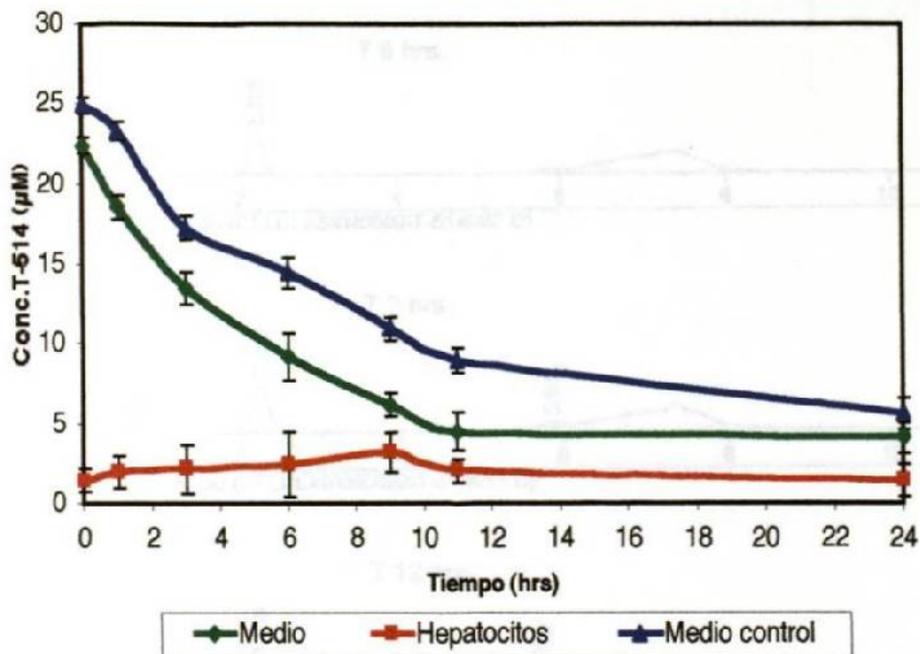


Figura 23. Determinación de T-514 en cultivo primario de hepatocitos de origen humano.

$\bar{X} \pm DE$, n=6.

Current Chromatogram(s)

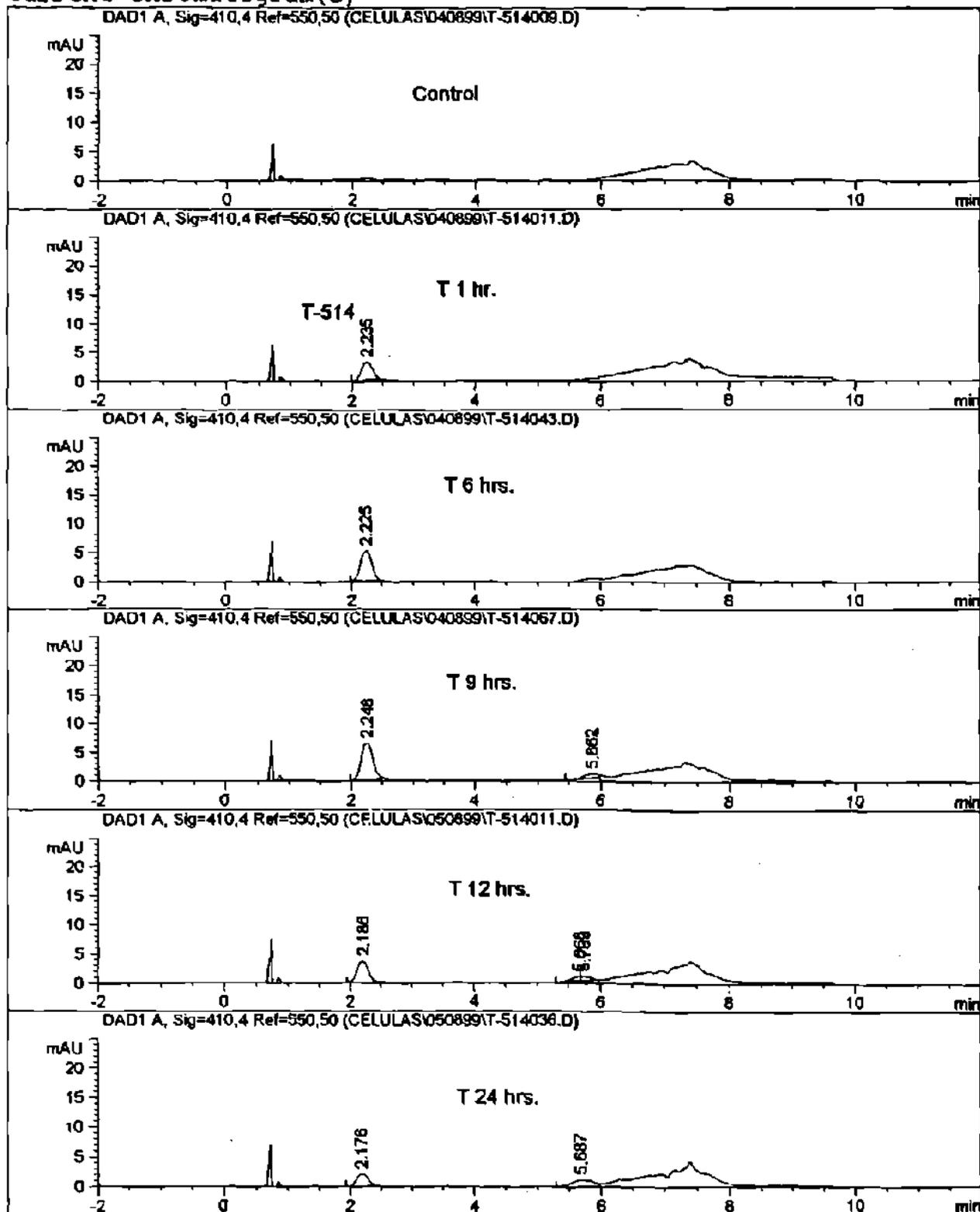


Figura 24. Cromatogramas obtenidos de las muestras de hepatocitos de origen humano expuestos a la T-514.

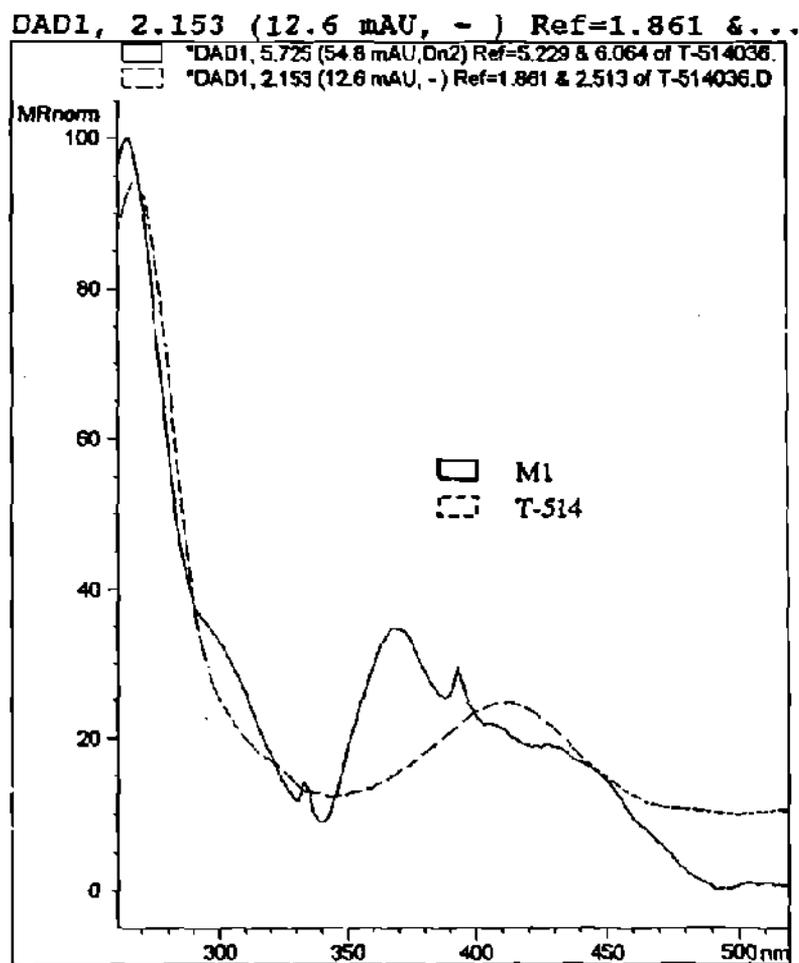


Figura 25. Espectros UV-Vis de la T-514 y del compuesto M1 detectados en los hepatocitos de origen humano.

En la curva de las muestras de medio en el que se mantuvo el cultivo celular, se observó un decaimiento de la concentración de la T-514 en función del tiempo y se detectaron a partir de las tres horas de incubación dos picos cromatográficos con T_r y con espectros UV-Vis distintos al de la T-514 (figuras 26 y 27). Estos picos cromatográficos se incrementaron con el tiempo de incubación, así como, con la disminución de la concentración de la T-514.

En la curva obtenida del medio control (sin células), se observó un decaimiento en la concentración de la T-514 en función del tiempo, el cual fue menos intenso que el observado en el medio donde se mantuvo el cultivo. En este caso se encontraron dos picos cromatográficos con T_r diferentes al de la T-514 (figura 28) y con espectros de UV-Vis parecidos al de la misma (figura 29). Estos picos aparecieron a partir de las 3 hrs y aumentaron conforme transcurrió el tiempo de incubación. Tanto los picos detectados en el medio control como los del medio en el que se mantuvieron las células, correspondieron a los compuestos M1 y M2 detectados en los microsomas de rata.

Current Chromatogram(s)

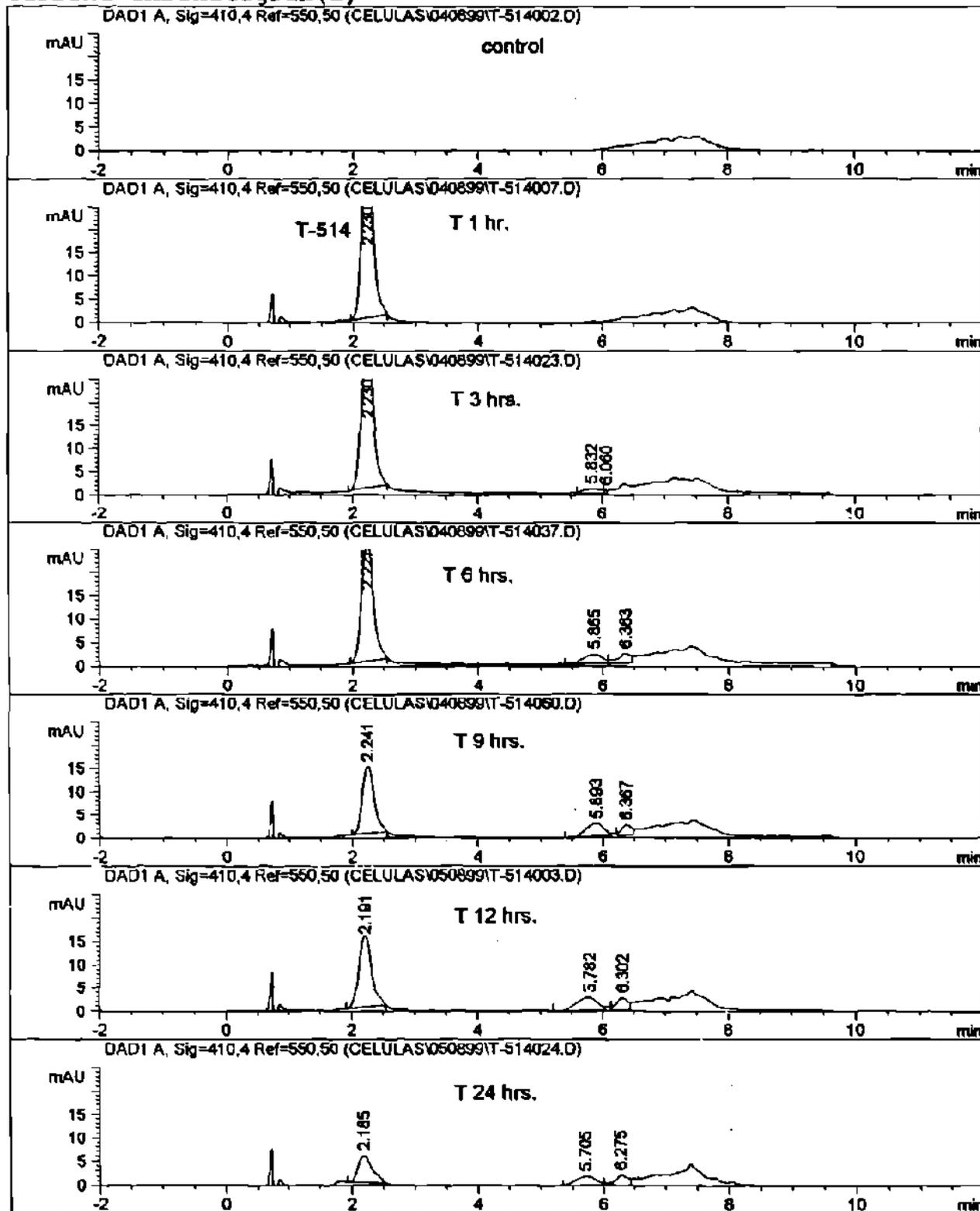


Figura 26. Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 en el medio donde se cultivaron los hepatocitos de origen humano.

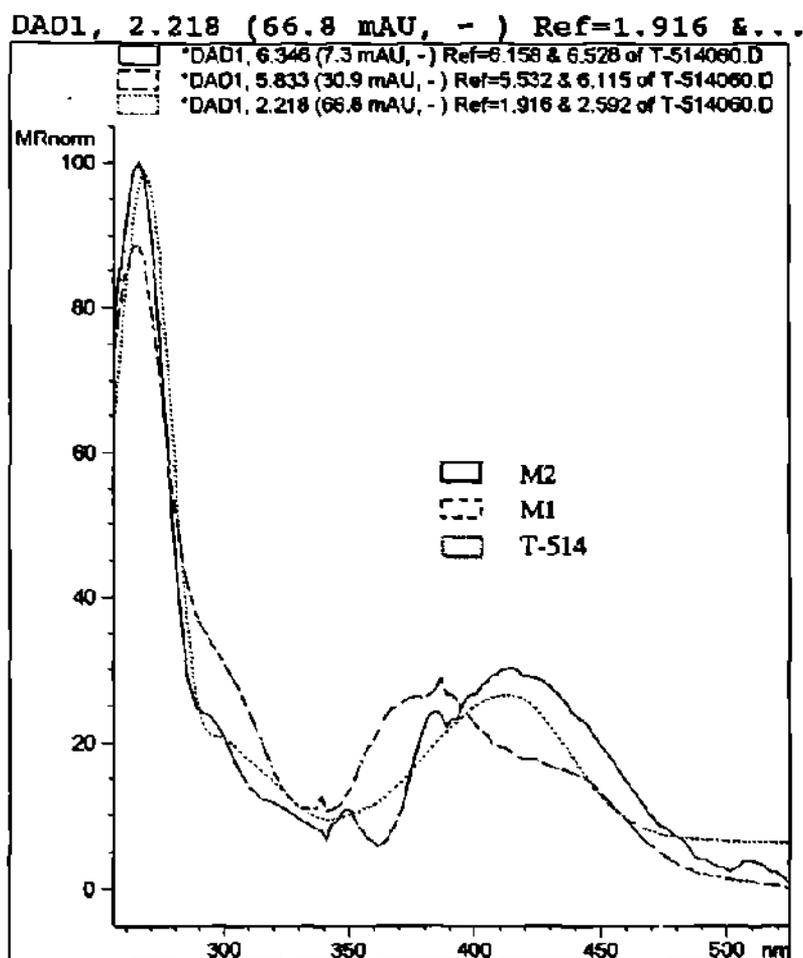


Figura 27. Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en el medio donde se cultivaron los hepatocitos de origen humano.

Current Chromatogram(s)

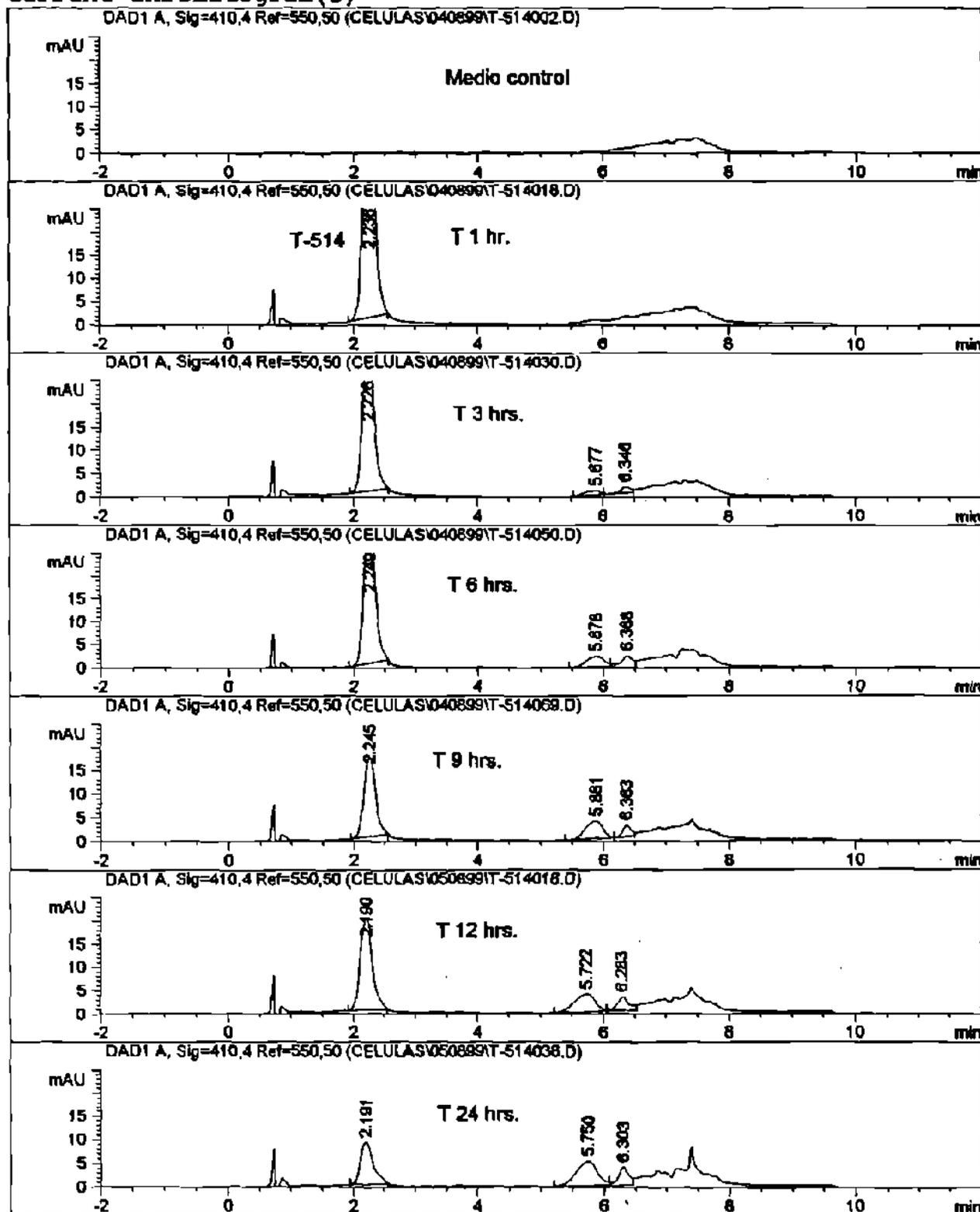


Figura 28. Cromatogramas obtenidos de las muestras del medio (control) incubado con T-514.

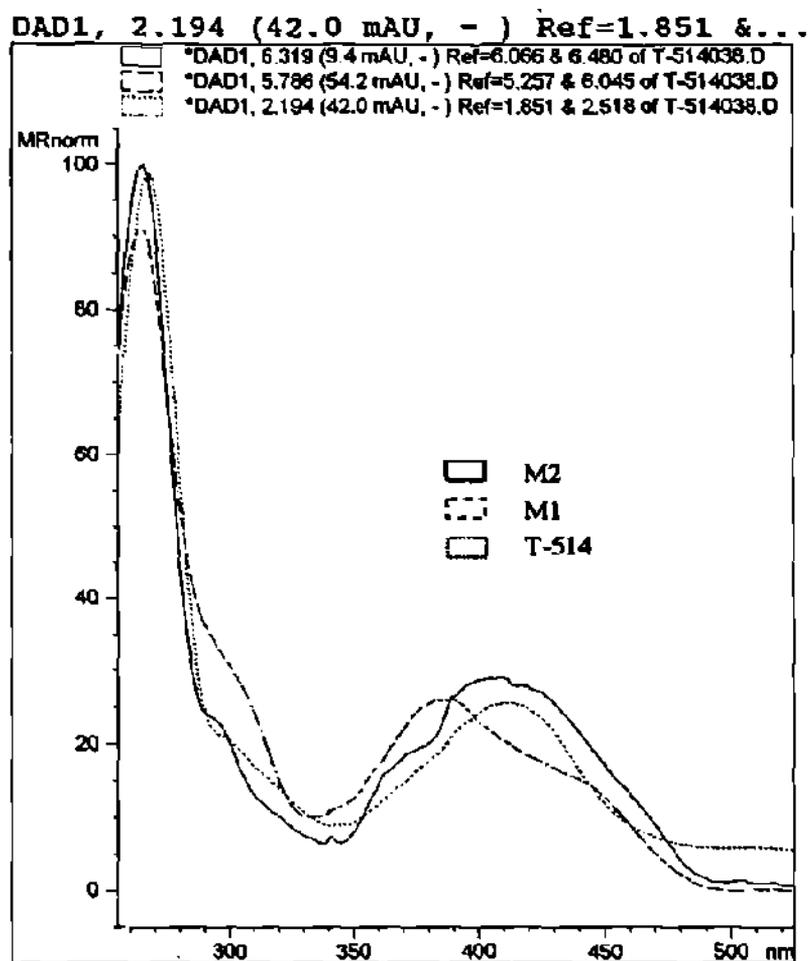


Figura 29. Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en el medio control.

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.

Los resultados obtenidos de la incubación de la T-514 en las soluciones amortiguadoras fueron los siguientes:

En la curva de concentración de la T-514 obtenida de su incubación en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3, se observó un decaimiento abrupto en la concentración de la misma, el cual también se observó en la solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.0 y con la de citratos a pH 3.5, pero en estos dos últimos casos el decaimiento fue menos abrupto (figura 30).

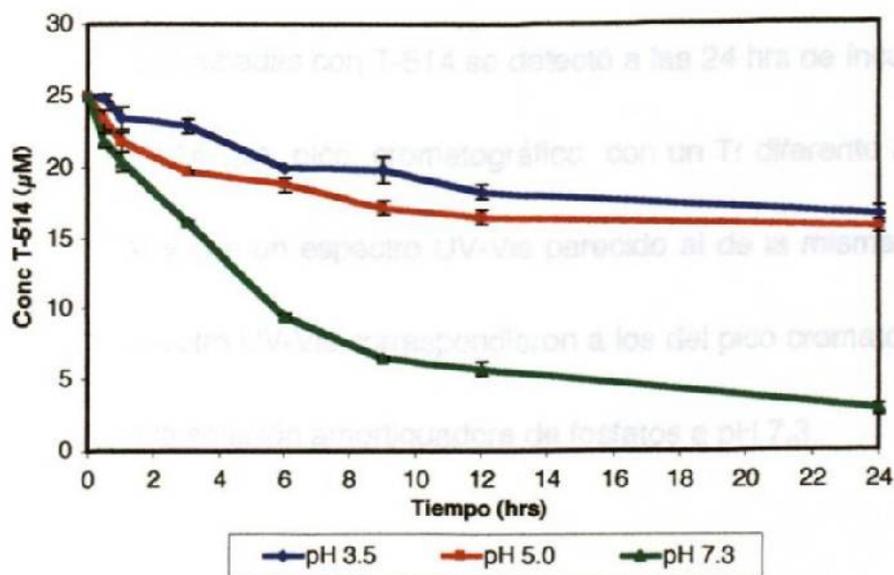


Figura 30. Determinación de T-514 en soluciones amortiguadoras según Sørensen a diferente pH. $\bar{X} \pm DE$ n=3

En el análisis cromatográfico de las muestras obtenidas de la T-514 en la solución de fosfatos a pH 7.3, se detectaron además de la T-514, dos picos cromatográficos, los cuales aparecieron a partir de la primera hora de incubación y se incrementaron con el tiempo. Los Tr de los picos detectados fueron diferentes al de la T-514 (figura 31) y sus espectros UV-Vis fueron parecidos al de la misma (figura 32). Ambos picos correspondieron a los picos (M1 y M2) previamente detectados en los microsomas de rata (figura 33), por lo que fueron nombrados de la misma manera.

En el análisis cromatográfico de las muestras de la solución de fosfatos a pH 5.0 incubadas con T-514 se detectó a las 24 hrs de incubación además de la T-514, un pico cromatográfico con un Tr diferente al de la T-514 (figura 34) y con un espectro UV-Vis parecido al de la misma (figura 35). El Tr y el espectro UV-Vis correspondieron a los del pico cromatográfico M1 detectado en la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3.

Current Chromatogram(s)

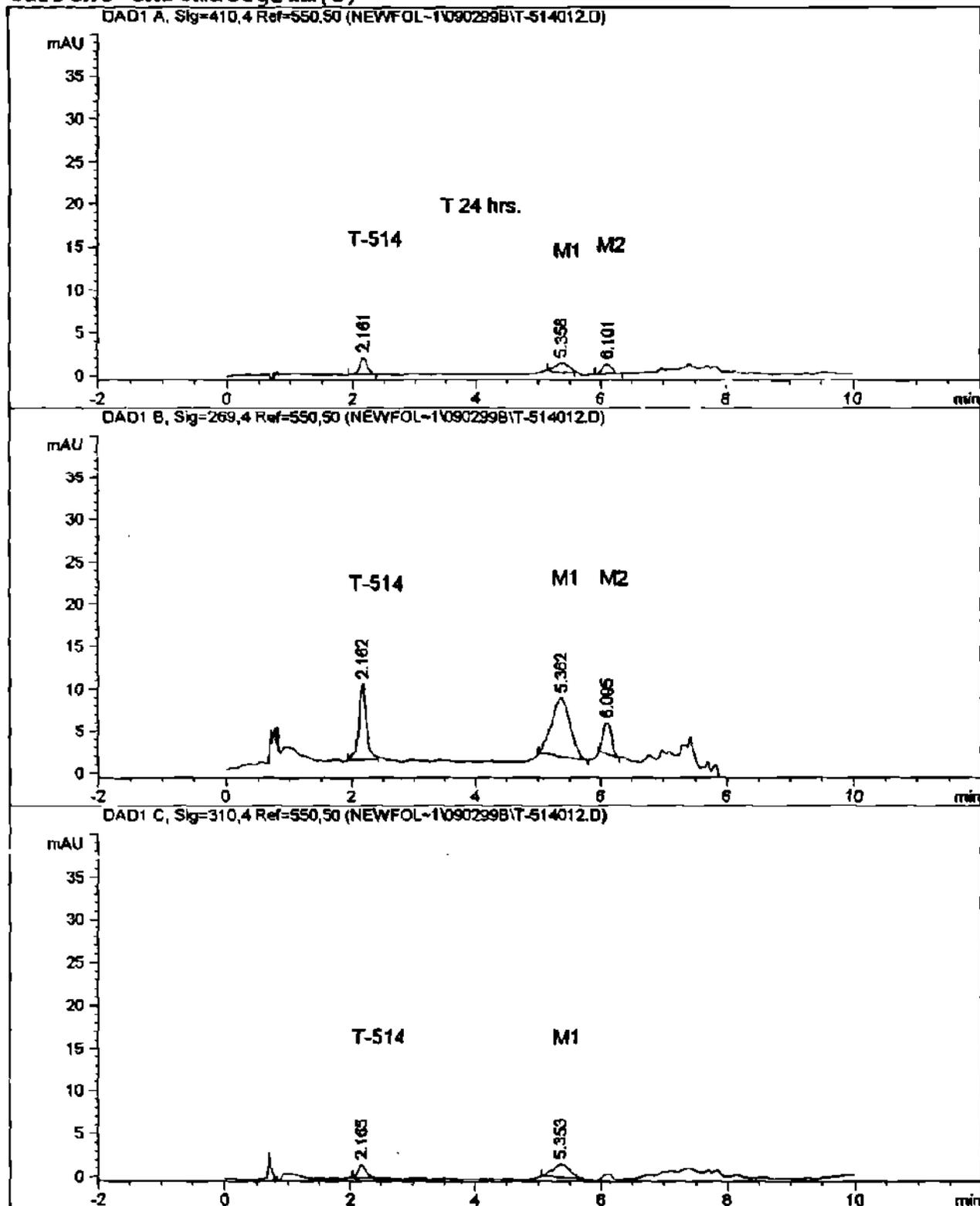


Figura 31. Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 incubada en solución de fosfatos a pH de 7.3.

DAD1, 6.085 (6.3 mAU, -) Ref=5.859 & ...

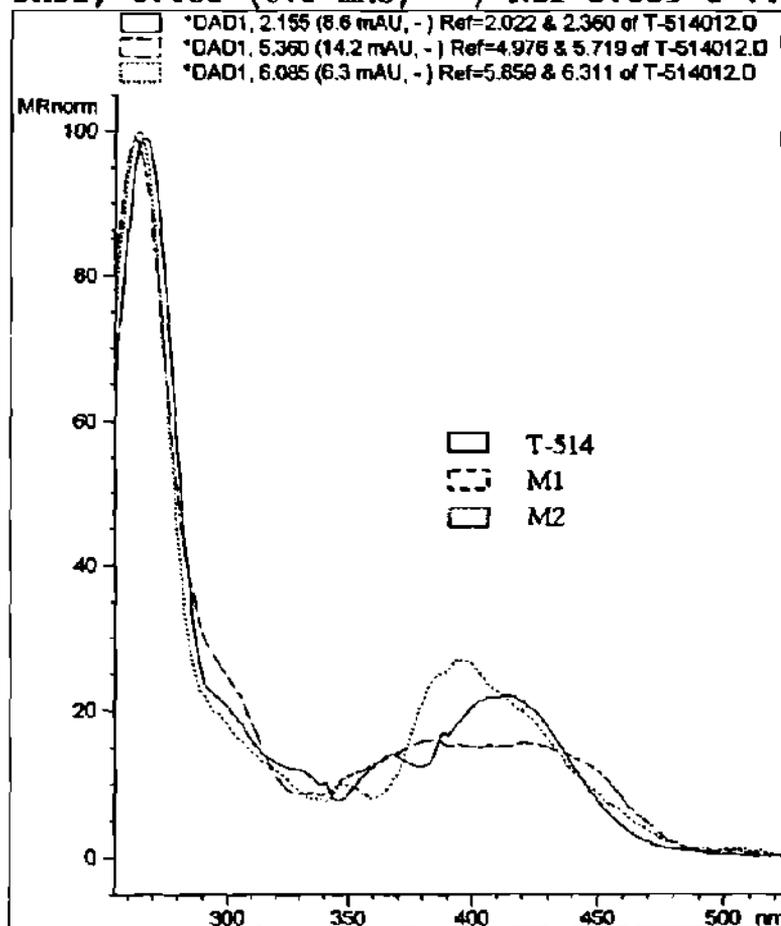


Figura 32. Espectros UV-Vis de la T-514 y de los compuestos M1 y M2 detectados en la solución de fosfatos a pH 7.3.

Current Chromatogram(s)

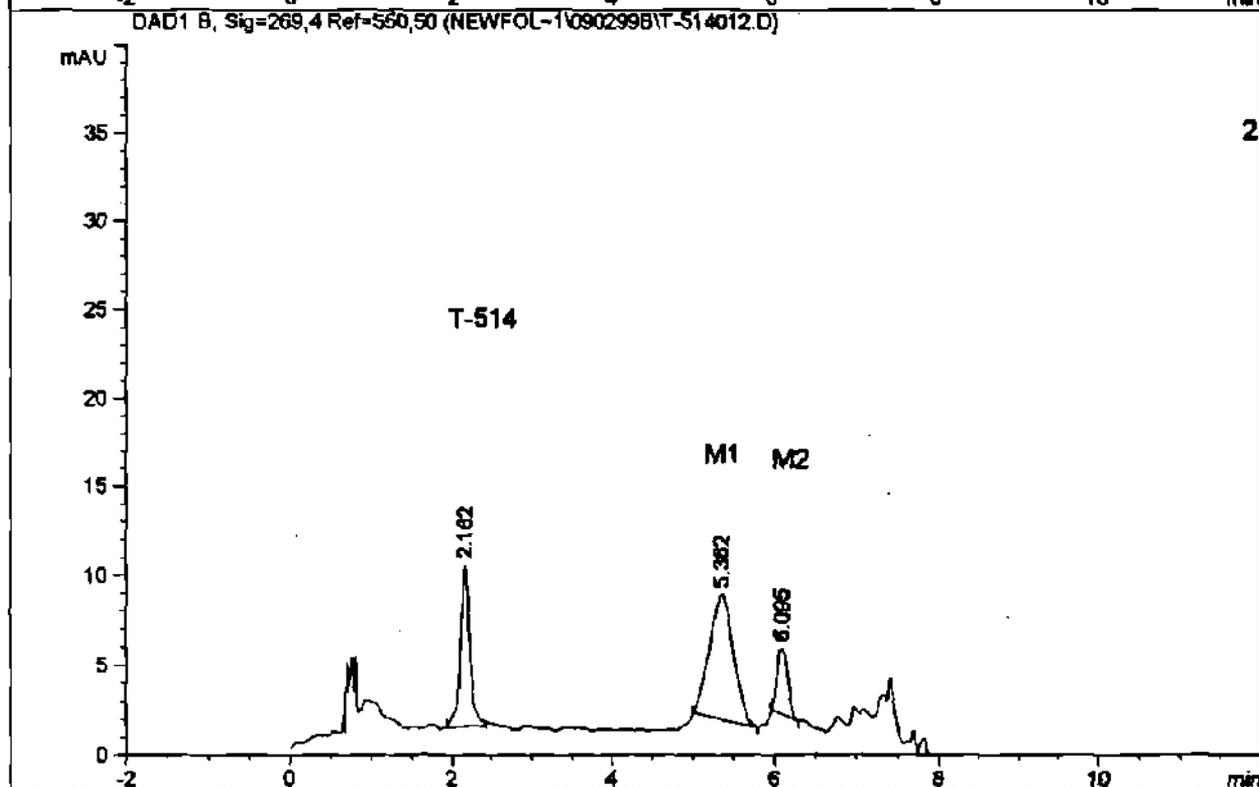
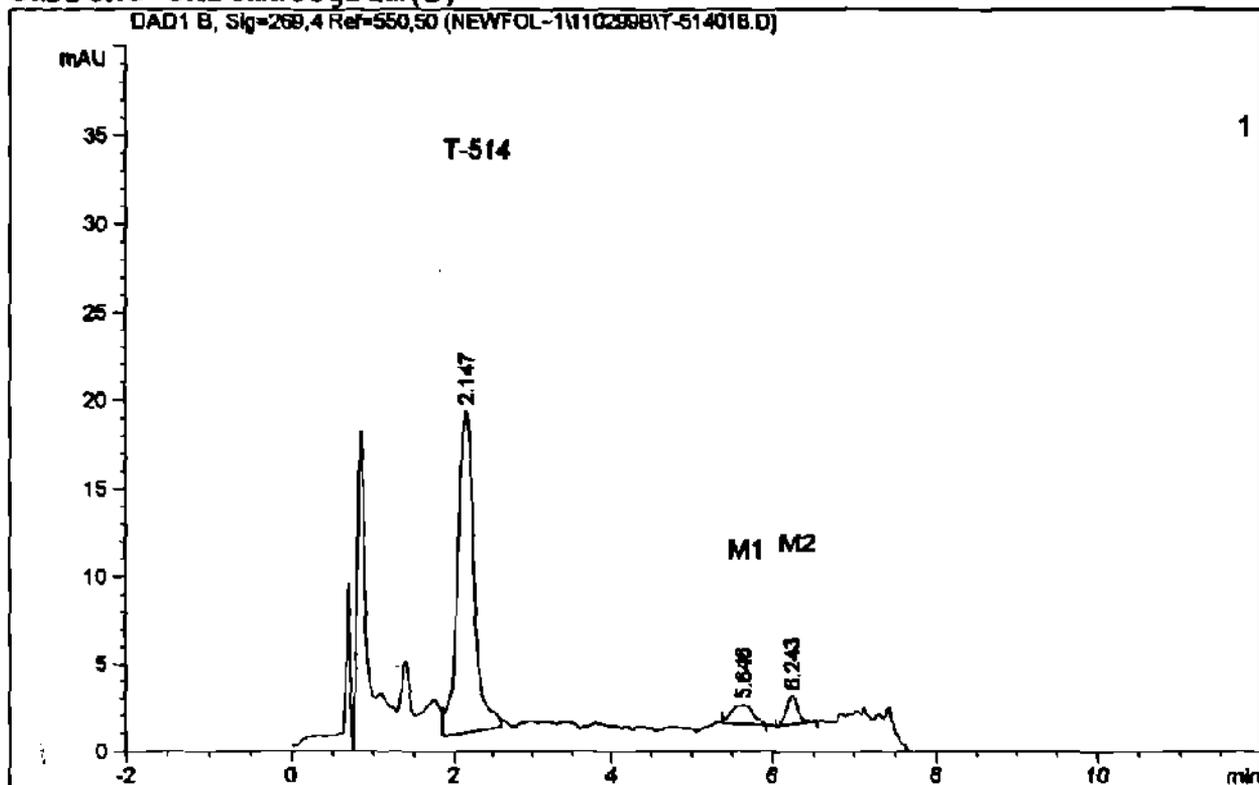


Figura 33. Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 incubada en microsomas de rata (1) y en la solución de fosfatos a pH 7.3 (2).

Current Chromatogram(s)

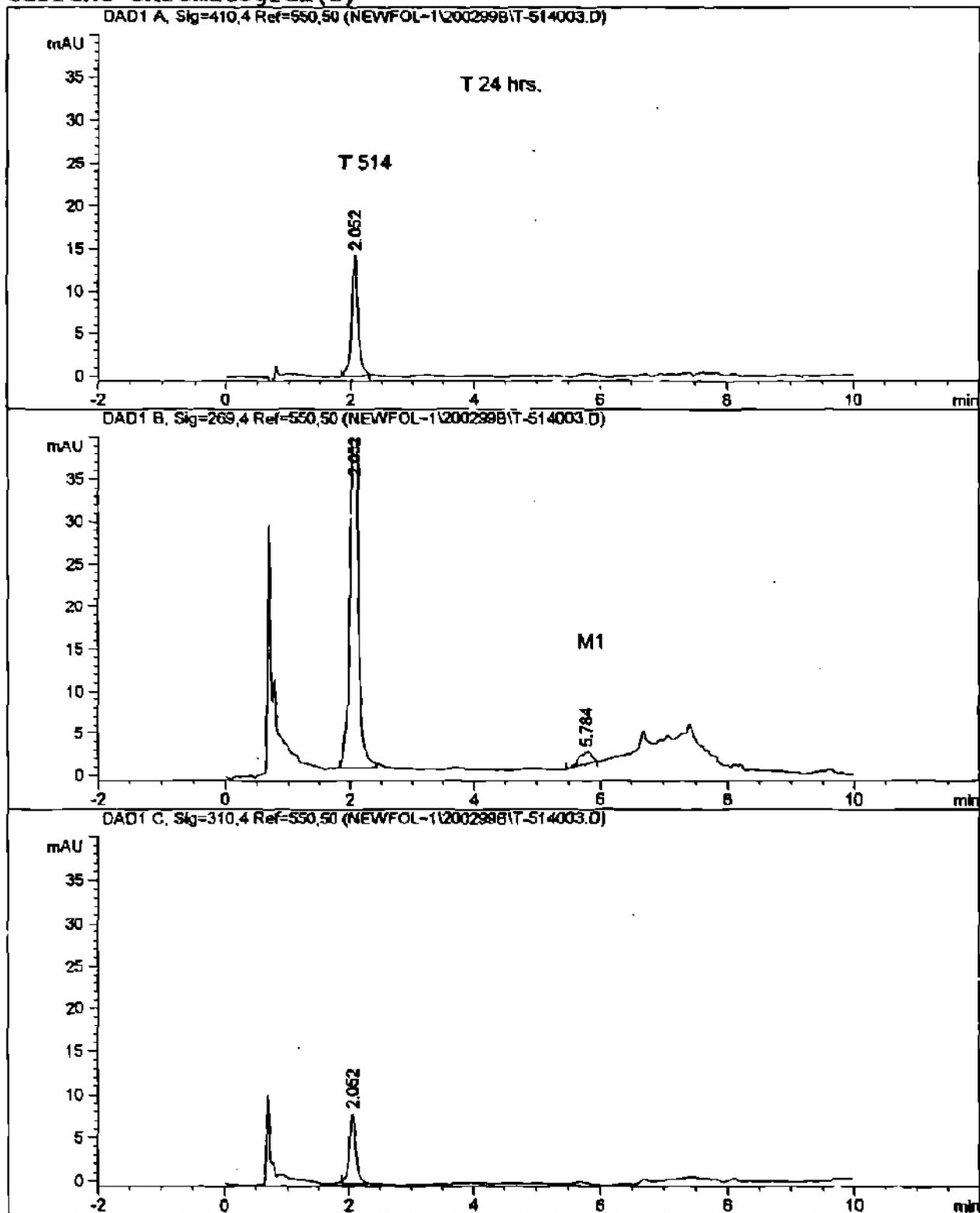


Figura 34. Cromatogramas obtenidos de las muestras de la T-514 incubada en la solución de fosfatos a pH 5.0.

DAD1, 5.792 (11.6 mAU, -) Ref=5.496 &...

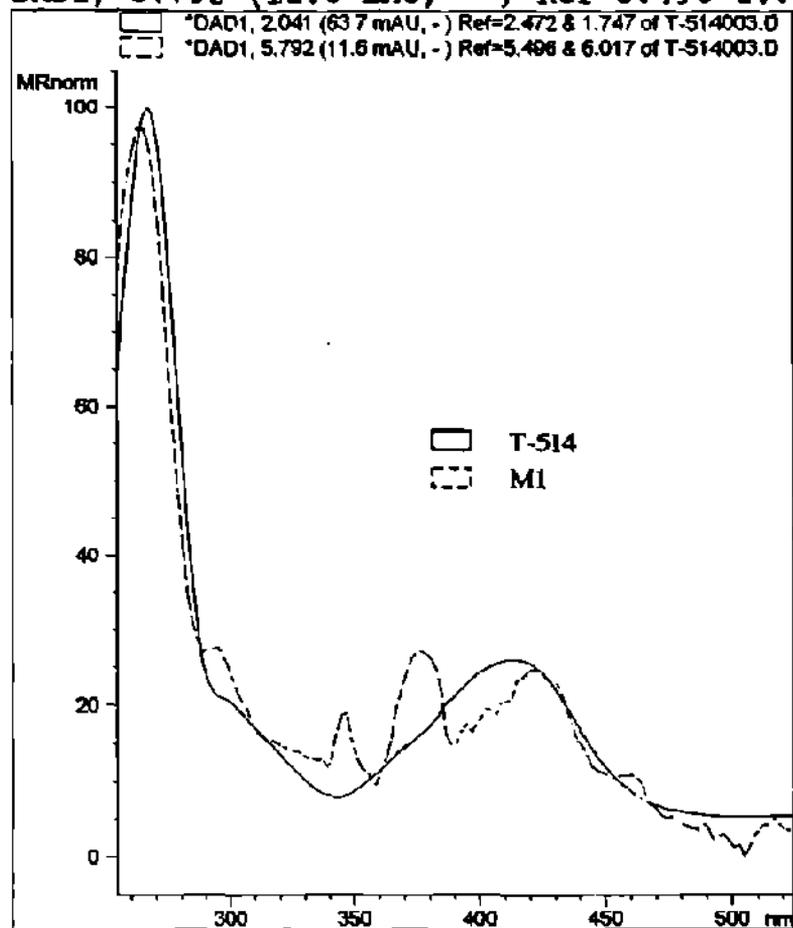


Figura 35. Espectros UV-Vis de la T-514 y del compuesto M1 detectados en la solución de fosfatos a pH 5.0.

Debido a que los picos cromatográficos detectados en la solución amortiguadora de fosfatos correspondieron cromatográficamente a los detectados en los microsomas de rata y mono y considerando que en estos sistemas enzimáticos el proceso de degradación de la T-514 ocurrió rápidamente y que la cantidad de muestra fue muy poca, lo que dificultó el aislamiento de los mismos, se decidió incubar a la T-514 a mayor concentración en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 para obtener los productos a mayor escala y aislarlos a partir de esa solución.

El procedimiento empleado para el aislamiento y purificación de los productos de degradación de la T-514 obtenidos de esta manera se muestra en el apéndice 1.

3.1.2.4 Resultados del análisis de los productos de degradación de la T-514 obtenidos de la solución amortiguadora de fosfatos.

Los productos de degradación de la T-514 obtenidos a partir de la solución de fosfatos a pH 7.3, se analizaron por CCF en sílica gel con el

eluyente 1b y se utilizó a la T-514 como estándar de referencia. En este sistema se detectaron por observación bajo la luz de lámpara UV (375.0 nm), dos compuestos además de la T-514. El revelado de la placa de CCF anterior con KOH en etanol, resultó positivo para uno de los compuestos (coloración roja)⁸⁰ lo cual permitió confirmar la presencia de una antraquinona. Posteriormente los compuestos se analizaron en CCF en sílica gel con el eluyente 1b, y se utilizaron como estándares de referencia la T-514, la T-510 (antraquinona) y la T-496. La placa se observó bajo la luz de lámpara UV y el Rf (0.66) de uno de los compuestos fue comparable con el del estándar de referencia de la T-510 (Rf 0.64). Para confirmar estos resultados los compuestos se analizaron por HPLC I con el eluyente 1a y se utilizaron los estándares de referencia ya mencionados.

Los resultados obtenidos mostraron que la T-510 y el compuesto llamado M2 fueron comparables en Tr y en espectro UV-Vis (figuras 36 y 37).

Current Chromatogram(s)

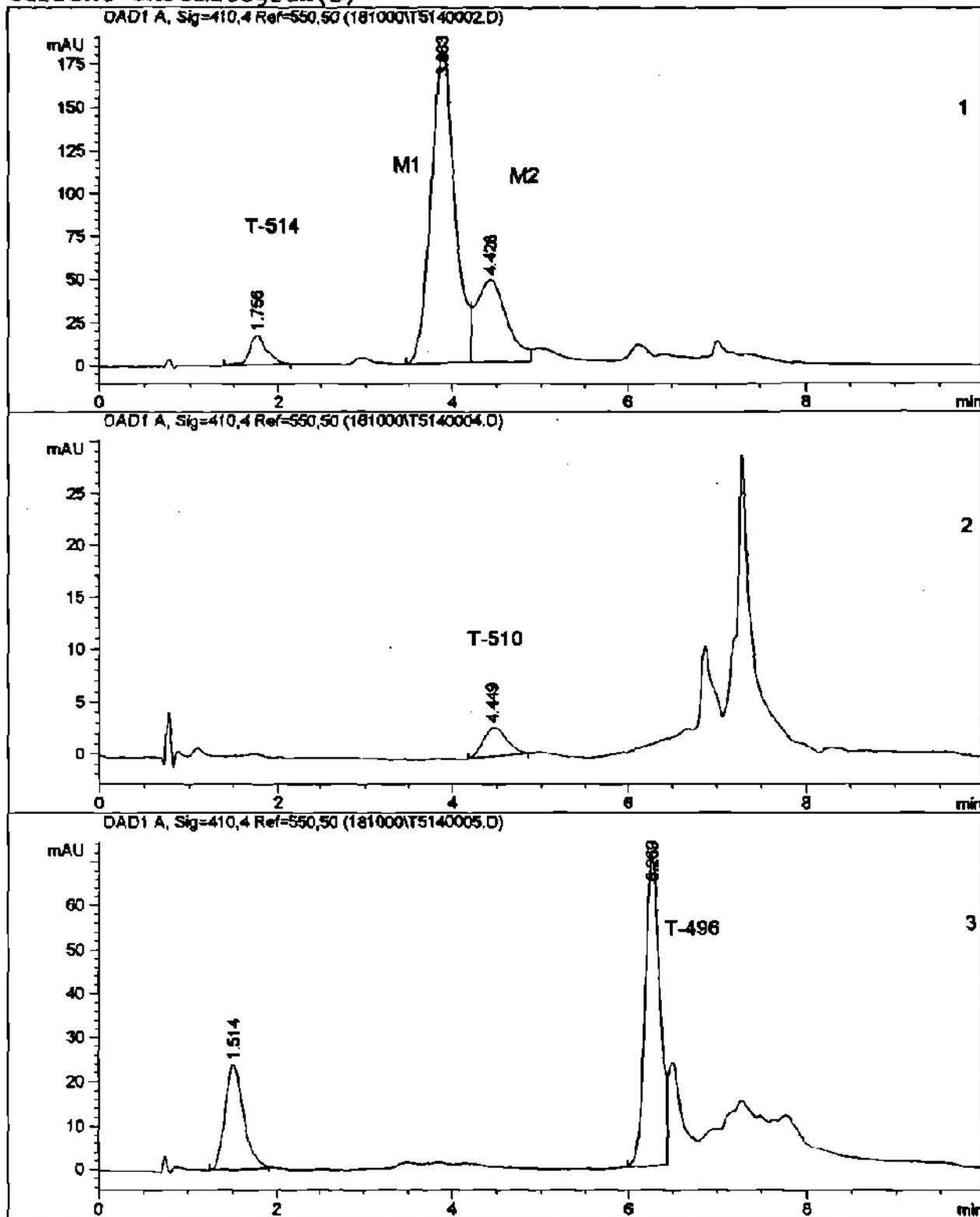


Figura 36. Cromatogramas de los compuestos obtenidos de la T-514 incubada en la solución de fosfatos a pH de 7.3 (1), del estándar de la T-510 (2) y del estándar de la T-496 (3).

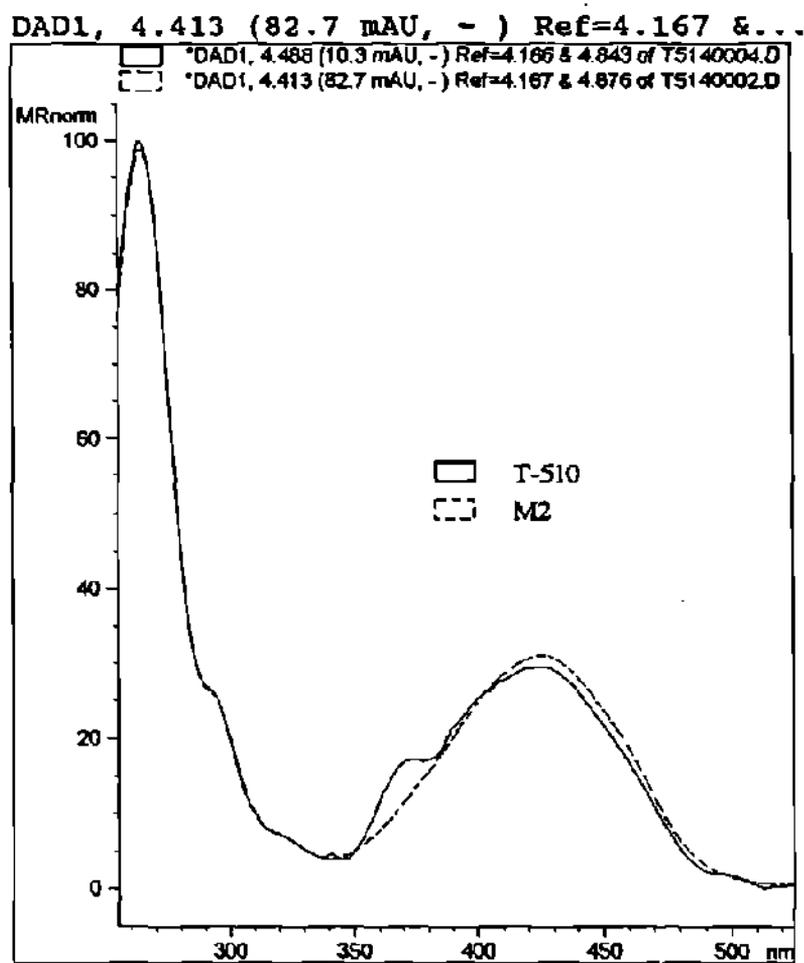


Figura 37. Espectros UV-Vis de la T-510 y del compuesto M2.

El compuesto M1 ya aislado de acuerdo al procedimiento descrito en el apéndice 1, se analizó por ¹H RMN de 400 MHz (figuras 22-26, apéndice 2) y se obtuvo la siguiente información:

Las señales espectroscópicas de este compuesto fueron similares a las encontradas para un compuesto de peso molecular 510 generado a partir de la T-496 en solución amortiguadora de fosfatos a pH 10^o. Por tal razón, se incubó a la T-496 en las condiciones ya mencionadas y se compararon los productos de degradación de ésta, con los obtenidos de la T-514.

El resultado obtenido por HPLC I con el eluyente 1a confirmó por medio del Tr (figura 38) y del espectro UV-Vis (figura 39) que muy probablemente el compuesto obtenido a partir de la T-496 y el compuesto M1 obtenido de la T-514 sean el mismo compuesto.

Current Chromatogram(s)

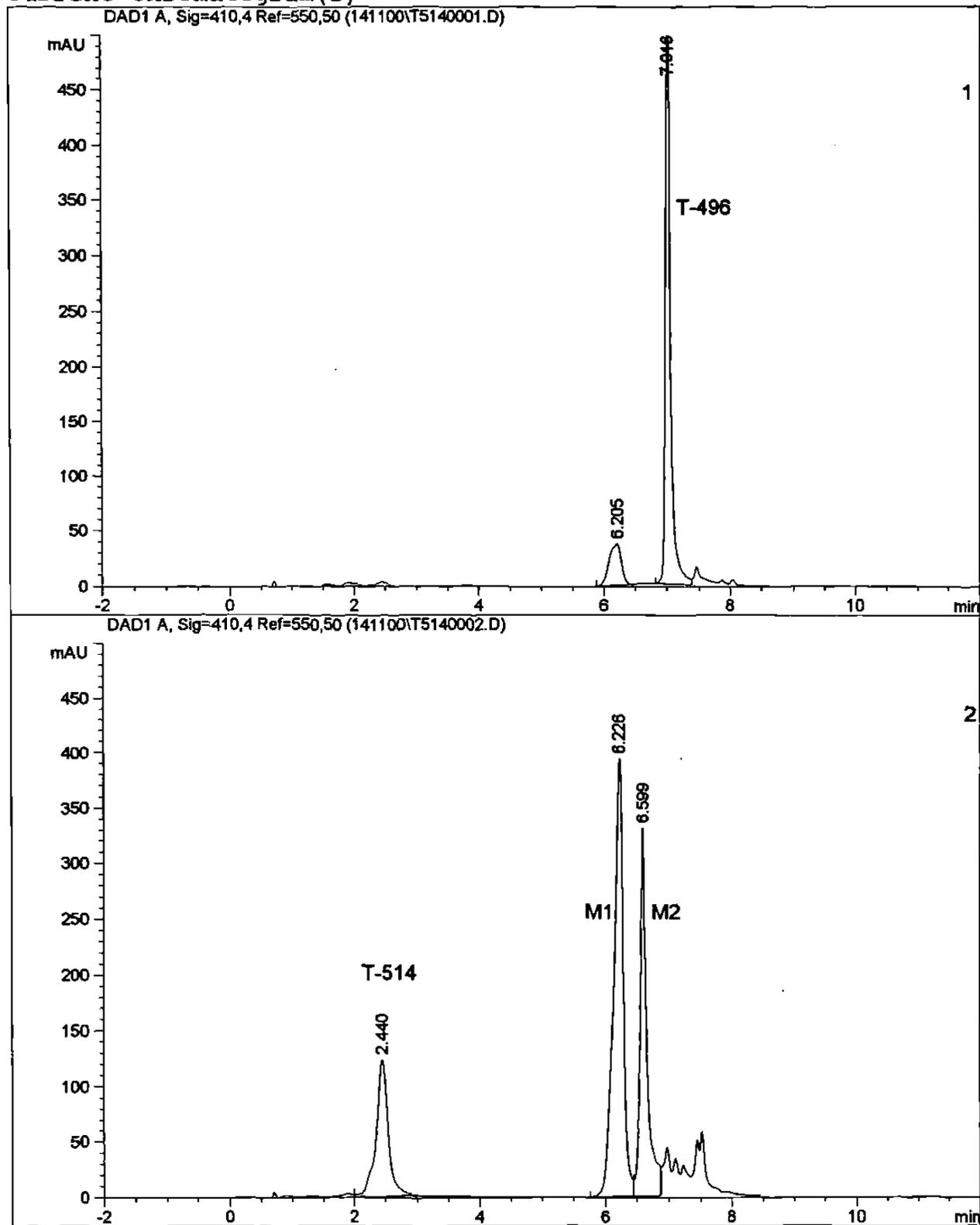


Figura 38. Cromatogramas obtenidos de la T-496 incubada en solución de fosfatos a pH 10 (1) y de la T-514 incubada en solución de fosfatos a pH 7.3 (2).

DAD1, 6.198 (132 mAU, -) Ref=5.884 & ...

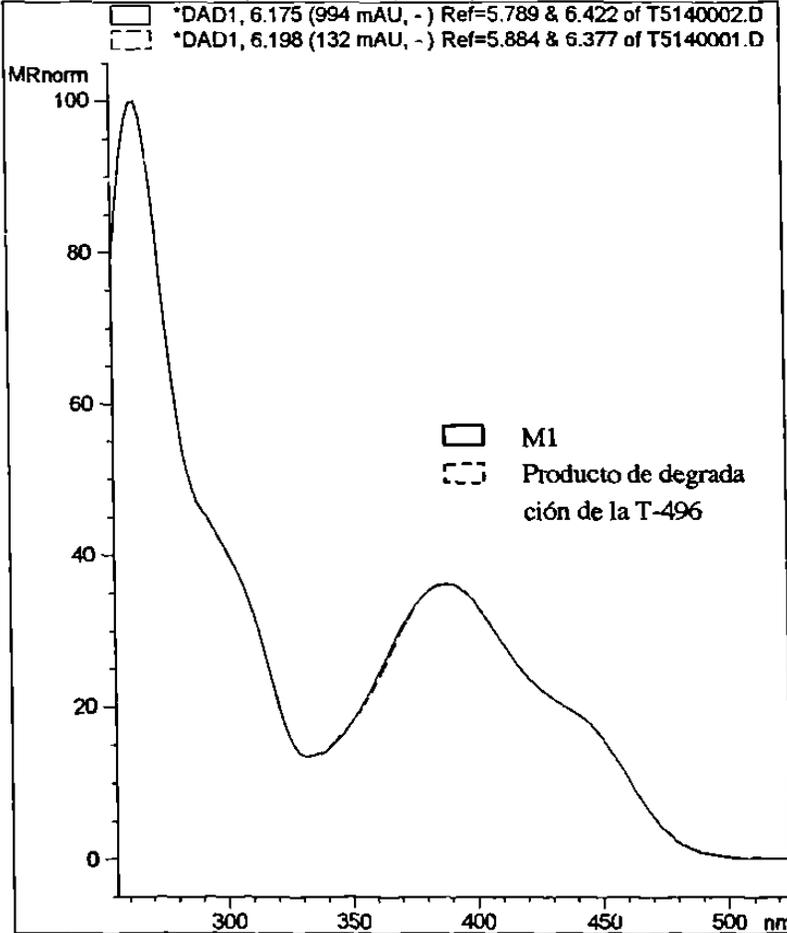


Figura 39. Espectros UV-Vis del compuesto M1 y del compuesto de degradación de la T-496.

3.1.2.4 Determinación de la citotoxicidad de los productos de degradación de la T-514 obtenidos de la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 y evaluación de su selectividad.

Después de la exposición de las células de hígado de Chang (origen benigno) y de Hep G2 (origen neoplásico) a los compuestos M1 y M2 se determinó que la concentración citotóxica cincuenta por ciento (CT_{50}) obtenida por evaluación morfológica fue de 40 $\mu\text{g/ml}$ para las células de origen benigno y de 28 $\mu\text{g/ml}$ para las de origen neoplásico en el caso del compuesto M1; para el compuesto M2 la CT_{50} fue de 40 $\mu\text{g/ml}$ para las células de origen benigno y de 20 $\mu\text{g/ml}$ para las neoplásicas. En el caso de la prueba de reducción del MTT, la CT_{50} para el compuesto M1 fue de 28 $\mu\text{g/ml}$ para las células benignas y de 10 $\mu\text{g/ml}$ para las neoplásicas; para el compuesto M2 la CT_{50} fue de 20 $\mu\text{g/ml}$ y de 10 $\mu\text{g/ml}$ para las células benignas y neoplásicas, respectivamente. La comparación de los resultados obtenidos con ambos compuestos mostró que no hubo una diferencia mínima de tres veces entre las CT_{50} obtenidas en ambos tipos celulares con

los dos métodos de evaluación. Con lo anterior se estableció que los compuestos no tuvieron citotoxicidad selectiva hacia las células de origen neoplásico.

3.1.2.3 Resultados de la incubación de la T-514 en plasma de perro .

Los resultados obtenidos de la incubación de la T-514 en el plasma de perro (*in vitro*) se muestran en la figura 40.

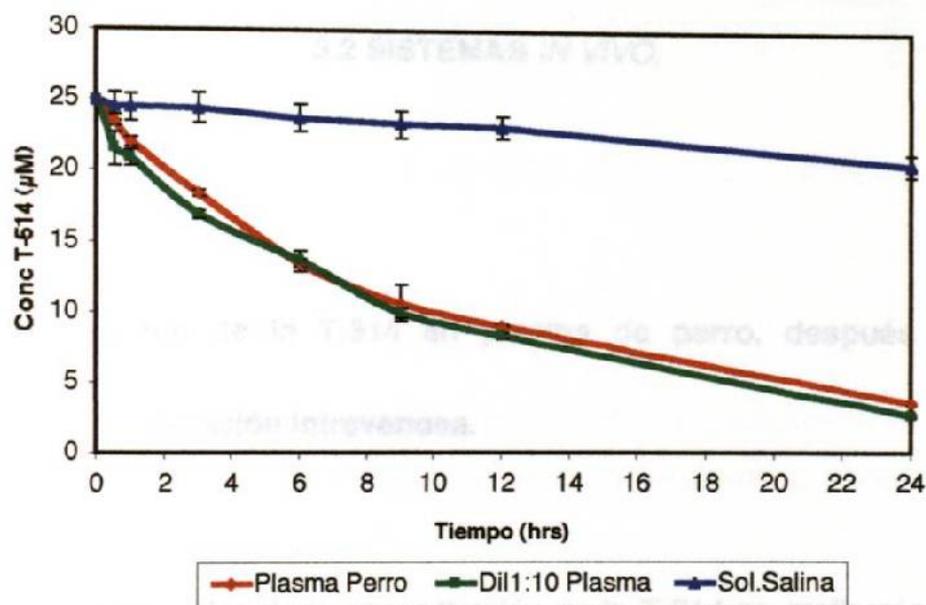


Figura 40. Determinación de T-514 en plasma de perro *in vitro*. $\bar{X} \pm DE$. n=3

En la curva de concentración de la T-514 en plasma de perro (con y sin dilución) se observó un decaimiento importante de la T-514 en función del tiempo.

No se observaron diferencias importantes en el decaimiento de la T-514 en las muestras de plasma con y sin dilución.

El decaimiento de la T-514 incubada en solución salina (control) fue mínimo.

3.2 SISTEMAS *IN VIVO*.

3.2.1 Monitoreo de la T-514 en plasma de perro, después de su administración intravenosa.

Los resultados de la concentración de la T-514 se graficaron *versus* tiempo, obteniéndose una curva en la que se observó una rápida disminución de su concentración plasmática la cual ocurrió en los primeros

minutos (figura 41). En este sistema no se encontraron productos de degradación de la T-514 (figura 27, apéndice 2).

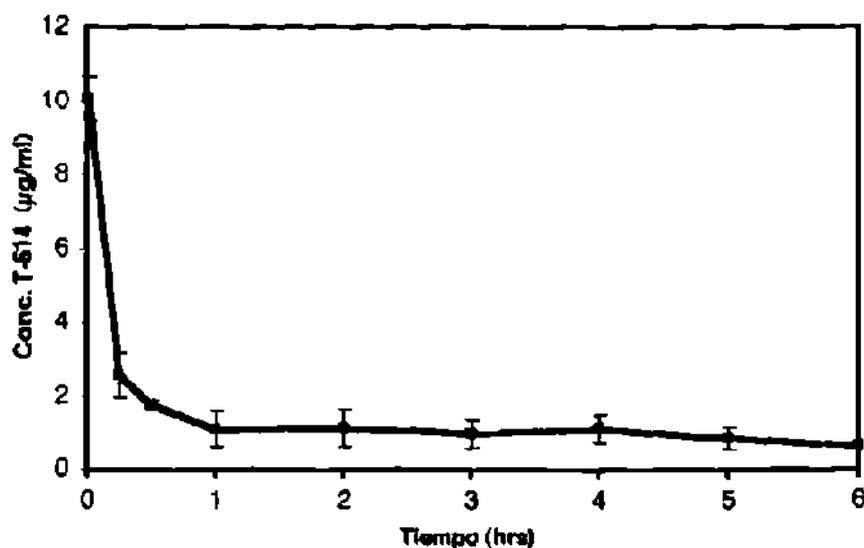


Figura 41. Determinación de T-514 en plasma de perro *in vivo*. $\bar{X} \pm DE$. n = 4

3.2.2 Monitoreo de la T-514 en plasma de pacientes del protocolo I 1/15.

En las curvas de la cinética de la T-514 en el plasma de los dos pacientes tratados (figura 42), se observó que hubo un incremento en su concentración, el cual ocurrió en el primer caso, a partir de las primeras tres horas y en el segundo caso a partir de las siete horas, para posteriormente

tener un decaimiento. No se detectaron productos de degradación de la T-514 en ninguno de los dos casos (figura 28, apéndice 2).

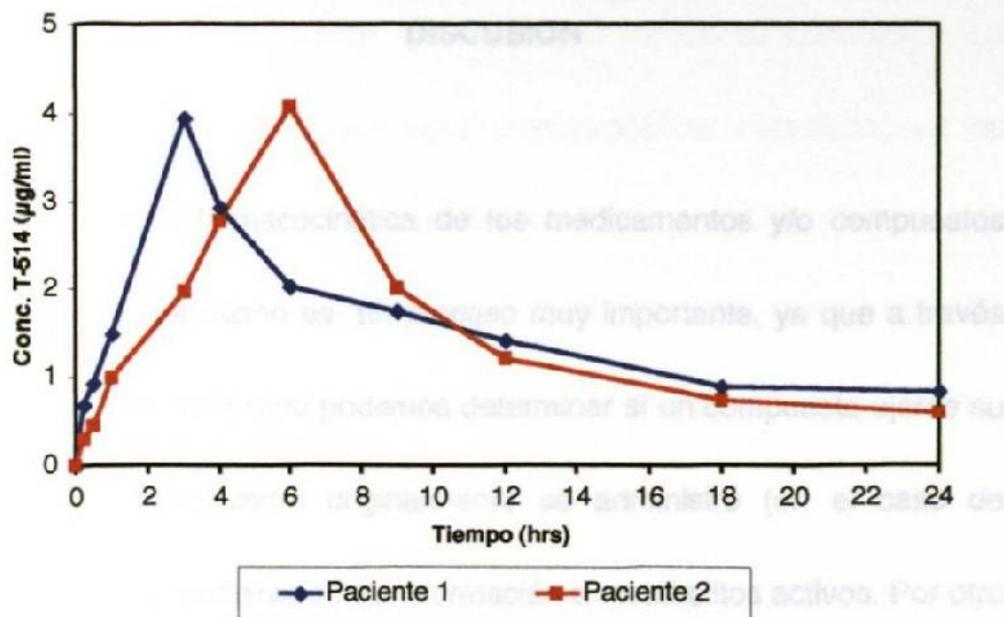


Figura 42. Determinación de T-514 en plasma de pacientes del protocolo I 1/15.

CAPITULO 4

DISCUSION

Dentro de la farmacocinética de los medicamentos y/o compuestos exógenos, el metabolismo es un proceso muy importante, ya que a través del conocimiento del mismo podemos determinar si un compuesto ejerce su efecto en la forma como originalmente se administró (en el caso de fármacos) o bien mediante su transformación a metabolitos activos. Por otro lado el metabolismo de los compuestos también puede llevar a la formación de metabolitos inactivos en cuanto al efecto terapéutico o bien, potencialmente tóxicos para un órgano en particular⁵.

En relación a la evaluación del metabolismo de la T-514 en los dos sistemas utilizados en este estudio (*in vitro* e *in vivo*), en el sistema *in vitro*

(microsomas hepáticos y cultivo primario de hepatocitos), se observó que sólo en los microsomas de rata y mono, se pudo detectar además del decaimiento en la concentración de la T-514, los dos picos cromatográficos correspondientes a productos de degradación de la misma. En este sistema la cantidad de muestra fue muy poca, lo que impidió su aislamiento. La diferencia en los T_r de los dos picos cromatográficos detectados en los microsomas, así como, la semejanza de sus espectros UV-Vis con los de la T-514 y el ligero desplazamiento de estos espectros, indicó que los compuestos formados en este sistema corresponden a intermediarios metabólicos de la degradación de la misma.

El origen de los microsomas (especie), así como, la concentración de enzimas microsomales utilizada, fueron dos factores determinantes en la detección de estos productos de degradación.

En relación a el primer aspecto, se pudo demostrar que existe una diferencia interespecie en el fenómeno de biotransformación de la T-514 por el sistema microsomal hepático, ya que los picos cromatográficos distintos al compuesto original sólo pudieron ser detectados en los microsomas

hepáticos de rata y de mono (como se mencionó anteriormente), mientras que en los microsomas del resto de las especies estudiadas (ratón, cobayo, perro y humano), éstos no fueron detectados. Lo anterior indica que en estas especies el fenómeno de biotransformación de la T-514 se llevó a cabo a una mayor velocidad, lo que impidió la detección de los productos que se pudiesen haber formado.

En cuanto a la concentración de microsomas utilizada, se demostró que existe una relación proporcional entre la concentración de enzimas microsomales y el decaimiento en la concentración de la T-514, lo cual se observó claramente en las gráficas comparativas relacionadas con la concentración de microsomas utilizada, en donde, con las concentraciones mayores de éstos (250 y 125 $\mu\text{g/ml}$), el decaimiento fue abrupto y no se detectaron picos cromatográficos distintos al compuesto original en ninguna de las especies estudiadas; mientras que con la concentración menor (12.5 $\mu\text{g/ml}$), la velocidad con la que ocurrió el proceso de biotransformación fue menor y permitió la detección (en el caso de los microsomas de rata y de mono) de los productos de degradación de la T-514.

La degradación rápida de la T-514, corresponde al comportamiento de biotransformación descrito para compuestos altamente inestables^{6,8}. Al respecto la capacidad de la T-514 para producir radicales libres ha sido previamente demostrada tanto en cultivo primario de hepatocitos, como en microsomas hepáticos^{44,45}. Lo anterior hace suponer que los productos de degradación de este compuesto, detectados en los microsomas de rata y de mono, corresponden a intermediarios reactivos para los cuales se ha reportado un fenómeno de degradación secuencial rápida, el cual es activado por la presencia de un electrón impar en su molécula⁸.

La incubación de la T-514 en diferentes soluciones amortiguadoras (de fosfatos pH 7.3 y 5 y de citratos pH 3.5), la cual se realizó debido a la observación de un ligero decaimiento en la concentración de la T-514 en las muestras control (solución amortiguadora de KCl), así como, por la existencia de reportes relacionados con su autooxidación⁴⁶ y a la posibilidad de una degradación fisiológica de la T-514, por efecto del pH plasmático y de la temperatura corporal (efecto de Hofmann)^{53,64,55,56,57}, permitió en el caso de

la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3, la detección de dos picos cromatográficos (M1 y M2) los cuales tuvieron los mismos tiempos de retención y espectros UV-Vis de los picos detectados en los microsomas de rata y del pico encontrado en los de mono. Lo anterior hace suponer que se trata de los mismos compuestos y corrobora además el fenómeno de autooxidación de la T-514. Por otro lado el hecho de que en este sistema el fenómeno de biotransformación de la T-514 ocurriera en una forma más lenta, permitió el aislamiento de los productos de degradación de la misma, lo cual no pudo hacerse en el caso de los microsomas de las especies que la biotransformaron (rata y mono), debido a que en ellas, la transformación y desaparición de los mismos ocurrió en una forma más rápida.

La semejanza en los espectros de UV-Vis de los picos cromatográficos obtenidos a partir de la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 (M1 y M2) con el de la T-514, así como, el ligero desplazamiento de los mismos indican que estos compuestos son productos de degradación de la misma. Por otro lado el análisis por CCF, y por HPLC (espectro UV-Vis) permitió establecer que el compuesto M2 muy probablemente corresponde a la

antraquinona T-510 obtenida originalmente del fruto de *Karwinskia tehuacana*. El análisis del compuesto M1 por $^1\text{H RMN}$, indicó que las señales espectroscópicas de este compuesto fueron similares a las encontradas para un compuesto de PM 510 previamente aislado⁹¹, a partir de la degradación de la T-496 incubada en solución amortiguadora a pH 10. El análisis del compuesto M1 y del compuesto de degradación de la T-496 (PM 510) por HPLC, mostró que éstos tienen T_r y espectros UV-Vis muy similares; esto indica que existe una muy alta probabilidad de que el compuesto M1 detectado tanto en los microsomas de rata como en la solución amortiguadora de fosfatos y en el medio de cultivo de hepatocitos de origen humano, y el compuesto de degradación de la T-496 (PM 510) sean los mismos.

Lo anterior pudiera indicar que la formación de la T-496 es un paso intermedio en el metabolismo de la T-514 y que ésta no se haya detectado, debido a la rapidez de su transformación.

En el caso de los hepatocitos de origen animal y humano la determinación de las curvas de concentración de la T-514 en los cultivos celulares, mostró que ésta pudo ser detectada intracelularmente a los 30 minutos, lo que indica que su penetración celular ocurre durante la primera media hora de exposición. El incremento posterior en la concentración intracelular de la T-514 coincidió con su decaimiento o desaparición del medio en el que estaban cultivadas las células. En este sistema no se detectaron picos cromatográficos distintos a los de la T-514 en los hepatocitos de rata; y los picos cromatográficos detectados en los hepatocitos de origen humano, también se detectaron en las muestras control, por lo cual no puede atribuirse la aparición de estos picos cromatográficos distintos a la T-514 a influencias celulares sino a una autodegradación de la T-514 en el medio de cultivo. Como se mencionó antes estos picos cromatográficos correspondieron a los de los compuestos M1 y M2 detectados en los microsomas de rata y en la solución amortiguadora de fosfatos.

Está demostrado que el cultivo primario de hepatocitos tanto de origen animal como de origen humano, utilizado en este estudio conserva su actividad metabólica. Existen además, diversos reportes en cuanto a la capacidad enzimática de estos sistemas para biotransformar a diversos compuestos *in vitro*^{24,27,28}. El hecho de que en los microsomas se haya encontrado una diferencia en el grado de biotransformación de la T-514 dependiente de la concentración de enzimas microsomales, sugiere que posiblemente la cantidad de enzimas presentes en los cultivos (a la densidad celular utilizada) no fue suficiente y que éste pudiera ser el factor que explicase la falta de degradación de la T-514 en este sistema celular.

En el caso del modelo *in vivo*, en la cinética de la T-514 en el plasma de perro y de humano se observó que hubo un decaimiento abrupto en la concentración de la misma, el cual ocurrió después de haber alcanzado su pico máximo. Lo anterior demostró que el patrón de degradación rápida de este compuesto *in vivo*, es semejante al detectado *in vitro*. En este caso se debe considerar además, que el plasma es un sistema complejo en el que existen múltiples factores (entre ellos enzimas) que pudiesen haber

intervenido y esto pudiera explicar el decaimiento en la concentración sanguínea de la T-514 sin la aparición de picos cromatográficos correspondientes a productos de su degradación, otro factor importante que debe ser considerado en este modelo *in vivo*, es el proceso de distribución de la misma y el hecho de que ésta posiblemente tenga un volumen de distribución intracelular. Por otro lado la desaparición rápida de la T-514 observada en el caso de las concentraciones mayores de microsomas, indica que el proceso de autodegradación de la T-514, se potencia en presencia de este sistema enzimático. Lo anterior pudiese también explicar, en el caso del modelo *in vivo*, la no detección de los productos de degradación de la T-514.

En relación a la valoración de la citotoxicidad selectiva de los productos de degradación de la T-514, ésta se realizó en células hepáticas humanas tanto de origen benigno como maligno con el propósito de poder comparar la citotoxicidad en ambos tipos celulares y establecer su selectividad. Las líneas celulares se seleccionaron por su origen (humano), por provenir de hígado, (que es uno de los órganos blanco de toxicidad de la T-514 en

ensayos *in vivo*)⁶⁹, y por ser éstas las líneas utilizadas para el control de calidad de la T-514. En cuanto a los parámetros de evaluación de citotoxicidad, el uso de la prueba de reducción del MTT la cual se basa en mediciones espectrofotométricas para la detección del producto de degradación de este compuesto por las células viables, complementó el parámetro de revisión microscópica de adhesión celular. Con esta prueba se evaluó además un parámetro más sensible para la determinación de la viabilidad celular, como lo es la actividad de las enzimas mitocondriales. El aislamiento y extracción de los compuesto M1 y M2 obtenidos de la autodegradación de la T-514 en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3, permitió la evaluación de su posible toxicidad selectiva hacia células de origen neoplásico. Al respecto se determinó que no hubo diferencia entre las CI_{50} de estos compuestos obtenidas en las células de origen benigno y neoplásico, por lo que se estableció que éstos carecen del efecto de toxicidad selectiva hacia células de origen tumoral.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la degradación de la T-514 es un proceso que ocurre en forma muy rápida tanto *in vivo*

como *in vitro* y que este proceso lleva a la formación de cuando menos dos productos de degradación (M1 y M2), los cuales pudieron ser detectados en uno de los sistemas *in vitro* (microsomas de rata y mono), así como, en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 y en el medio de cultivo de los hepatocitos de origen humano (proceso de autodegradación espontánea), en los cuales la degradación ocurrió de una manera más lenta.

La evaluación de citotoxicidad de los dos compuestos obtenidos en este estudio (M1 y M2) mostró que no tienen el efecto de toxicidad selectiva hacia células de origen neoplásico reportado para el compuesto original (T-514).

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

1. -Se demostró que la T-514 es biotransformada en presencia de las enzimas del sistema microsomal hepático detectándose dos picos cromatográficos (M1 y M2) en microsomas de rata y uno (M1), en los microsomas de mono, los cuales correspondieron a productos de degradación de la misma.
2. -La T-514 se autodegrada en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 y en medio de cultivo, esta autodegradación ocurre en forma más lenta que en presencia de enzimas microsomales y los productos de degradación formados corresponden a los productos M1 y M2 detectados en los microsomas.

3. -El compuesto M1 se produce en mayor proporción que el M2, tanto en los microsomas (rata) como en la solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3 y en el medio de cultivo.
4. El compuesto M1 corresponde con una alta probabilidad a un compuesto de PM 510, que también se forma a partir de la T-496.
5. -El compuesto M2 corresponde con una alta probabilidad a la T-510 obtenida originalmente del fruto de *Karwinskia tehuacana*.
6. -Se demostró que los productos de degradación M1 y M2 no tienen el efecto de citotoxicidad selectiva hacia células de origen neoplásico reportado para el compuesto original (T-514).
7. Se rechaza la hipótesis propuesta en este trabajo con respecto a que los productos de degradación de la T-514 sean los responsables de su selectividad hacia células de origen neoplásico.

APENDICE 1

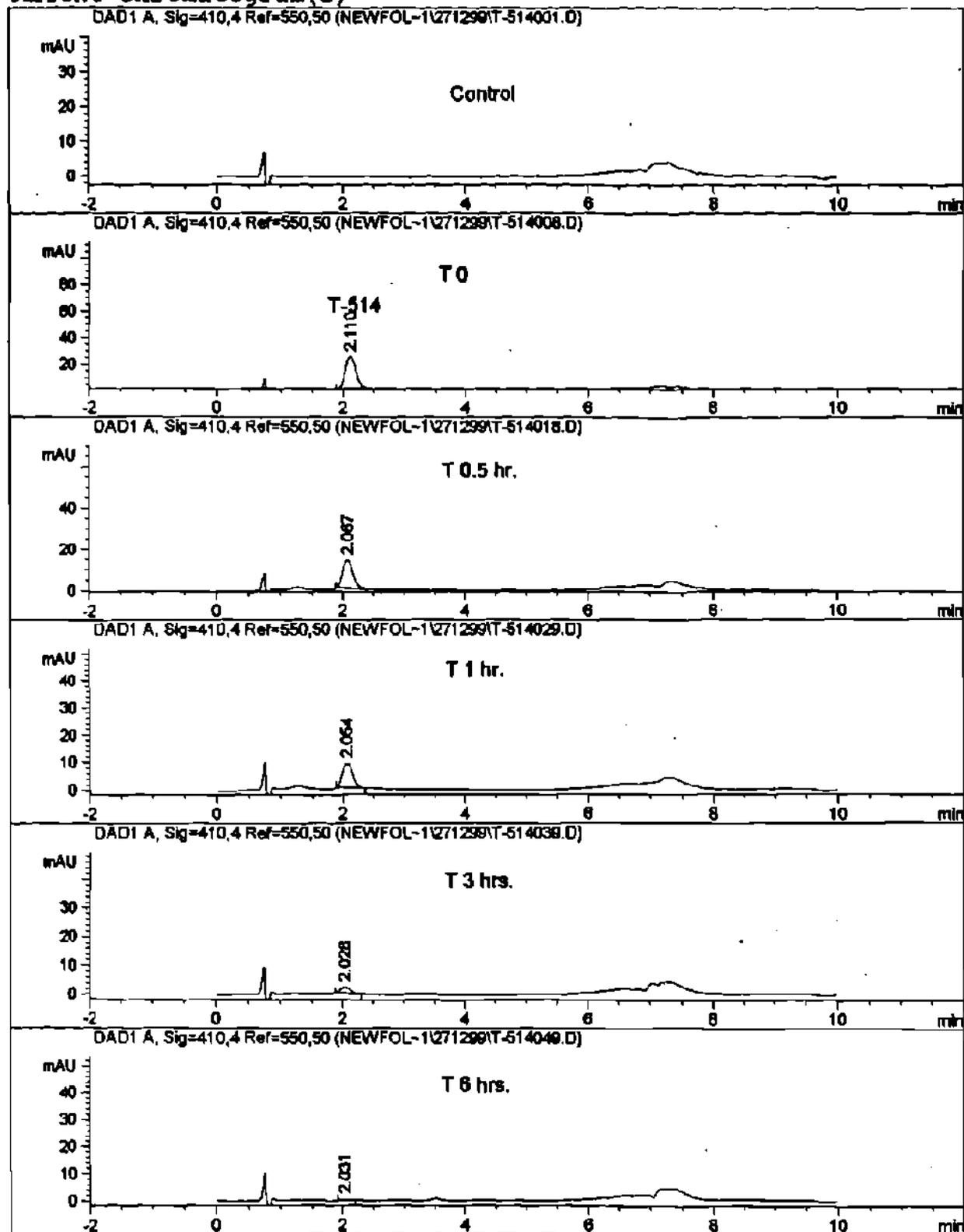
Aislamiento y purificación de los productos de degradación de la T-514 obtenidos a partir de la solución amortiguadora según Sørensen a pH 7.3.

Los productos de degradación de la T-514 se obtuvieron a mayor escala incubándose 10 mg de T-514 a 37°C durante 60 hrs en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3. Posteriormente se extrajo con Acetato de Etilo y se procedió a evaporar por rotación al vacío, el extracto obtenido se redisolvió con Acetato de Etilo para su análisis por CCF en sílica gel, con el eluente 1.b. Con el procedimiento anterior se detectaron tres compuestos: la T-514 (en proporción menor) y dos compuestos adicionales. Posteriormente del remanente de la solución de Acetato de Etilo se obtuvo por precipitación con éter de petróleo, un precipitado y un sobrenadante. El sobrenadante se sometió a CCF en sílica gel, en la cual se detectaron 3 compuestos tanto por observación bajo lámpara de luz UV como por revelado con KOH. Los compuestos correspondieron a la T-514 y a dos compuestos mas. El sobrenadante también se analizó por HPLC I con el eluente 1a.

Al precipitado se le volvió a agregar Eter de Petróleo y se obtuvo un segundo sobrenadante, el cual se sometió a análisis por CFF en sílica gel y se observaron los mismos tres compuestos detectados en el sobrenadante 1. Este procedimiento se repitió cuatro veces más. Como residuo quedó un precipitado negro. Los sobrenadantes se colocaron en un matraz, se evaporaron por rotación al vacío y se sometieron a CCP sílica gel con el eluyente 1b. Con el procedimiento anterior se obtuvieron los tres compuestos (la T-514 y los dos compuestos adicionales ya descritos). Las manchas observadas a simple vista y bajo lámpara de luz UV se rasparon por separado y se eluyeron con Acetato de Etilo obteniéndose de esta forma los compuestos M1 y M2.

APENDICE 2

Current Chromatogram(s)

Figura 1. Cromatogramas de T-514 en microsomas de ratón (250 μ g/ml) .

Current Chromatogram(s)

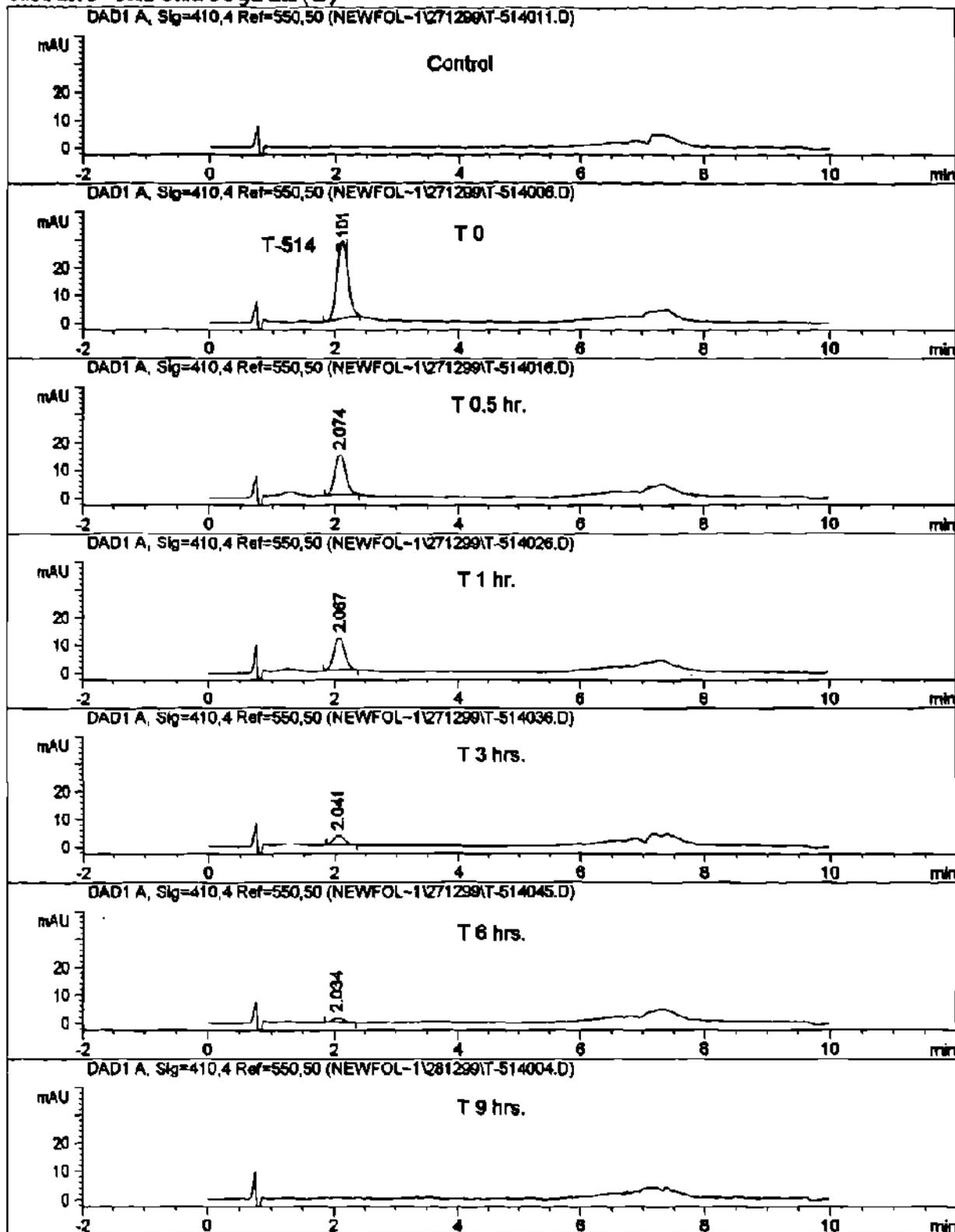


Figura 2. Cromatogramas de T-514 en microsomas de ratón (125 µg/ml) .

Current Chromatogram(s)

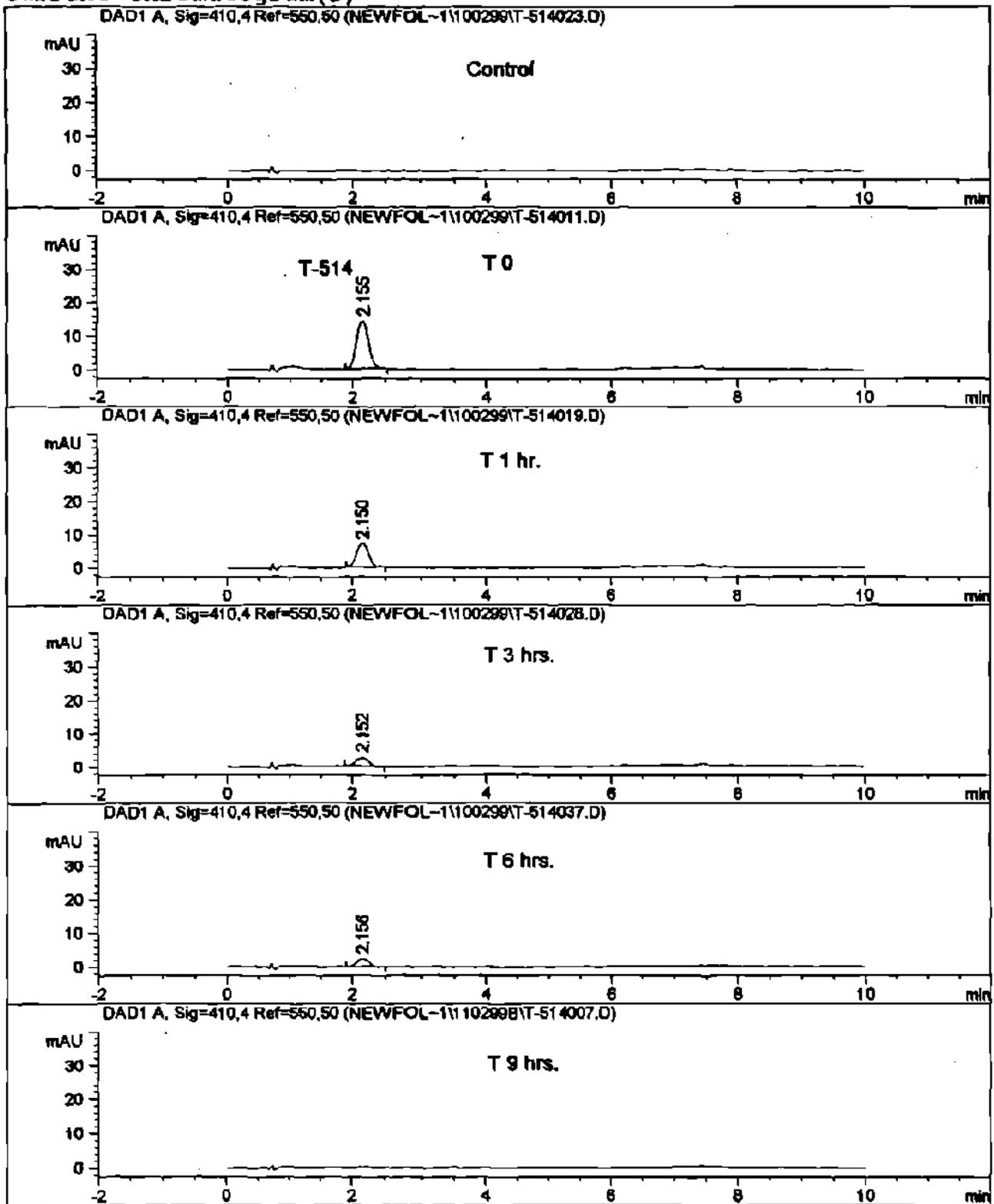


Figura 3. Cromatogramas de T-514 en microsomas de ratón (12.5 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

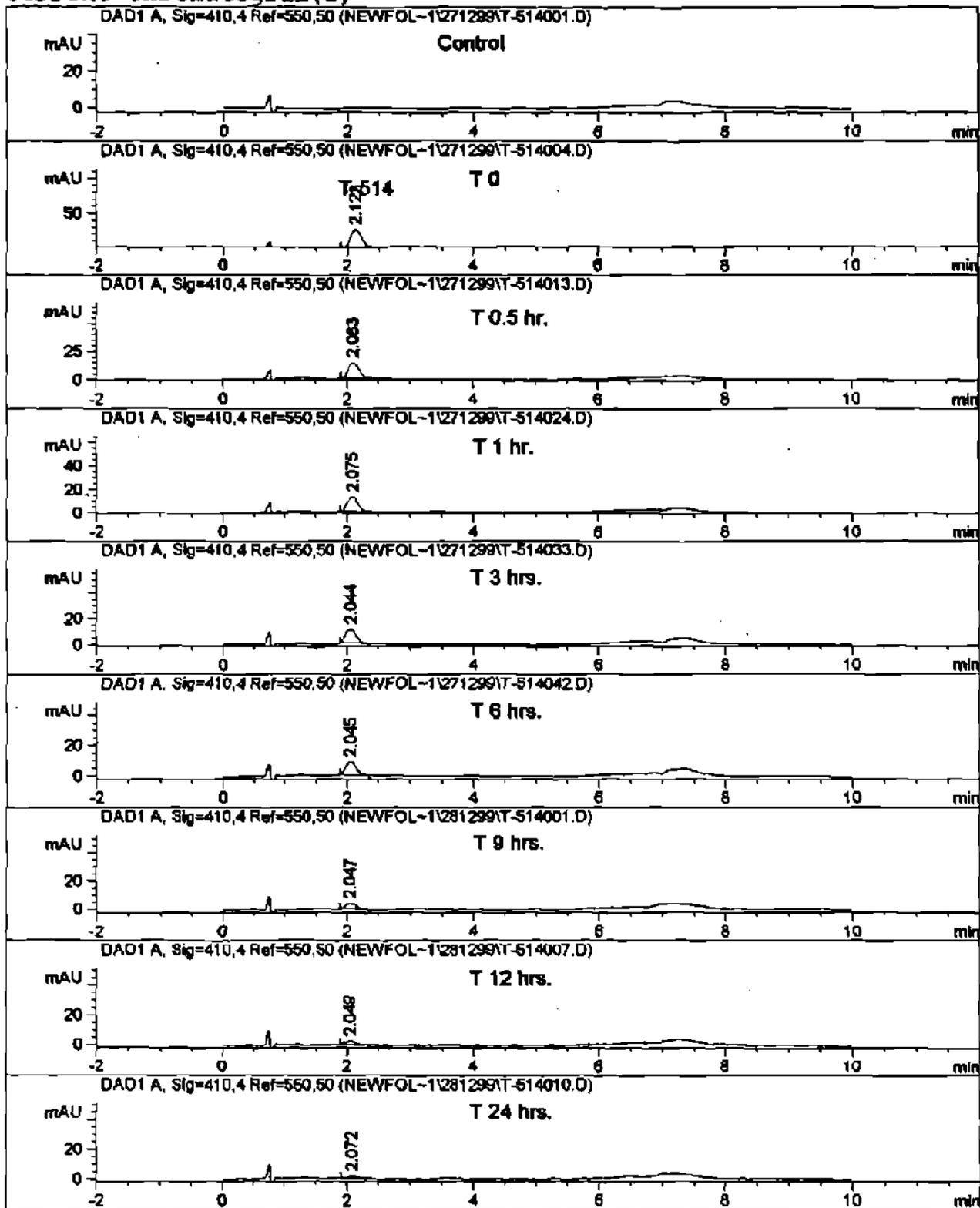
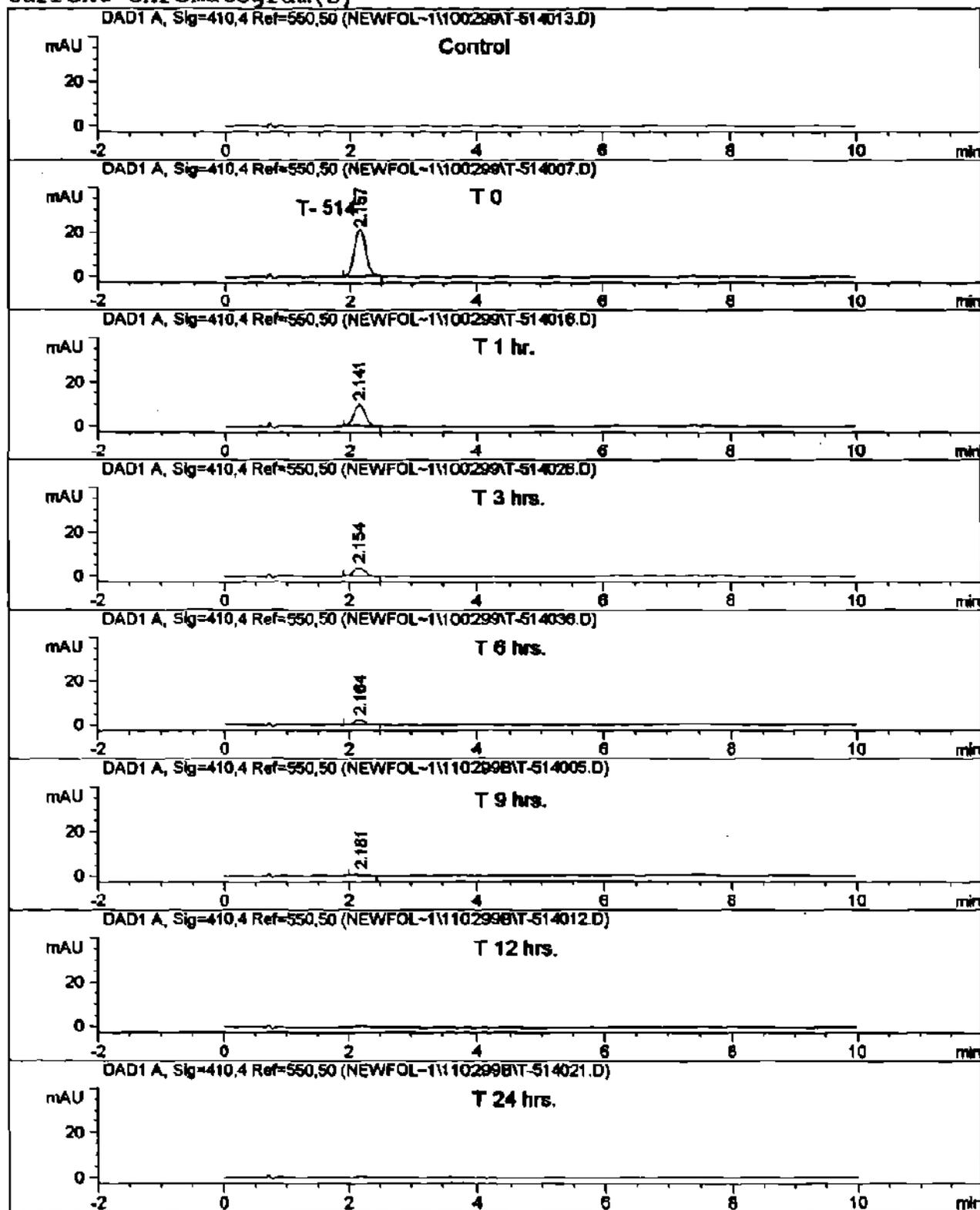
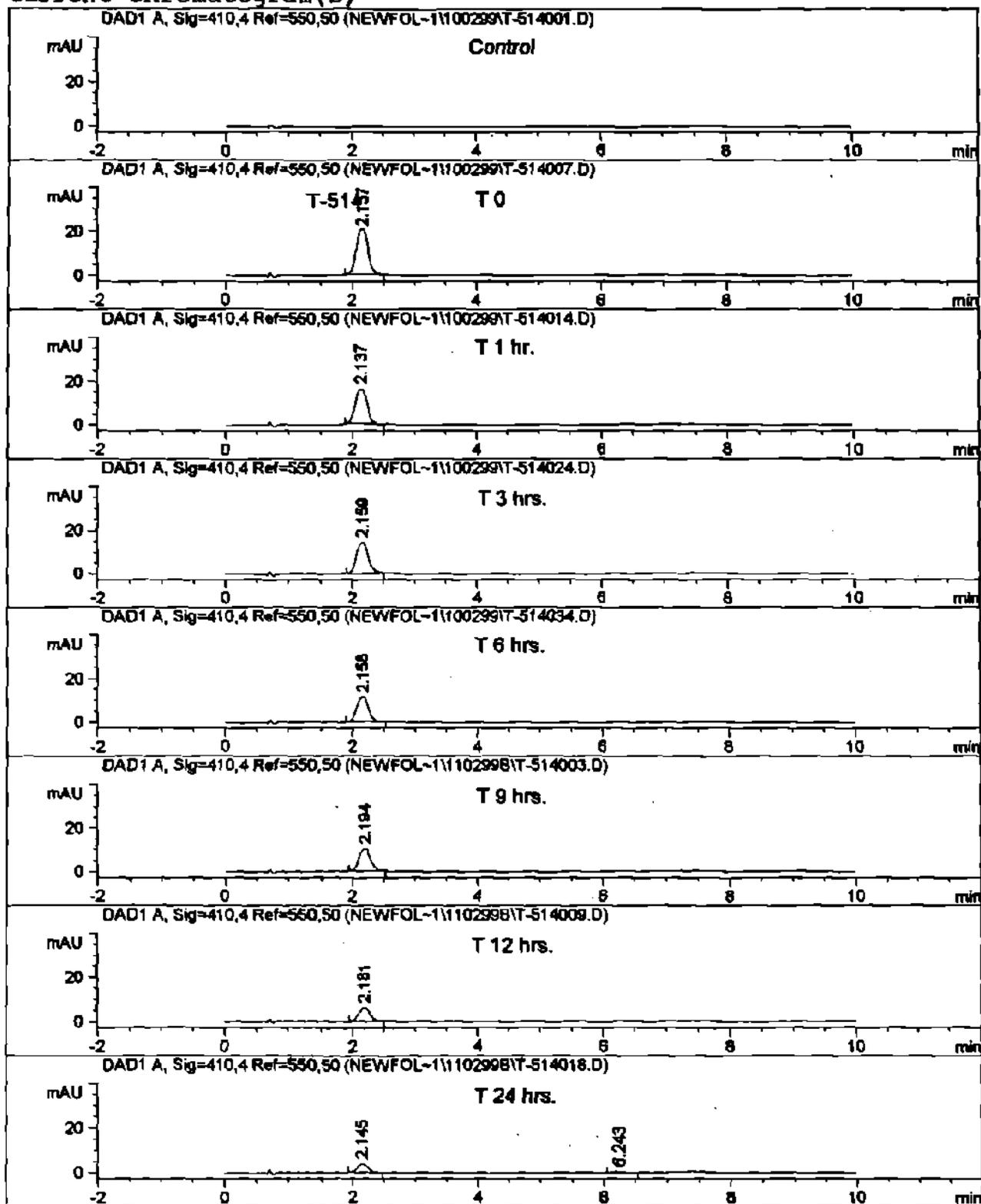


Figura 4. Cromatogramas de T-514 en microsomas de rata (250 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

Figura 5. Cromatogramas de T-514 en microsomas de rata (125 μ g/ml).

Current Chromatogram(s)

Figura 6. Cromatogramas de T-514 en microsomas de rata (12.5 $\mu\text{g/ml}$).

Current Chromatogram(s)

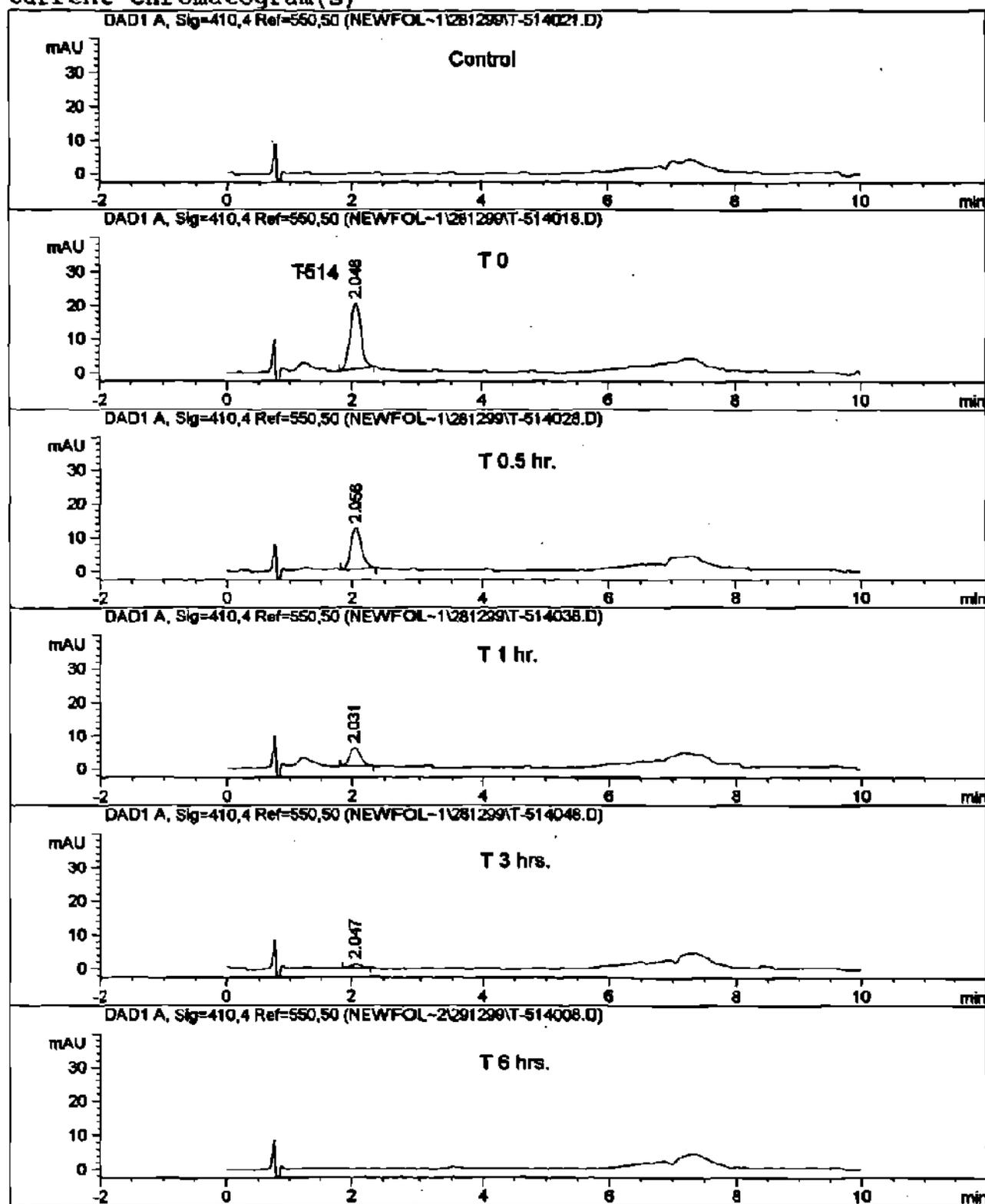
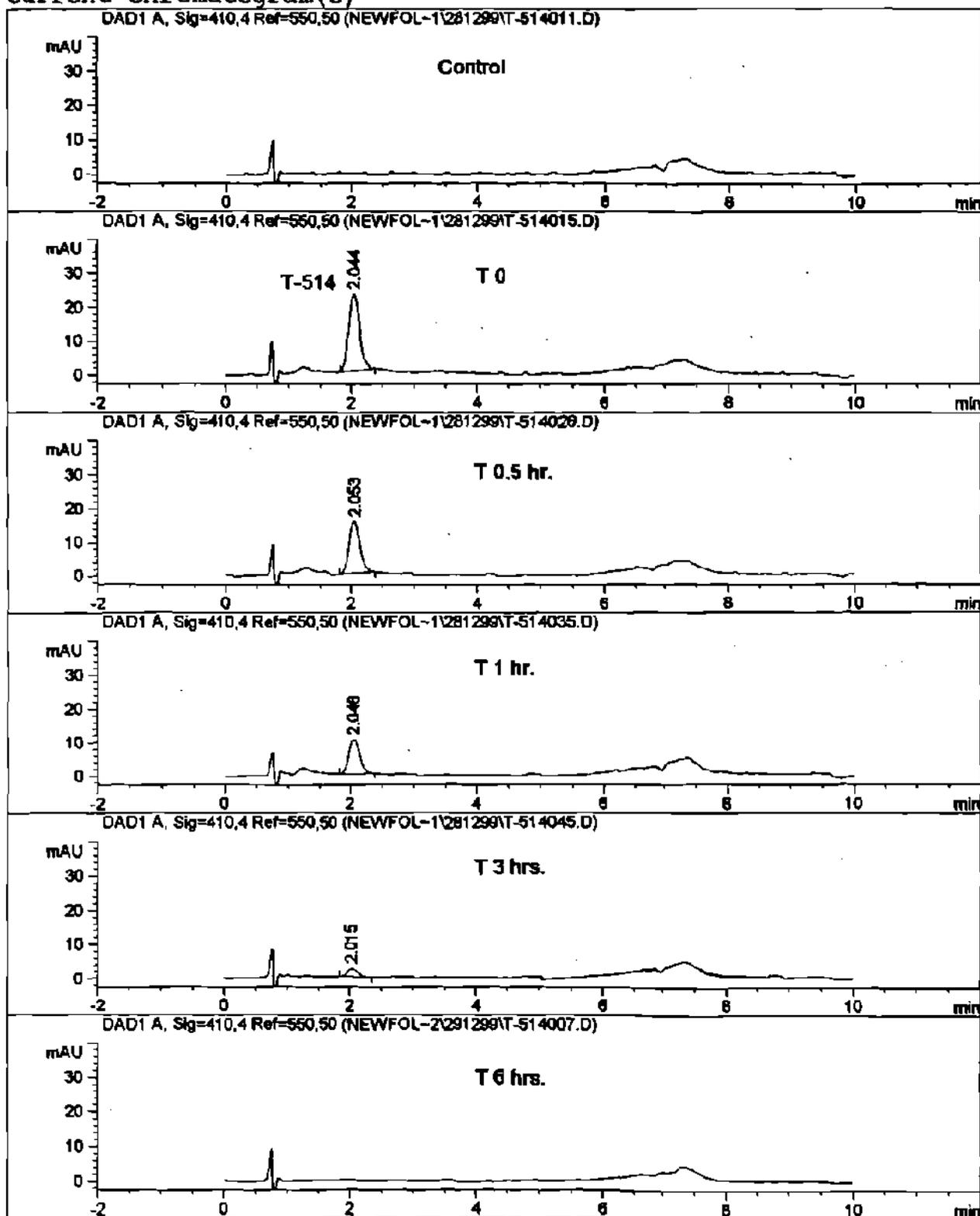
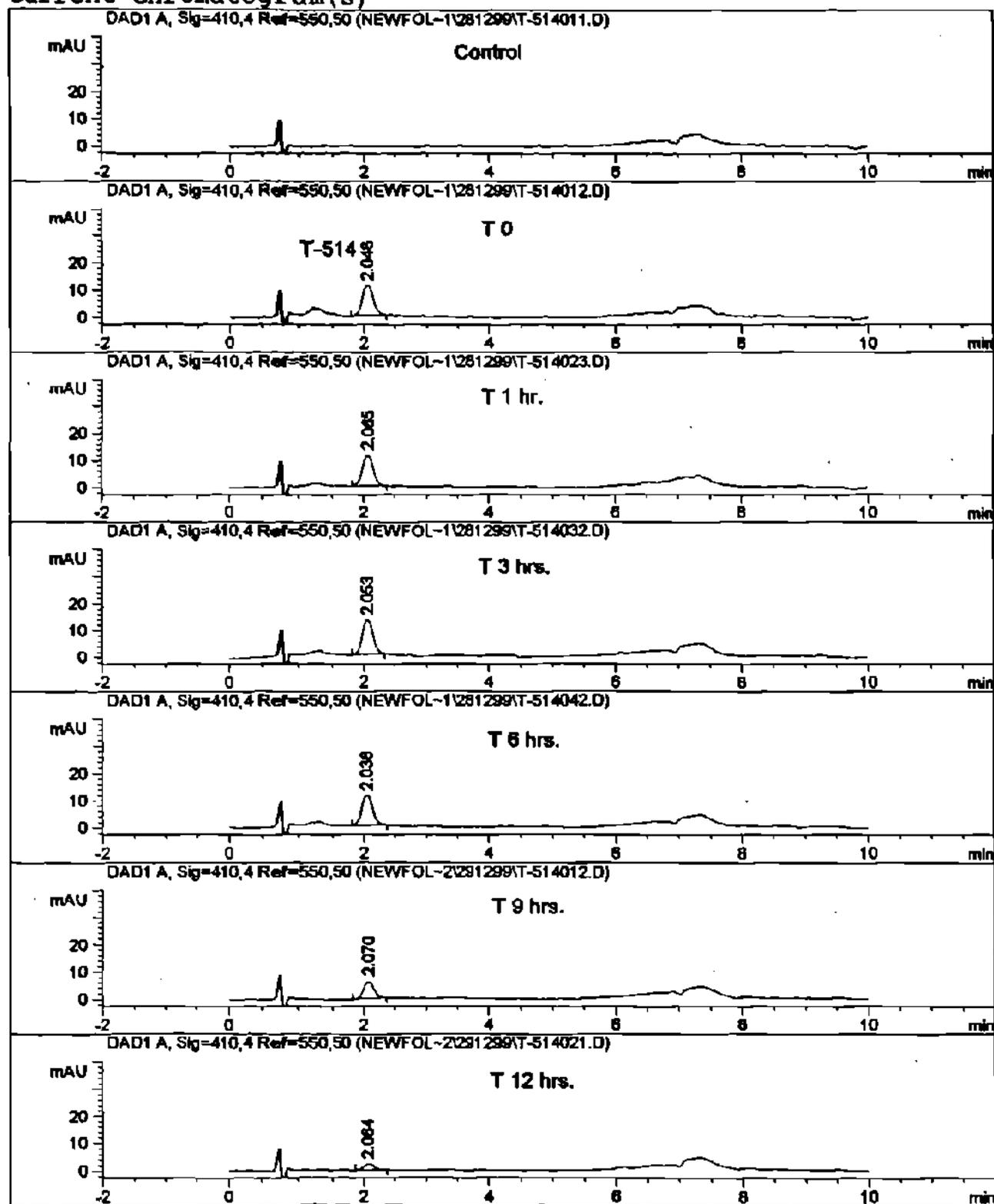


Figura 7. Cromatogramas de T-514 en microsomas de cobayo (250 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

Figura 8. Cromatogramas de T-514 en microsomas de cobayo (125 μ g/ml).

Current Chromatogram(s)

Figura 9. Cromatogramas de T-514 en microsomas de cobayo (12.5 $\mu\text{g/ml}$).

Current Chromatogram(s)

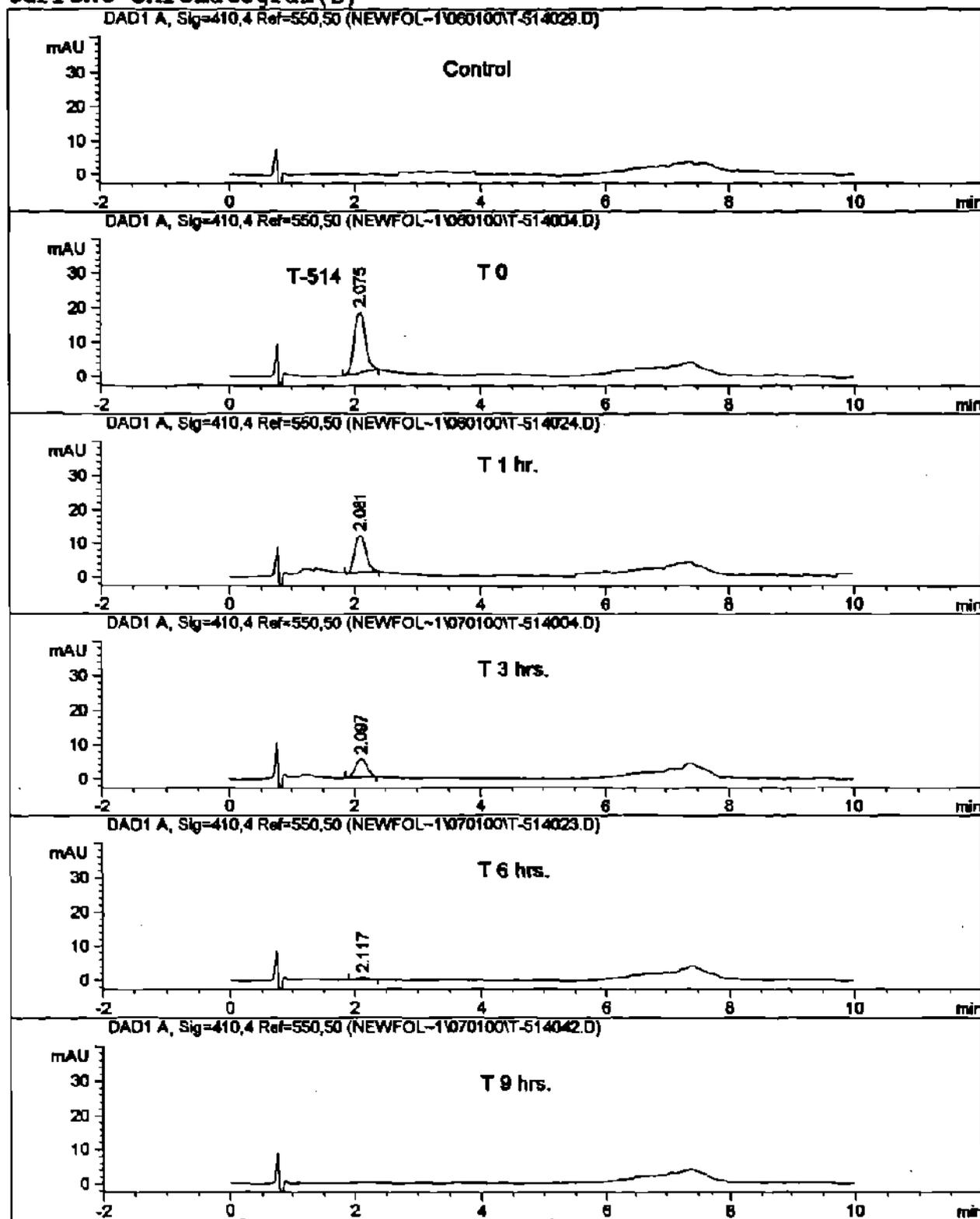
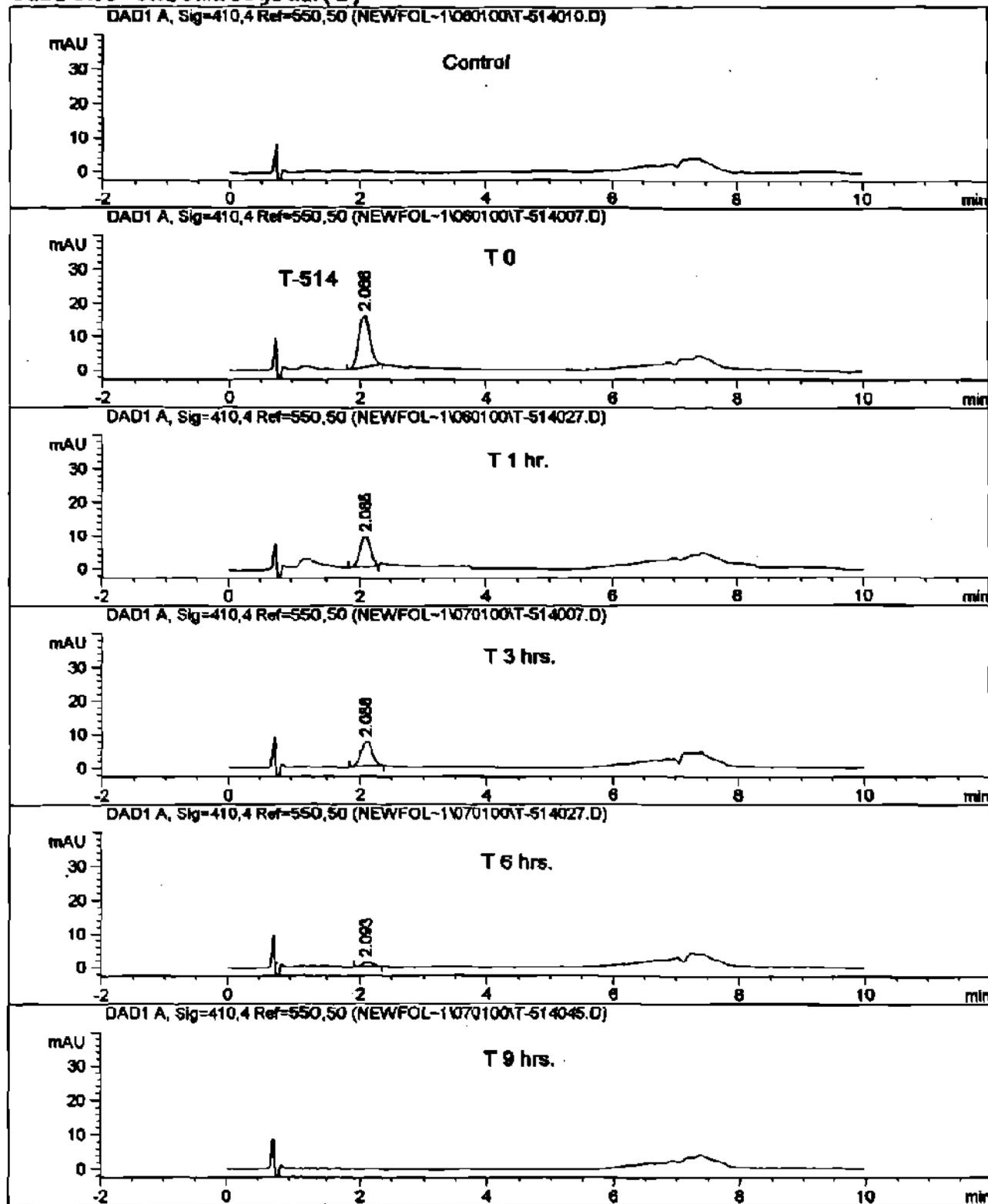


Figura 10. Cromatogramas de T-514 en microsomas de perro (250 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

Figura 11. Cromatogramas de T-514 en microsomas de perro (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Current Chromatogram(s)

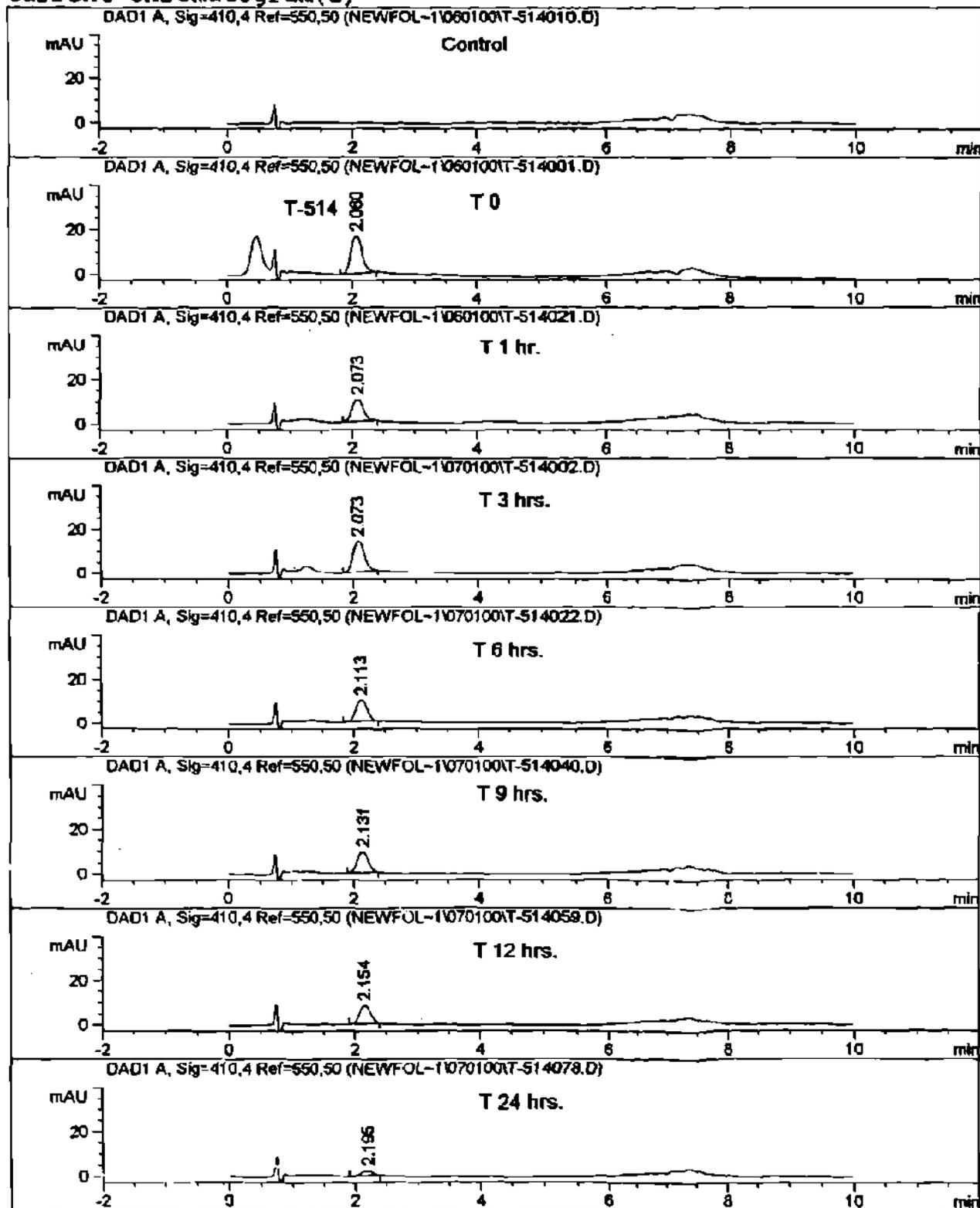
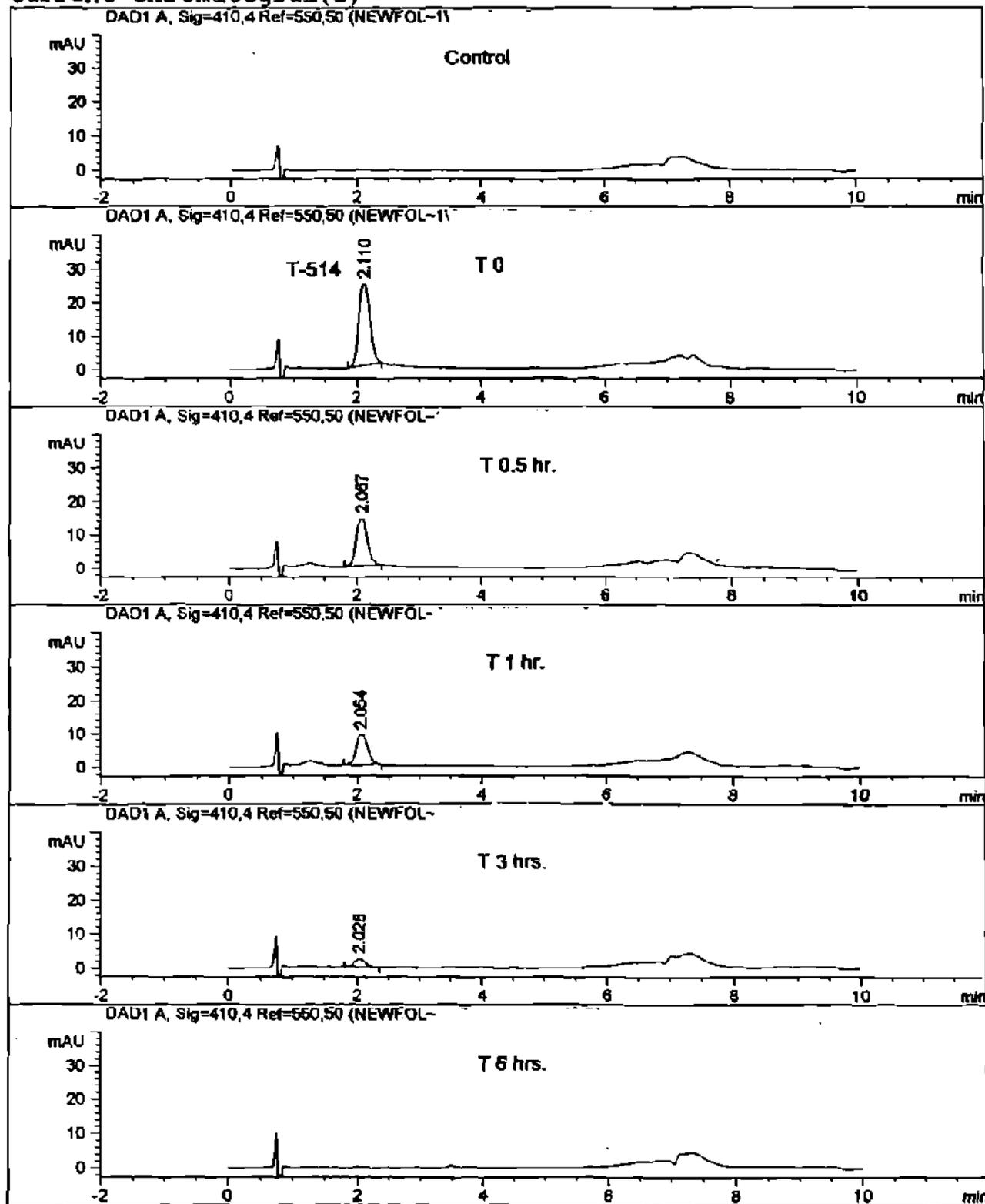


Figura 12. Cromatogramas de T-514 en microsomas de perro (12.5 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

Figura 13. Cromatogramas de T-514 en microsomas de mono (250 μ g/ml).

Current Chromatogram(s)

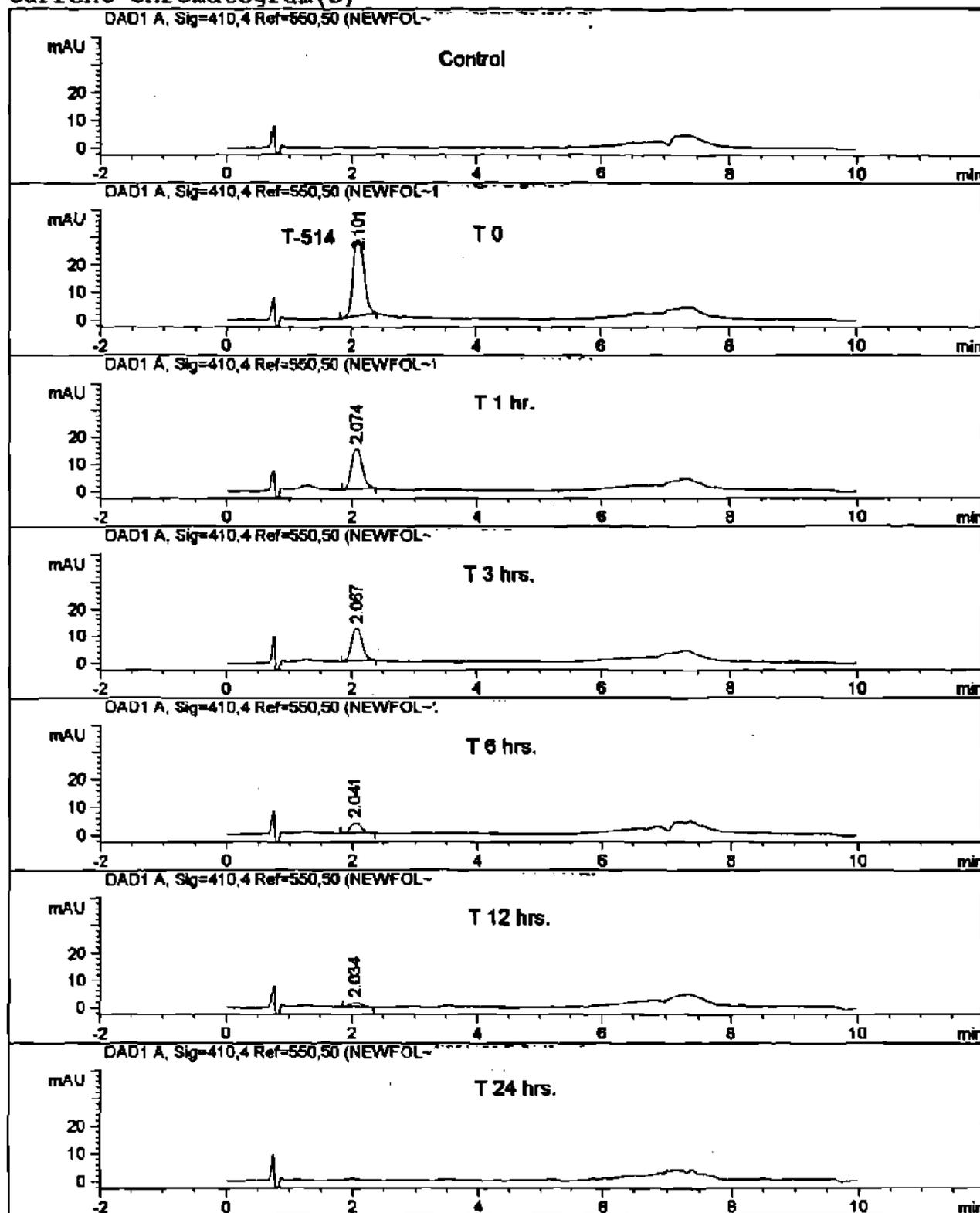


Figura 14. Cromatogramas de T-514 en microsomas de mono (125 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

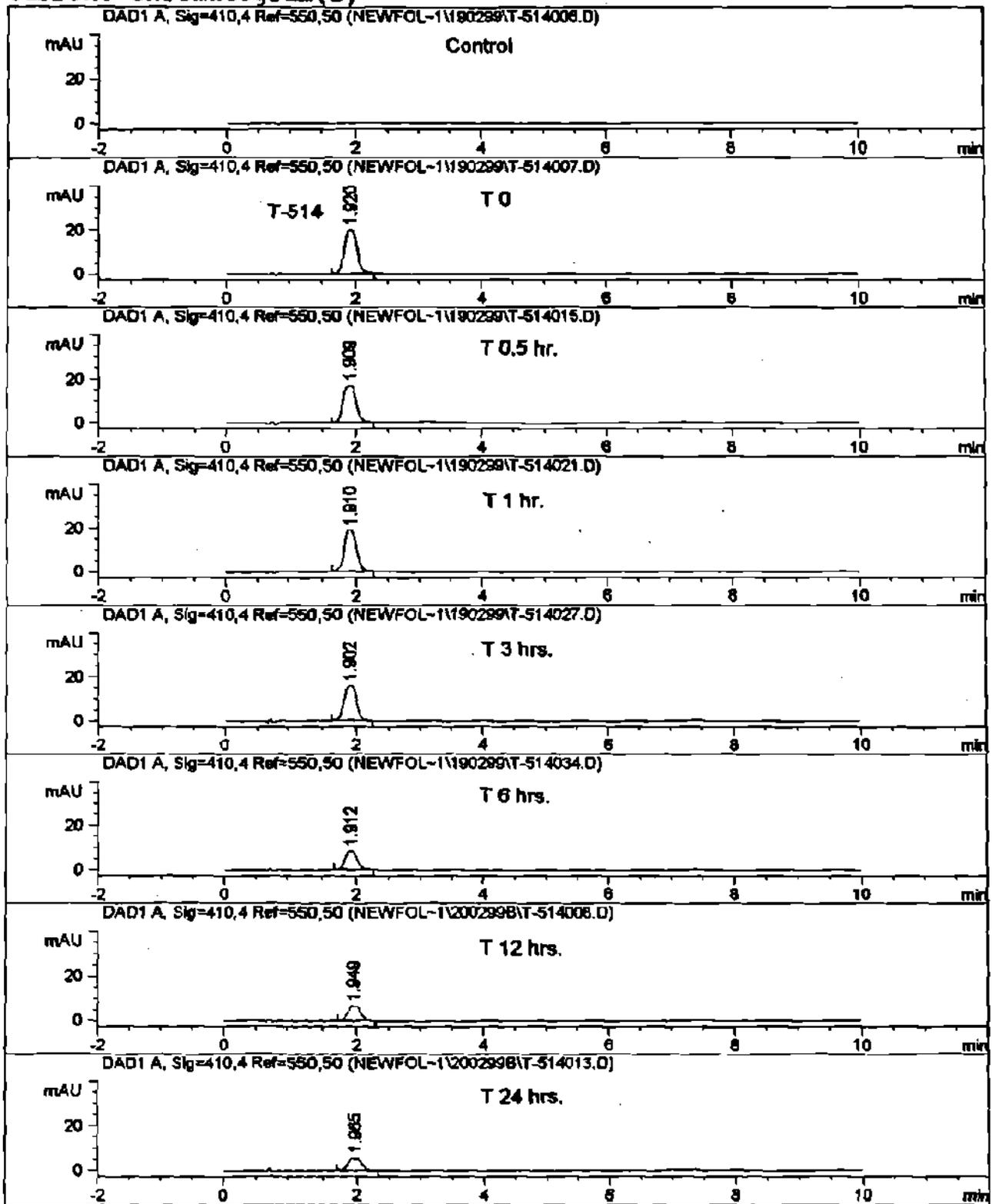


Figura 15. Cromatogramas de T-514 en microsomas de mono (12.5 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

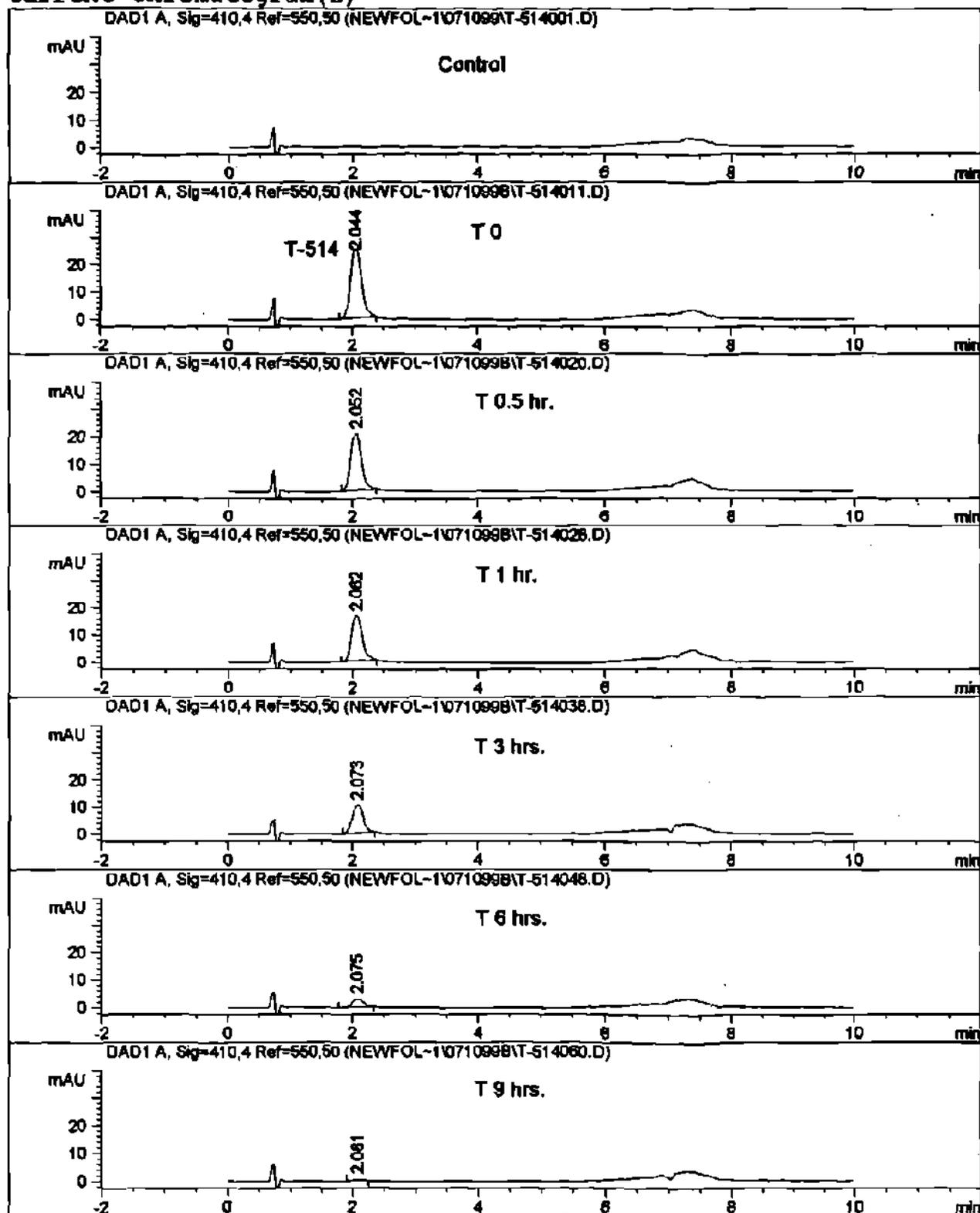


Figura 16. Cromatogramas de T-514 en microsomas de origen humano (250 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

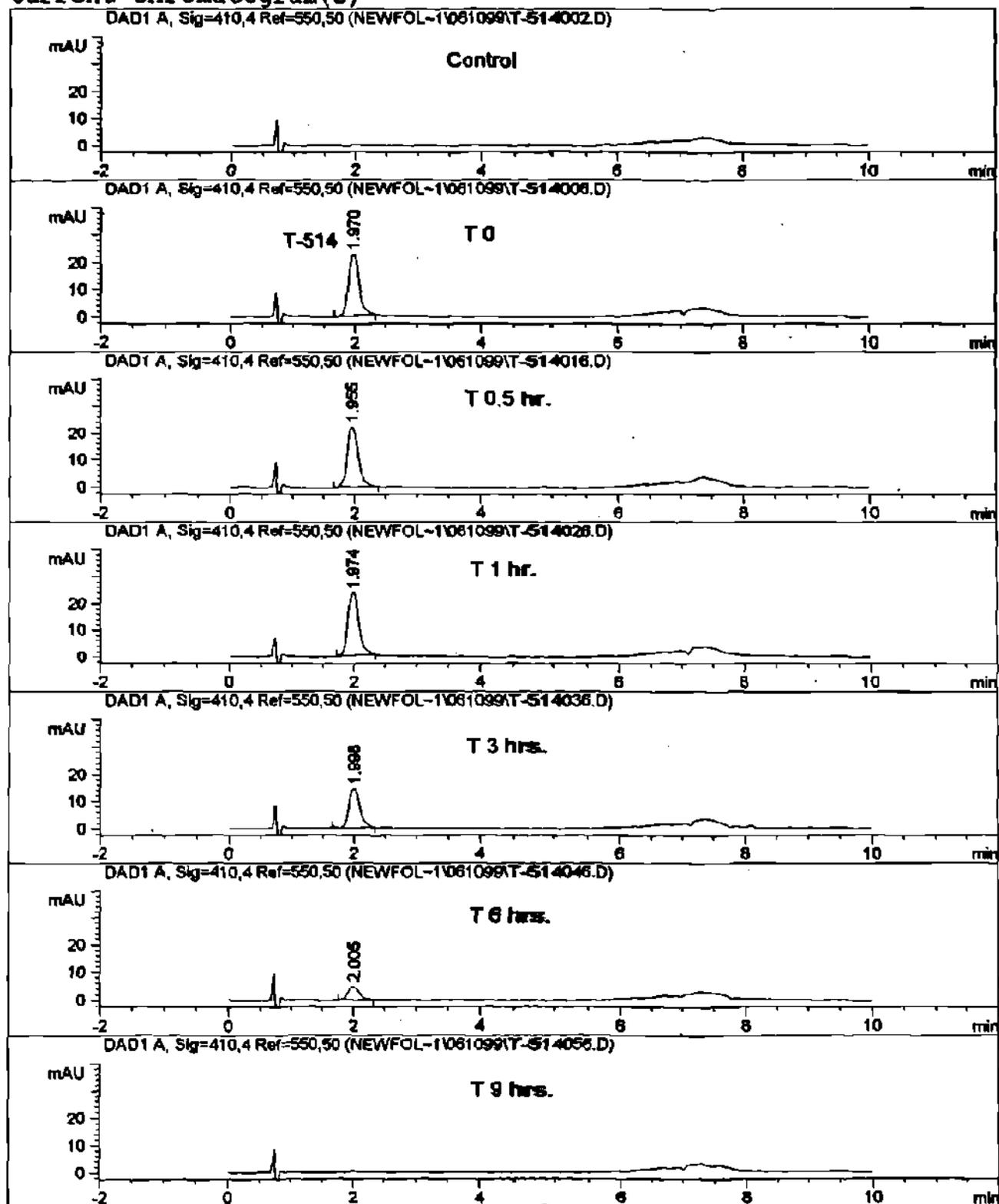


Figura 17. Cromatogramas de T-514 en microsomas de origen humano (125 µg/ml).

Current Chromatogram(s)

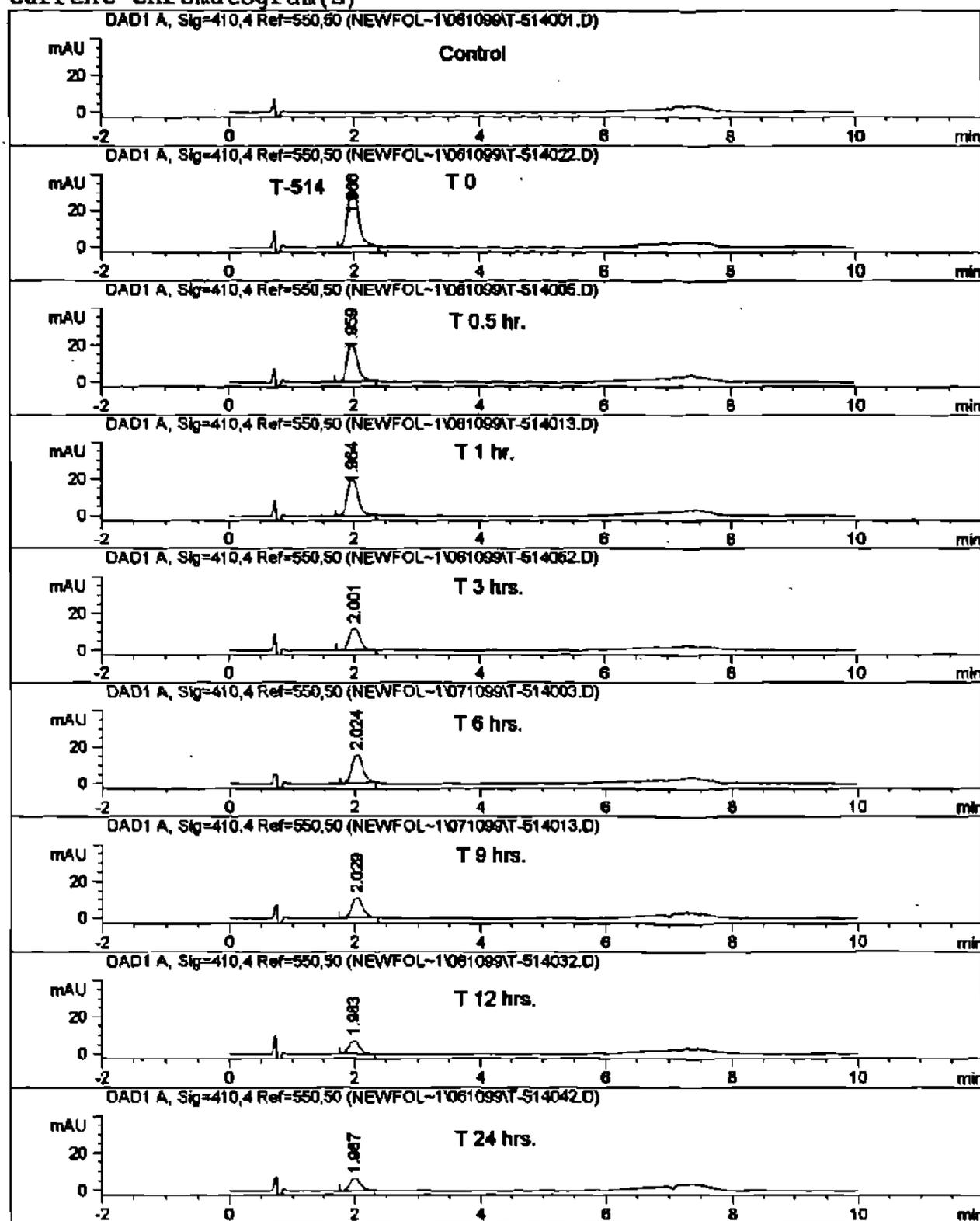


Figura 18. Cromatogramas de T-514 en microsomas de origen humano (12.5 µg/ml)

Current Chromatogram(s)

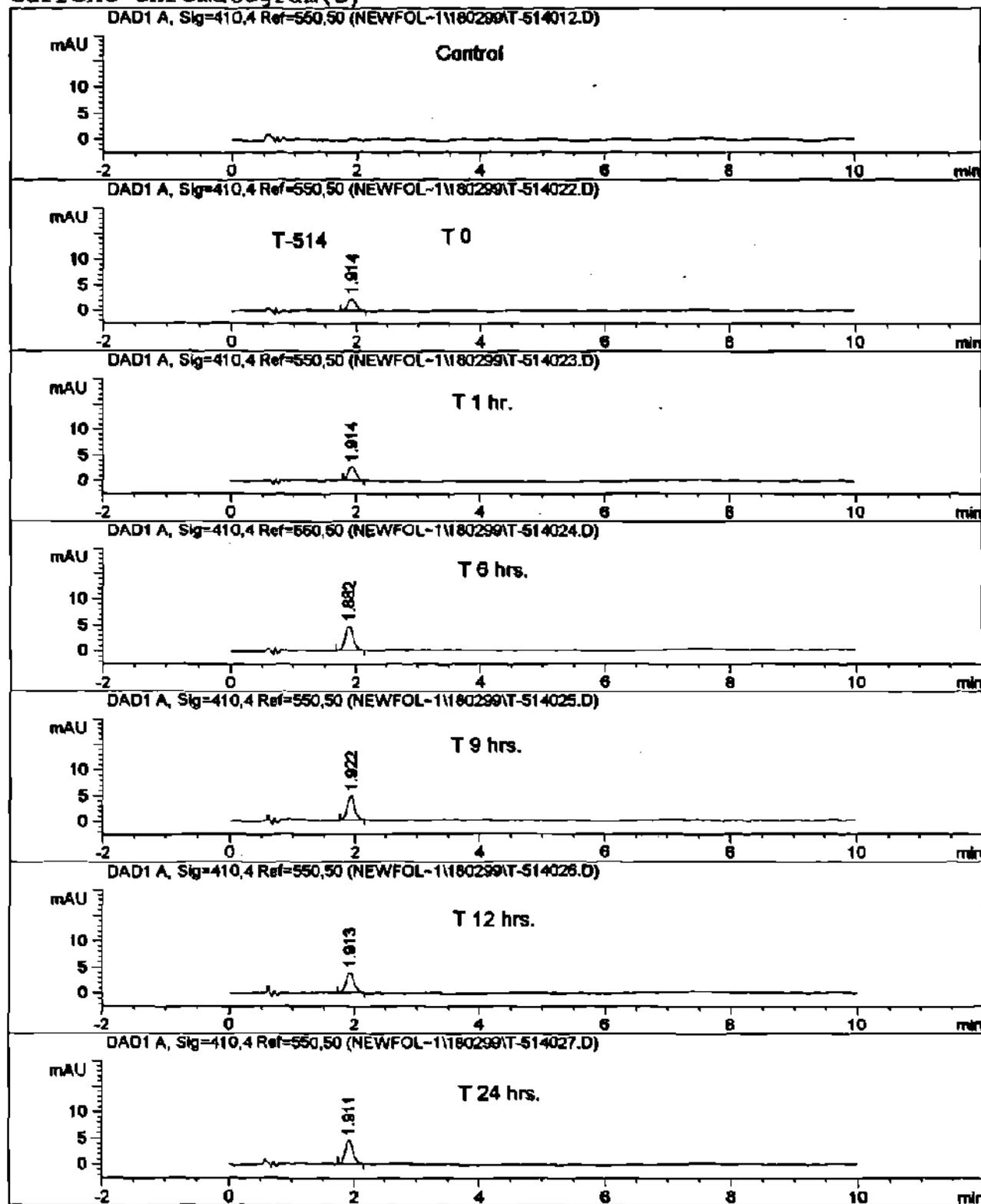


Figura 19. Cromatogramas de T-514 en hepatocitos de rata.

Current Chromatogram(s)

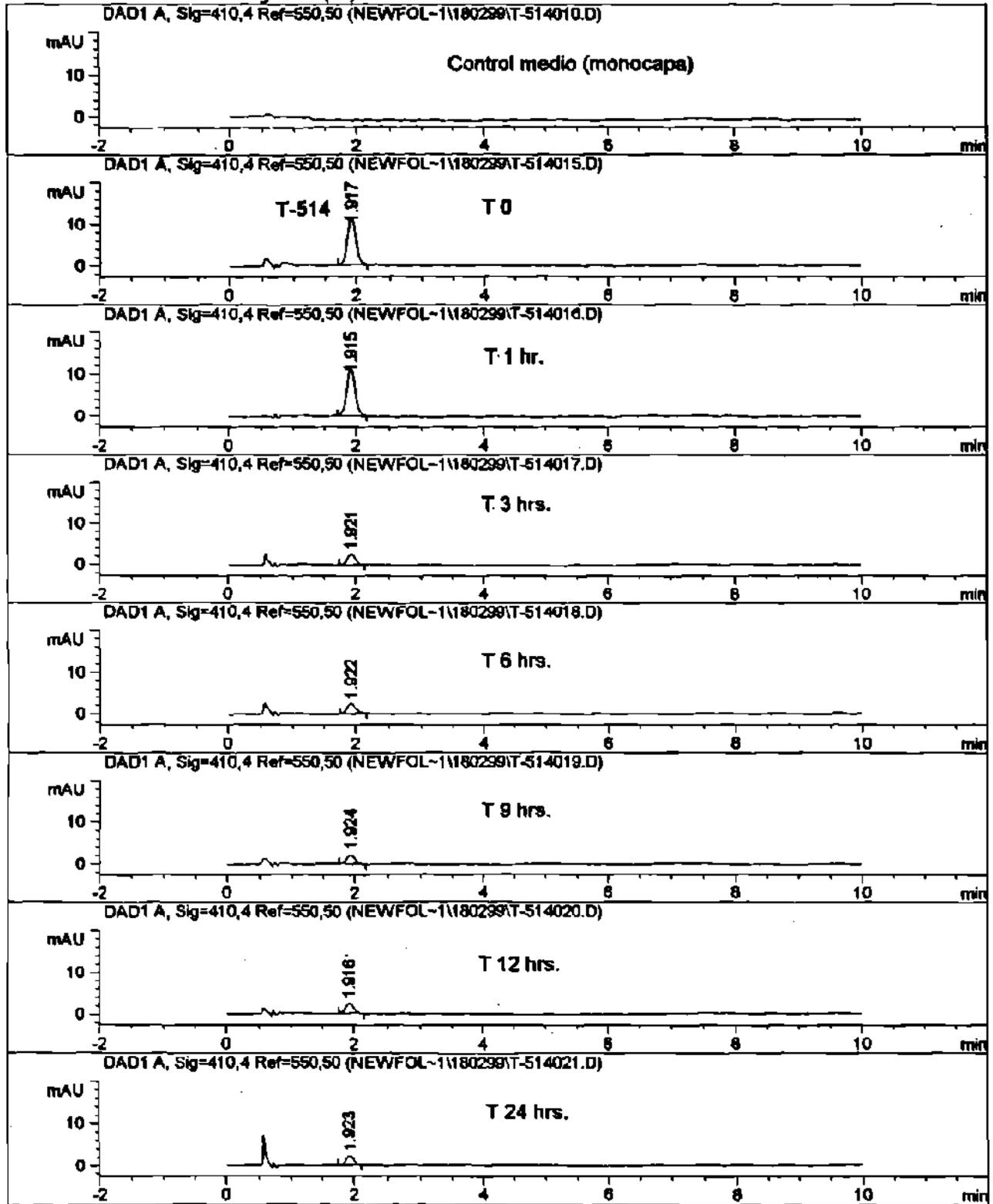


Figura 20. Cromatogramas de T-514 en el medio donde se cultivaron los hepatocitos de rata.

Current Chromatogram(s)

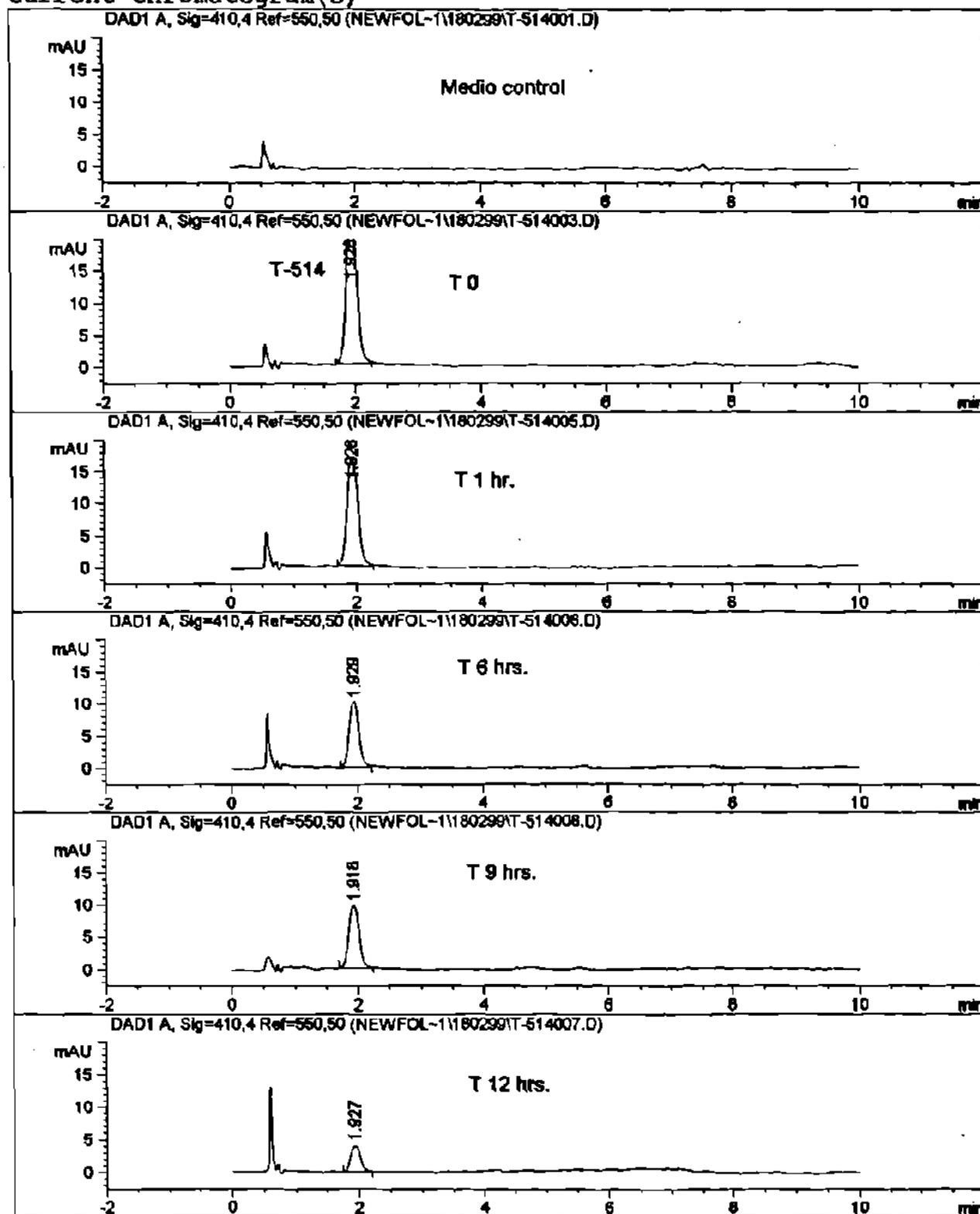


Figura 21. Cromatogramas de T-514 en el medio control.

Producto M

```

Current Data Parameters
NAME      ProductoM
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    500000
Time     9.17
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinu
PULPROG  zg
TD       16384
SOLVENT  COC13
NS       544
DS       4
SWH      7002.801 Hz
FIDRES   0.427417 Hz
AQ       1.1698676 sec
RG       322.5
DM       71.400 usec
DE       8.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.50000000 sec
P1       12.50 usec
DE       8.00 usec
SFO1     400.1333064 MHz
NUC1     1H
PL1      -3.00 dB

F2 - Processing parameters
SI       16384
SF       400.1300156 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       -0.50 Hz
GB       0
PC       1.00

1D NMR plot parameters
CX       20.00 cm
F1P      7.800 ppm
F1       3121.01 Hz
F2P      6.800 ppm
F2       2720.88 Hz
PPHCH    0.05000 ppm/cm
HZCM     20.00850 Hz/cm

```

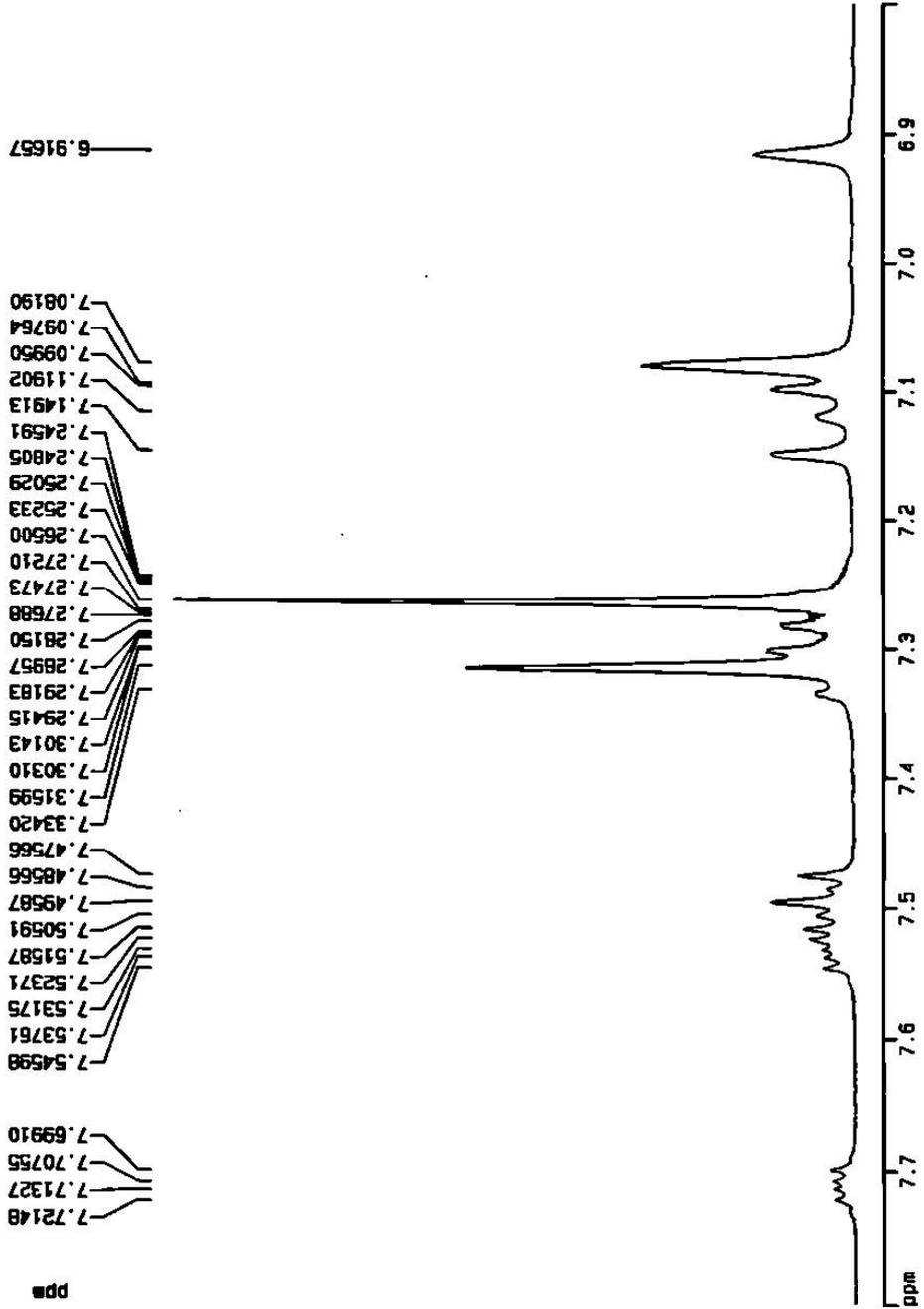


Figura 22. Espectro de ¹H RMN del compuesto M1.

Current Data Parameters
 NAME: Producto M
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 500000
 Time: 9.17
 INSTRUM: spect
 PROBR0: 8 mm Multisru
 PULPROG: zgpg30
 TO: 16364
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 344
 DS: 4
 SWH: 7002.001 Hz
 FIDRES: 0.427417 Hz
 AQ: 1.1696078 sec
 RB: 322.5
 DM: 71.400 usec
 DE: 8.00 usec
 TE: 300.0 K
 O1: 1.5000000 sec
 P1: 12.50 usec
 DE: 8.00 usec
 SF01: 400.1533064 MHz
 NUC1: 1H
 PL1: -3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI: 16384
 SF: 400.1500158 MHz
 NCU: ZN
 SS0: 0
 LB: -0.58 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00
 ID: 168
 ID parameters
 CX: 20.00 cm
 F1P: 4.372 ppm
 P1: 1748.40 Hz
 F2P: 2.736 ppm
 F2: 1008.83 Hz
 PPM04: 0.08167 ppm/cm
 WZGA: 38.87851 Hz/cm

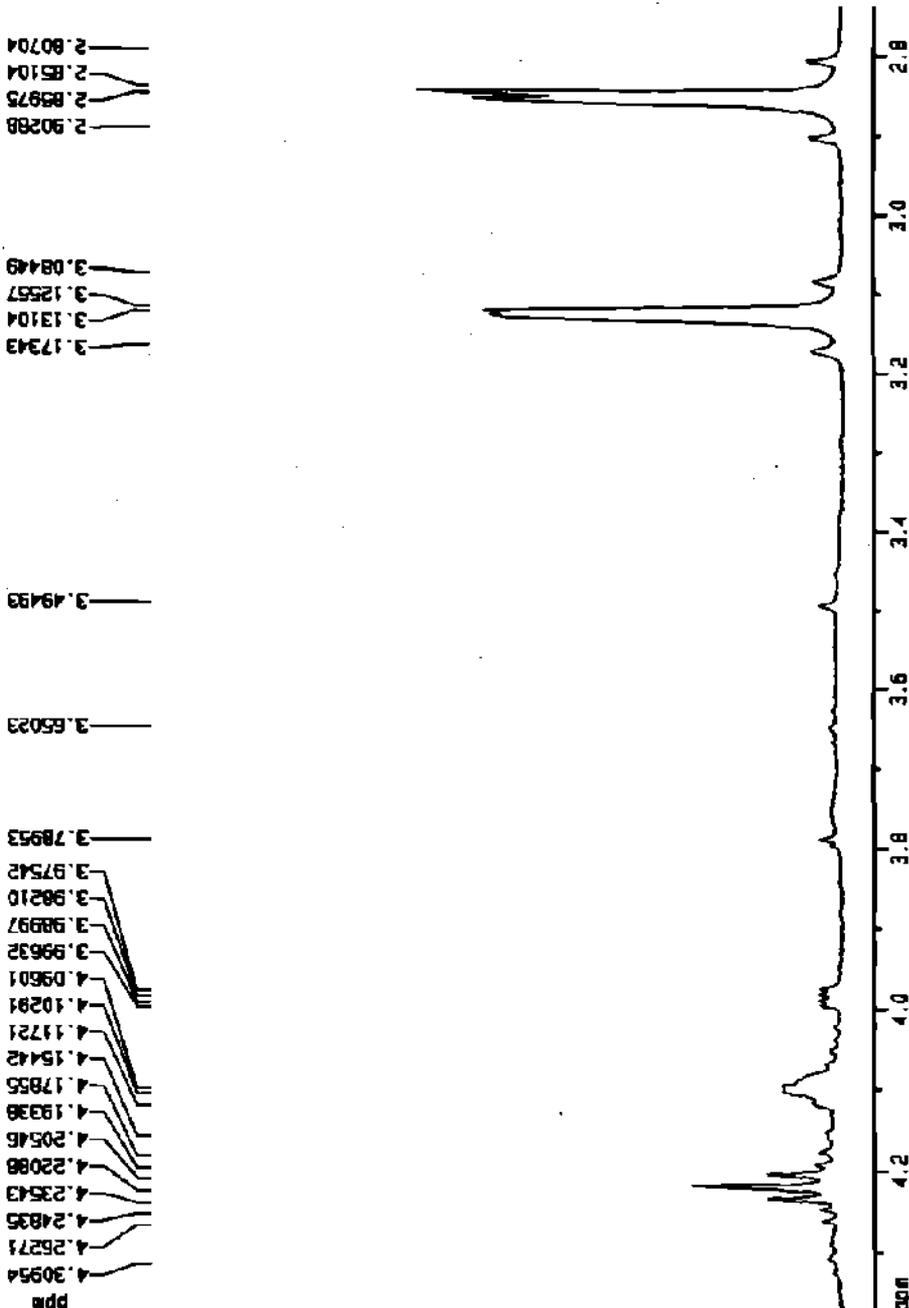


Figura 23. Espectro de ¹H RMN del compuesto M1.

Producto M

Current Data Parameters
 NAME ProductM
 EVMHD 1
 PROCMD 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 500000
 Time 9.17
 INSTRM spect
 PROBD 8 mm MxJlInu
 PULPROG zg
 TO 18384
 SOLVENT CDCl3
 NS 844
 DS 4

F10P0ES
 AQ 7002.801 Hz
 RB 0.427417 Hz
 CH 1.1698878 sec
 DE 322.9
 TE 71.400 uSec
 O1 8.08 uSec
 O2 300.8 K
 P1 1.9500000 sec
 DE 12.50 uSec
 SF01 8.00 uSec
 NUC1 400.133064 MHz
 PL1 1H
 PL2 -9.00 dB

F2 - Processing Parameters
 SI 16384
 SF 400.1300156 MHz
 NH 2H
 SSF 0
 LB -9.50 Hz
 GB 0
 PC 1.00

10 NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1F 2.508 ppm
 F1 1002.86 Hz
 F2P 0.304 ppm
 F2 121.73 Hz
 PPMCH 0.11011 ppm/cm
 HZCM 44.05796 Hz/cm

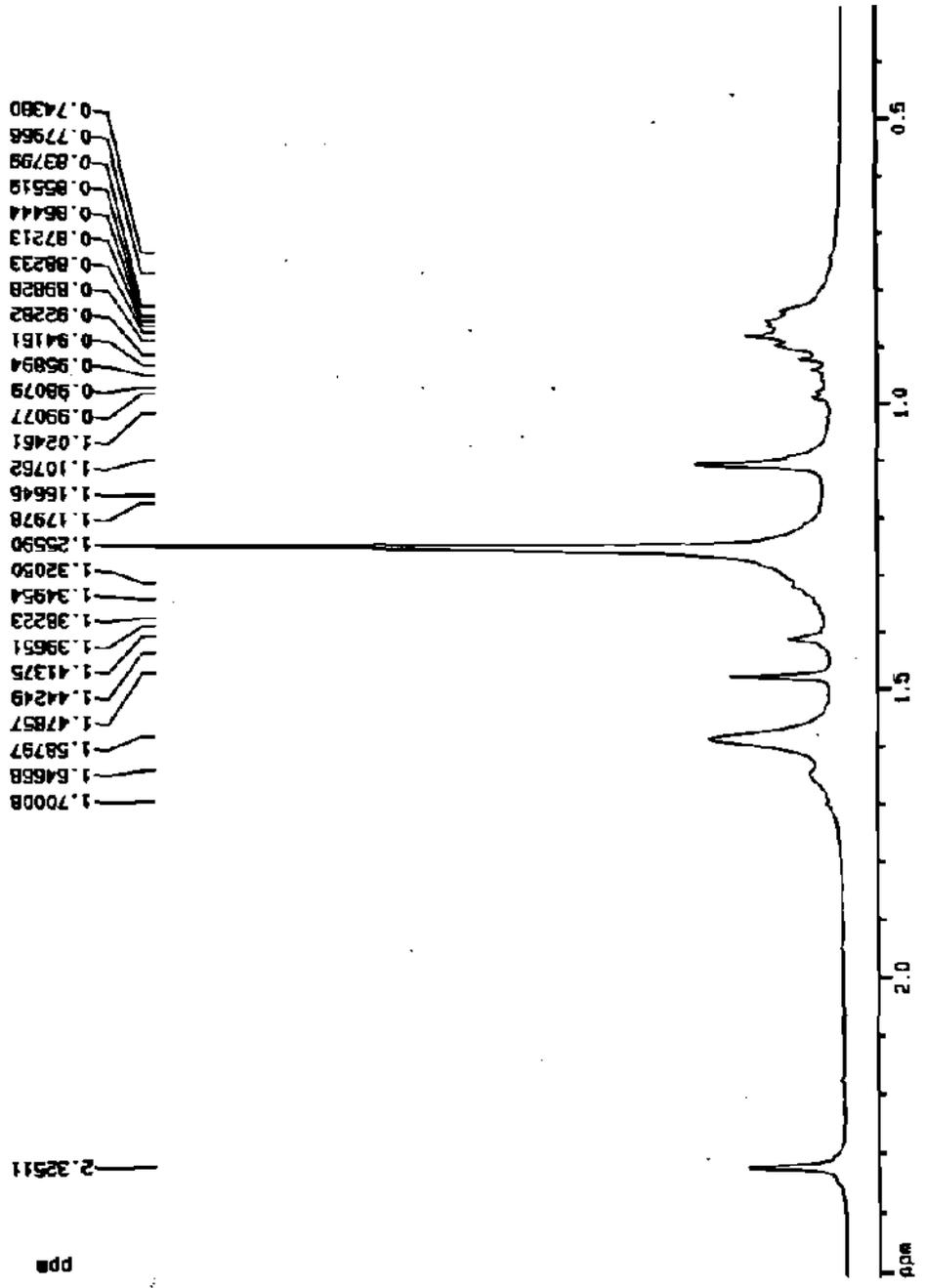


Figura 24. Espectro de ¹H RMN del compuesto M1.

Current Data Parameters
NAME ProductM
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 600000
Time 9.17
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinu
PULPROG zg
TD 16384
SOLVENT CDCl3
NS 644
DS 4
SWH 7002.861 Hz
FIDRES 0.427417 Hz
AQ 1.1628876 sec
RG 322.5
DM 71.400 umsec
DE 8.00 umsec
TE 300.0 K
D1 1.30000000 sec
P1 12.20 umsec
DE 8.00 umsec
SFO1 400.1353064 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB

F3 - Processing parameters
SI 10284
SF 400.1350156 MHz
WDW EM
SSB 0
LB -0.50 Hz
GB 0
PC 1.00

10 MHz plot parameters
CX 20.00 cm
F1P 16.976 ppm
F1 6792.17 Hz
F2P -0.526 ppm
F2 -210.63 Hz
PPOCK 0.67507 ppm/cm
WICH 360.14005 Hz/cm

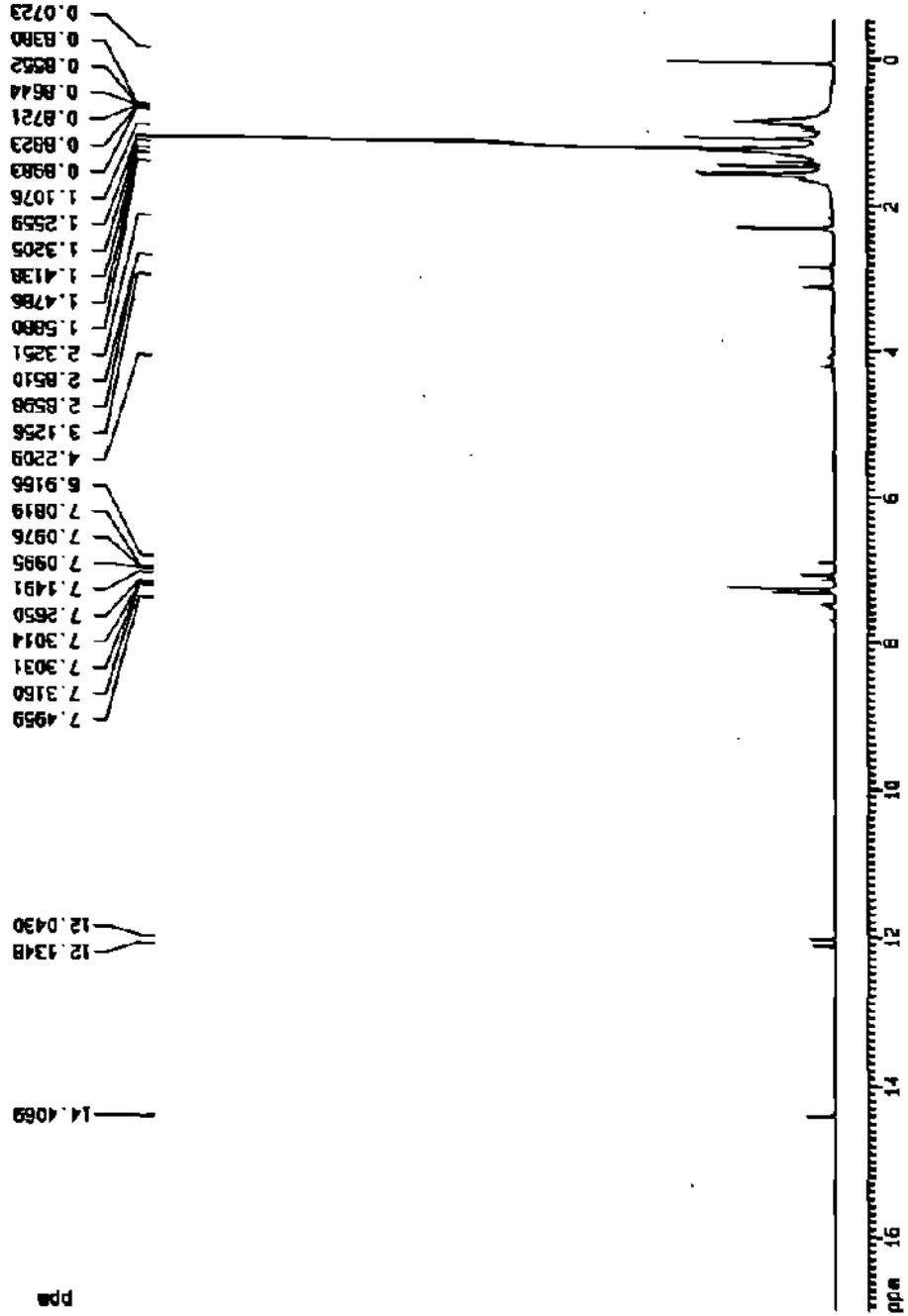


Figura 25. Espectro de ¹H RMN del compuesto M1.

Current Data Parameters
NAME ProductM
EXPTNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Data_ 500006
Time 9.17
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm HMLT1H
PULPROG zg
TD 16384
SOLVENT CDCl3
AQ 344
DS 4
SWH 7002.831 Hz
FIDRES 0.427417 Hz
AQ 1.1698678 sec
RG 322.9
DN 71.400 uBEC
DE 8.00 uBEC
TE 300.0 K
D1 1.9000000 sec
P1 12.90 uBEC
DE 8.00 uBEC
SFO1 400.1329064 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 16384
SF 400.1300128 MHz
WDW BH
SSB 0
LB -0.80 Hz
GB 0
PC 1.00

10 MHz plot parameters
CX 20.00 cm
F1P 14.687 ppm
F1 3864.84 Hz
F2P 11.824 ppm
F2 4851.13 Hz
FREQH 0.19164 ppm/cm
HZOH 60.67948 Hz/cm

12.0370
12.0430
12.1348
12.1424

14.4059

ppm

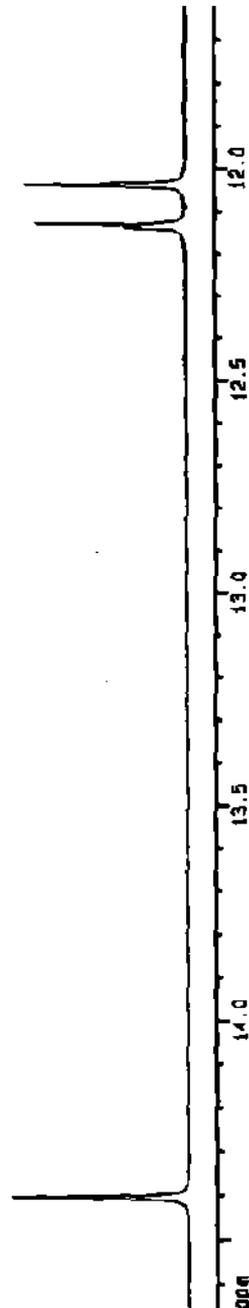
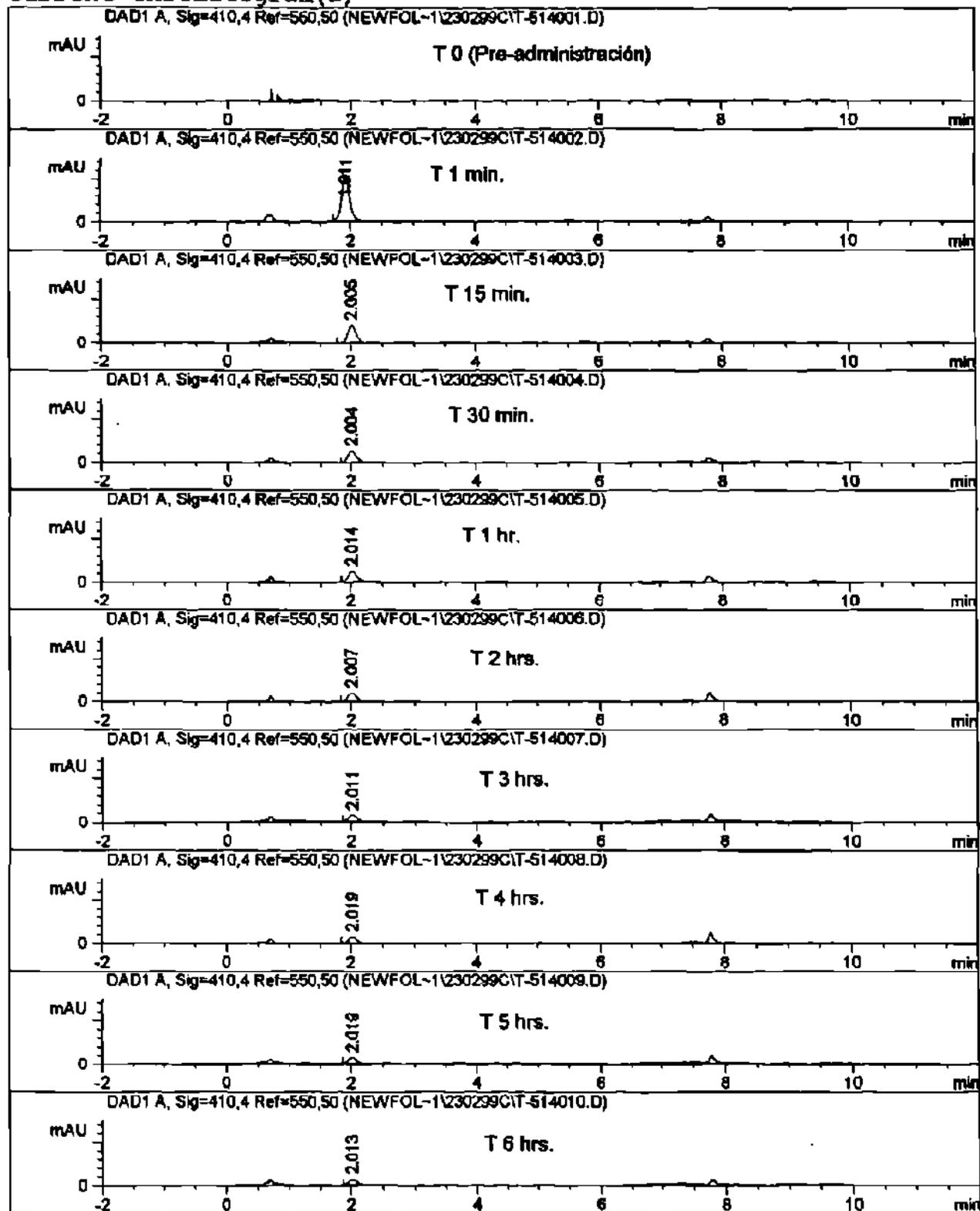


Figura 26. Espectro de 1H RMN del compuesto M1.

Current Chromatogram(s)

Figura 27. Cromatogramas de T-514 en plasma de perro *in vivo*.

Current Chromatogram(s)

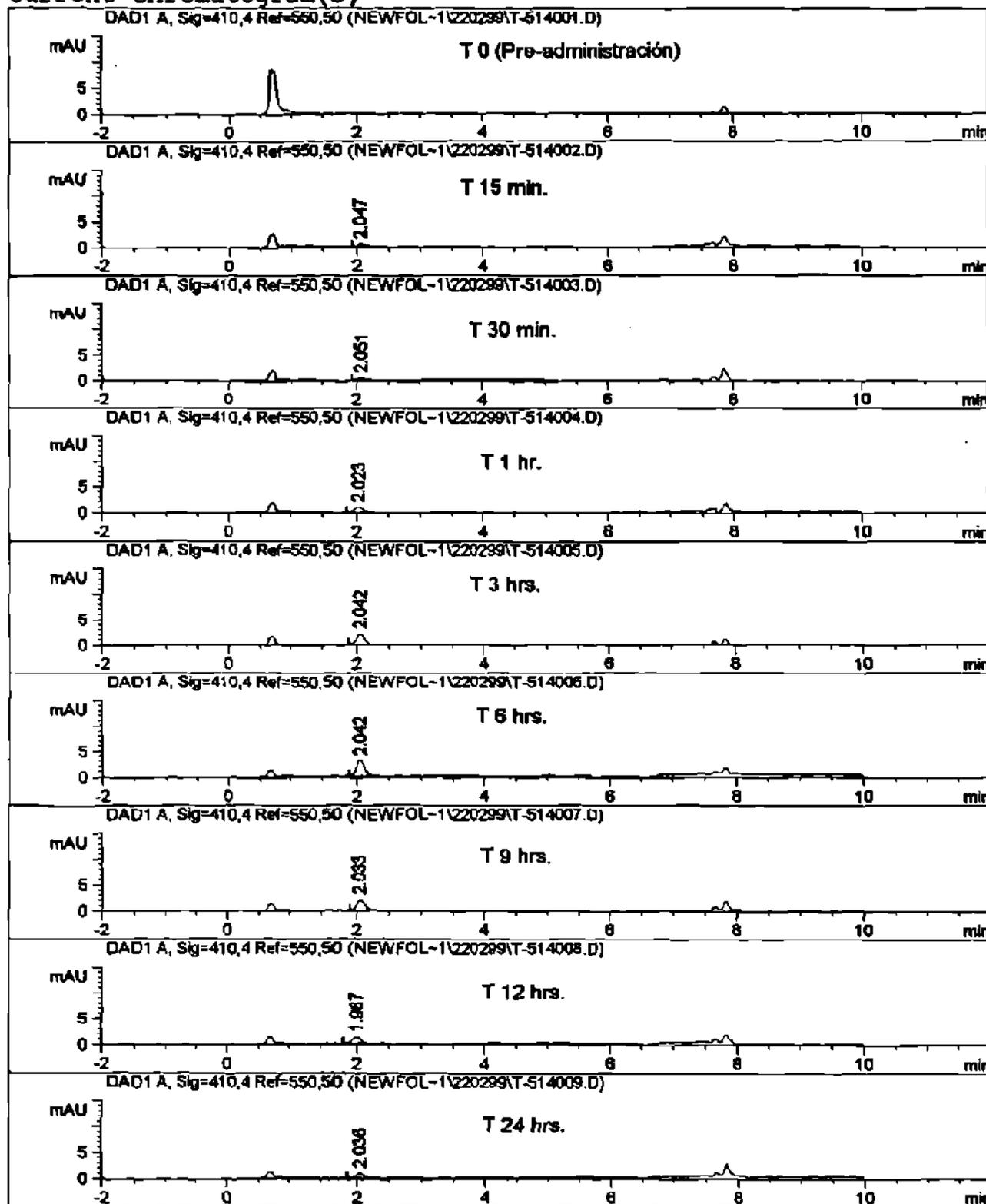


Figura 28. Cromatogramas de T-514 en plasma de pacientes del protocolo I 1/15

REFERENCIAS

1. Csaky, T.Z., "Introducción a la Farmacología General". Salvat Editores, México, (1983).
2. Flores, J. "Farmacología humana". Masson, S.A., México 3ª edición, pp 73-80.(1997).
3. Katzung, B. G. "Farmacología básica y clínica". Manual Moderno. 7ª edición. pp 61-68. (1999).
4. Rang, H. P. and Dale, M.M. "Farmacología". Churchill Livingstone. 2ª edición, pp 98-102.(1995).
5. Praet, M., Buc-Calderon, P., Pollakis, G., Roberfroid, M. and Ruyschaert, J.M. A new class of free radicals scavengers reducing Adriamycin mitochondrial toxicity. *Biochemical Pharmacology*. 37, (24), pp. 4617-4622 (1988).
6. Komiyama, T., Kikuchi, T., and Sugiura T. "Generation of hydroxy radical by anticancer quinone drugs, Carbazilquinone, Mitomycin C, Anclacinomicine A and Adriamycin, in presence of NADPH-Cytocrome P-450 reductase". *Biochem. Pharmacol.* 31(22), pp 3651-3656 (1982).
7. Lown, J.W., Chen, H.H., Plambeck, J.A. and Acton, E.M. Further studies on generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.* 31, p 575 (1982).

8. Birandra, K.S. Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chem. Biol. Interactions*, 69, pp 293-317 (1989).
9. Dallner, G., Siekowits and Palade, G.E. Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. *J. Cell. Biol.*, 30, pp 73-95 (1996).
10. Gram, T.E., Guarino, A.M., Schroder, D.H. and Gillete, J.R. Changes in certain kinetic properties of hepatic microsomal aniline hidroxilase and ethylmorphine demethylase associated with postnatal development and mauritano in male rats. *Biochem. J.*, 113, pp 681-685 (1969).
11. Van Berkel, T.J.C., Koster, J.F. and Hulsmann, W.C. Distribution of L- and M-Type pyruvate kinase between parenchymal and Kuffer cell of rat liver. *Biochem Biophys. Acta* ., 276, pp 425-429 (1972).
12. Nakamura, T. and Ichihara, A. Control of growth and expression of differential functions of mature hepatocytes in primary culture. *Cell Structure and function*., 10, pp 1-16 (1985).
13. Tomura, A., Sawada, N., Sattler, G.L., Kleinman, H.K. and Pitot, H.C. The control of DNA Synthesis in primary cultures of hepatocytes from adult and young rats: Interaction of extracellular matrix components, epidermal growth factor, and the cell cycle. *J.Cell.Physiol.*,130,pp221-227(1987).
14. Jefferson, D. M., Reid, L.M., Giambrone, M.A., Schafritz, D. A. and Zern, M, A. Effects of dexamethasone on albumin and collagen expression in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Hepatology*., 5, pp14-20 (1985).
- 15.- Steward, A. R., Wrighton, S.A., Pasco, D. S., Fagan, J.B., Li, D. and Guzelian, P. S. Synthesis and degradation of 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome P-450 and their mRNAs in primary monolayer

- cultures of adult rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 241, pp 494-508.
- 16.- Fujita, M., Spray, D. C., Choi, H., Saez, J. C., Watanabe, T., Rosemberg, L. C., Hertzberg, E. L. and Reid, L. M. Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap function expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver culture. *Hepatology* Z, pp 1S-9S (1987).
17. Mangiapane, E.H. and Brindley, D. N. effects of dexamethasone and insulin on the synthesis of triacylglycerols and phosphatidylcholine and the secretion of very-low-density lipoproteins and lysophosphatidylcholine by monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* 233, pp 151-160 (1986).
18. Gebhardt, R. Use of isolated and cultures hepatocytes in studies of bile formation, in *Isolated and Cultured Hepatocytes* (Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C., Eds.), John Libbey, London and Paris, pp 353-376 (1986).
19. Hutson, S.M., Stinton-Fischer, C., Shiman, R. and Jefferson, L. S. Regulation of albumin synthesis by hormones and aminoacids in primary cultures of rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 252, pp. E291-E298 (1987).
20. Sirica, A.E., and Pitot, H.C. Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cell. *Pharmacol. Rev.* 31, pp 205-228 (1980).
21. Grunnet, N., Kondrup, J. and Dich, J. Effect of ethanol on lipid metabolism in cultured hepatocytes. *Biochem. J.* 228, pp 673-681 (1985).

22. Guillouzo, A. Use of isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism and cytotoxicity studies, in *Isolated and Cultured Hepatocytes* (Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C., Eds.), John Libbey, London and Paris, pp 313-332 (1986).
23. Michalopoulos, G.K., Strom, S. C. and Jirtle, R.L. Use of hepatocytes for studies of mutagenesis and carcinogenesis, in *Isolated and Cultured Hepatocytes* (Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C., Eds.), John Libbey, London and Paris, pp 333-352 (1986) .
24. Vrignaud , P., Londos-Gagliardi, D. and Robert, J. hepatic metabolism of doxorubicin in mice and rats. *European J. of drug metabolism and pharmacokinetics*. 11 No.2, pp 101-105 (1986).
25. Jamis-Dow, C.A., Klecker, R.W., Katki, A.G. and Collins, J.M. Metabolism of taxol by human and rat *in vitro*: a screen for drug interactions and interspecies differences. *Cancer Chemother Pharmacol* . 36 (2), pp 107-14 (1995).
26. Valles, B., Schiller, C.D., Coassolo, P., De Sausa, G., Wyss, R., Jaeck, D., Viger-Chougnet, A. and Rahmani, R. Metabolism of mofarotene in hepatocytes and liver microsomes from different species. Comparison with *in vivo* data and evaluation of the cytochrome P450 isoenzymes involved in human biotransformation. *Drug Metab Dispos*. 23(10) pp 1051-7 (1995).
27. Fischer, U., Rohde, B., Stange, J., Nitschke, F.P., Adam, U. and Drewelow, B. Prediction of *in vivo* drug interaction from *in vitro* systems exemplified by interaction between verapamil and cimetidina using human

- liver microsomes and primary hepatocytes. *J. Clin Pharmacol.* **37** (12) pp 1150-9 (1997).
28. Mas-Chamberlin, C., Bromet, N., Olgiati, V., Girardello, R. and Lowenthal, D.T. Metabolism study of Dihidro-alfa-ergocriptina, 9,10[9,10,3H(N)] in rat and human hepatocyte cultures and rat, monkey, and human microsomes. *Am J Ther.* **4** (9-10) pp 291-9 (1997).
29. Smith, D.A. and van de Waterbeemd, H. Pharmacokinetic and metabolism in early drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* **3**(4), pp 373-8 (1999).
30. Clavijero, F. X. Plantas Nocivas y Extravagantes. En: Manuel León Portilla (Eds.), Historia de la Antigua o Baja California, Editorial Porrúa 3ª Ed., pp 31-33.(1982).
31. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Andersin, W., Smith, R. and Daves, D. Toxins causing non inflammatory paralytic neurophathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, pp 4985 (1975).
32. Waksman, N. and Ramírez, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinkia humboldtiana*. *Rev. Latinoamer. Quím.* **23/1** y **22/24**, pp. 25-27.(1992)
33. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N. " Dimeric Anthracenones from *Karwinskia species*". *Planta Medica*, **56**, pp 562 (1990).
34. Piñeyro López, Alfredo. Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T-514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina UANL, Monterrey N.L., (1990).

35. Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L. and González, R. *in vitro* selective toxicity of Toxin T-514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology*, 92, pp 217-227 (1994).
36. Martínez de Villarreal, L., González Guerrero, J.F., Vidal Gutiérrez, O. and Piñeyro López A. "Clinical phase I study of peroxisomycin in patients with recurrent cervical cancer". VI World Conference in Clinical Pharmacology and Therapeutics, Buenos Aires Argentina. (1996).
37. Sepúlveda, J., Bermúdez, M.V., Taméz, V.A., Ballesteros, R.G., Moreno, M., and Piñeyro A. Quantitative analysis of liver peroxisomes in rats intoxicated with peroxisomicine-A1. *Toxicol.Lett*, 98, pp 71-75.(1998)
38. Taméz, V.A., Sepúlveda, J., Bermúdez, M.V., and Piñeyro A. Autofagia de peroxisomas en hígado de macaco *Fascicularis* intoxicado con peroxisomicina A1 (T-514). Memorias del IX Encuentro de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UANL. (1991)
39. Sepúlveda, J., Van der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro, A., Harder, W. and Veenhuis. Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *M. FEMS Microbiology Letters*, 91, pp 207-212 (1992).
40. Gill, M., Steglich, W. Pigments of fungi. *Prog. Chem Org. Nat. Prod.*, pp 151-163 (1987).
41. Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N. and Piñeyro, A. Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Médica*, 61, pp 337-340 (1995).

42. Moreno-Sepulveda, M., Vargas-Zapata, R., Ballesteros-Elizondo, R., Piñeyro-López, A. and Sepúlveda-Saavedra, J. Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicol*, **35**, pp 777-778 (1997)
43. Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O. and Piñeyro, A. Effect of toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe²⁺-ADP complexes and NADPH *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*, **183**, pp 1550-1551 (1990).
44. Garza-Ocañas, L., Acosta, D. and Torres-Alanís, O. "Evaluation of the production of oxidative stress by toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana*." *Toxicology Letters*, Supplement 1/95, pp 52-53 (1998).
45. Guerrero de Viader, M. Viader Salvado, J. M., Zanatta Calderón, Ma.T., Piñeyro López, A. Farmacología Molecular de la T-514 Aislada de la *Karwinskia humboldtiana*. Análisis conformacional y generación de anión superóxido en sistemas enzimáticos y no enzimáticos. " IX Encuentro de Investigación Biomédica" Fac. Medicina UANL. 1991.
46. Martínez, F.J., Guo-Quing, Z., Piñeyro-López, A., Garza-Ocañas, L., Tomei, D. and Umansky, S. Apoptosis induction and cell cycle perturbation in established cell lines by Peroxisomicine A1 (T-514). *Drug and Chemical Toxicology* (en prensa).
47. Guengerich, P.F. Microsomal Enzymes Involved in Toxicology Analysis and Separation. *Principles and Methods of Toxicology*, pp 609-610. (A. Wallace Hayes Eds.) Raven Press, New York. (1982).

48. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72; ,pp 248-254 (1976)
49. Acosta, D., Anuforo, D. C. and Smith, R.V. Preparation of primary monolayer cytures of postnatal rat liver cell. *J Tissue Cult. Meth.* 6, pp35.(1980a).
50. Tolnai, S. A method for viable cell count. In: *Tissue Culture Association Manual*, p 37 (Evans, V. J. and Vincent, M.M., eds.) Rockville, MD: Tissue Culture Association.
51. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65 ,p 225.
52. Ekwall, B. and Johanson, A. Preliminary studies on validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using hela cells. 1. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicology Letters*, 5, pp 199-210 (1980).
53. Sterlake, B.J., Waigh, R.D., Urwin, J., Dewar, G.H. and Coker, G.G. Atracurium: Conception and Inception. *Br. J. Anaesth.* 55 ,pp 3S-10S (1983).
54. Stiller, R, L., Ryan-Cook, D. and Chakravorti ,S. *In vitro* degradation of Atracurium in human plasma. *Br. J. Anaesth.* 57 , pp 1085-1088 (1985).
55. Fisher, D.M., Canfell, C., Fahey, M.R., Rosen, I.J., Rupp, M.S., Sheiner, L.B., Miller, R.D. Elimination of Atracurium in Human: Contribution of Hofmann Elimination and Ester Hydrolysis versus Organ-based Elimination. *Anesthesiology* . 65 , pp 6-12 (1986).

56. Carthy, B.B. and Hill, G.T. Some Aspects of the Analysis and Stability of Atracurium Besylate. *Anal. Proc.* 20, pp 177-179 (1983).
57. Nigrovic, V. and Banoub, M. Farmacokinetic Modelling of Parent Drug and its metabolite Atracurium and Laudanoside. *Clinic Pharmacokinet.* 22, pp 396-408 (1992).
58. Geigy Scientific Tables. Buffer Solutions. Vol. 3, pp 58-61. Edited by C. Lentner, Ciba-Geigy (1984).
59. Salazar, M.L., Piñeyro, A. and Waskman, N. A reverse phase HPLC method for quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. *Journal of Liquid chromatography & related technologies.* 19(9), pp 1391-1403 (1996).
60. Wagner, H., Bland, S. and Zgainski. Plant Drug Analysis. Springer-Verlag Eds. pp 93-96. (1984).
61. Waskman de Torres Noemí, Dra. Comunicación personal.
62. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N. Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Médica*, 56, pp 562 (1990).
63. Bermúdez, M.V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. (1986). Experimental intoxicación with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboltiana*). *Toxicon* 24, 1091.(1986).



