

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
INVESTIGACIÓN FITOFARMACOLÓGICA

ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA DE LA
KRAMECINA EN MODELO ANIMAL

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

JOSÉ LEONARDO FLORES ROMERO
MATRÍCULA 2113804070

COMITÉ TUTORIAL

Co-Tutora: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez
Co-Tutora: Dra. Norma Cecilia Cárdenas Ortega
Asesor: Dr. Cuauhtémoc Pérez González

MAYO, 2014

ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA DE LA
KRAMECINA EN MODELO ANIMAL

Vo. Bo. Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Vo. Bo. Dra. Norma Cecilia Cárdenas Ortega

Vo. Bo. Dr. Cuauhtémoc Pérez González

Q.F.B. José Leonardo Flores Romero,
Matrícula 2113804070

ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA DE LA
KRAMECINA EN MODELO ANIMAL

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dra. Silvia Romano Moreno
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Profesora Investigadora Nivel VI

Vocal: Dr. Eulises Díaz Díaz
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Investigador en Ciencias Médicas C.

Secretaria: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco
Profesora Investigadora Titular C

Resumen

La kramecina es un compuesto con estructura de peróxido cíclico, con actividad anti-inflamatoria aislado de las partes aéreas de *Krameria cytisoides*, cuya toxicidad aguda es extremadamente baja. En la literatura no existe información sobre la farmacocinética del compuesto ni se describen métodos analíticos para su cuantificación.

En el presente trabajo se describe un método para la cuantificación de kramecina por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y se proponen métodos para la preparación de las muestras biológicas detallando sus limitaciones. De manera similar, se plantea un método para radiomarcarse kramecina, cuantificarla en fluidos biológicos y estimar sus parámetros farmacocinéticos a partir del curso temporal plasmático de la misma tras una administración oral.

La kramecina fue cuantificable por HPLC cuando se encontraba disuelta en metanol; la respuesta es lineal en un intervalo de 100 a 300 µg/mL. Sin embargo, no fue posible su cuantificación en plasma debido a interferentes de la matriz que eluyeron al mismo tiempo de retención que la kramecina; dichos interferentes no pudieron eliminarse por los métodos propuestos para el tratamiento de las muestras.

En presencia de yodo-125 y cloramina T, se obtuvo un derivado halogenado de kramecina denominado KACY-I. Tras la administración oral, se distribuye en el organismo y emite radiación gamma por lo que pudo ser cuantificada con un contador de centelleo. Con las concentraciones plasmáticas de KACY-I a diferentes tiempos se estimaron los parámetros farmacocinéticos de la molécula; además, se construyeron las curvas del curso temporal del compuesto en hígado y riñón.

Agradecimientos institucionales

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme proporcionado los recursos económicos necesarios para solventar los gastos asociados al posgrado mediante el otorgamiento de la beca 266074 del Programa Nacional de Posgrados.

De manera similar, quiero manifestar mi agradecimiento a los laboratorios de “Investigación Química Orgánica y Productos Naturales” y de “Obtención de Compuestos Orgánicos” del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, por brindarme el espacio y los recursos necesarios para la realización de este trabajo.

Asimismo, deseo hacer patente mi agradecimiento al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por proporcionarme las facilidades necesarias para llevar a cabo algunas de las actividades experimentales y a los laboratorios de “Farmacognosia y Química Farmacéutica” y de “Tecnología y Control de Medicamentos” por apoyarme con algunas tareas propias del estudio farmacocinético aquí presentado.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a todas las personas que creyeron en el proyecto, a mi familia y a mis seres queridos, particularmente a mis padres y a Emma por brindarme su apoyo incondicional.

A los compañeros del laboratorio que me auxiliaron en algunos de los experimentos involucrados en este trabajo y que me brindaron su amistad.

A mis profesores, en especial a mis co-tutoras y mi asesor, por su paciencia en la realización de las actividades relacionadas a la investigación y por los consejos que me brindaron en pro de mi desarrollo personal.

A todos los que apoyaron durante mi estancia en el DF, especialmente la señora Gloria que, gracias a su nobleza y gentileza, hizo más ligera mi estancia en la ciudad.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	4
2.1 El proceso inflamatorio.....	4
2.2 Plantas medicinales	5
2.3 <i>Krameria cytisoides</i>	5
2.4 Kramecina	6
III. Marco Teórico.....	8
3.1 Estudios preclínicos y técnicas analíticas.....	8
3.2 Estudios con moléculas radio-marcadas.....	9
3.3 Estudios farmacocinéticos.....	10
3.4 Modelos farmacocinéticos	11
IV. Planteamiento de problema	13
V. Hipótesis.....	14
VI. Objetivos.....	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos.....	15
VII. Materiales y métodos.....	16
7.1 Material biológico.....	16
7.1.1 Planta.....	16
7.1.2 Animales	16
7.2 Obtención de kramecina.....	16
7.3 Obtención del plasma	17
7.4 Cuantificación de kramecina por HPLC	17

7.5 Curva de calibración	17
7.6 Tratamiento de muestras adicionadas con kramecina	18
7.7 Estudio comparativo de métodos de precipitación de proteínas	18
7.8 Determinación de unión a proteínas por electroforesis	19
7.9 Marcaje de la kramecina con yodo-125	20
7.9.1 Yodación de la kramecina	20
7.9.2 Purificación de la kramecina radiomarcada (KACY-I)	20
7.9.2.1 Cuantificación de KACY-I en contador de centelleo	20
7.9.3 Prueba preliminar de cuantificación en muestras biológicas	21
7.9.3.1 Tratamiento de las muestras biológicas	21
7.9.3.2 Registro de las cuentas radiactivas.....	21
7.10 Estudio de la cinética y biodistribución de KACY-I.....	21
VIII. Resultados y discusión	22
8.1 Cuantificación de Kramecina por HPLC fase reversa	23
8.2 Precipitación de proteínas.....	23
8.3 Efecto matriz.....	25
8.4 Determinación de unión a proteínas.....	26
8.5 HPLC de intercambio iónico para carbohidratos	26
8.6 Marcaje con yodo-125.....	27
8.7 Estudio farmacocinético de KACY-I	28
IX. Conclusiones	38
X. Referencias.....	39
Anexo I	43

1. Introducción

Existe un gran número de moléculas con actividad biológica. Sin embargo, para que una molécula pueda llegar a formar parte de un medicamento, debe superar una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo* que demuestren su seguridad y eficacia. Estas pruebas conforman los estudios farmacológicos y precisan de una etapa pre-clínica y de una etapa clínica.

En la primera, se demuestra la seguridad y eficacia del fármaco en modelos animales, mientras que en la segunda se involucran seres humanos. La etapa clínica consiste de cuatro fases; en la primera de ellas, el fármaco en estudio se administra a individuos sanos con la finalidad de determinar el metabolismo y la actividad del mismo. Los estudios en fase I permiten, además, conocer los efectos adversos y, en algunos casos, evidenciar la eficacia del fármaco (Agency, 1998).

Para llevar a cabo tales estudios es necesario conocer la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco en modelos animales, además de contar con información sobre toxicidad aguda y toxicidad crónica. Esto se logra mediante estudios pre-clínicos *in vivo* que permiten estimar la dosis inicial en humanos con el fin de salvaguardar la integridad de los individuos involucrados en estudios clínicos exploratorios (European Medicines Agency, 2009).

Los parámetros farmacocinéticos serán estimados en animales a partir del curso temporal del fármaco en los fluidos biológicos y la cuantificación del mismo o sus metabolitos requiere del uso de diferentes métodos analíticos. Dentro de las técnicas que se pueden emplear, una de las más importantes es la cromatografía que, a diferencia de otros métodos de separación, por sus límites de detección permiten trabajar con muestras pequeñas (Singh, 2002). La selección de una técnica cromatográfica adecuada depende de las propiedades fisicoquímicas del analito y de la complejidad de la matriz donde se encuentra (Kaushal y Srivastava, 2010).

Cuando se trata de hacer determinaciones con muestras biológicas es necesario someterlas a un tratamiento previo con la finalidad de eliminar el mayor número

de componentes que puedan interferir y, de esta forma aumentar el límite de detección. Este tratamiento puede involucrar diferentes técnicas, por ejemplo: extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido, remoción de partículas por centrifugación, diálisis o filtración, entre otros (Snyder y col., 2010).

Una vez seleccionado el método para llevar a cabo la determinación del fármaco en la muestra de fluidos biológicos, éste puede ser administrado y cuantificado en los animales de experimentación, a diferentes tiempos y de esta manera poder construir un perfil farmacocinético. En la construcción de los mismos se emplean modelos que describen la distribución de un fármaco en el organismo. Existen dos tipos de modelos, los compartimentales, en el cual se considera que existe un espacio físico donde reside la sustancia en estudio y ésta es depurada a una tasa constante (Vinci y col., 2008). Por otro lado están los modelos no compartimentales, donde la cinética del fármaco se analiza en función de momentos estadísticos que describen la concentración plasmática a lo largo del tiempo, así como la tasa de excreción urinaria del fármaco tras la administración de una dosis única (Yamaoka y col., 1978).

En el presente trabajo se describe un método para la cuantificación de kramecina (molécula con actividad anti-inflamatoria) por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y se proponen métodos para la preparación de las muestras biológicas detallando sus limitaciones. De manera similar, se plantea un método para radiomarcarse kramecina, cuantificarla en fluidos biológicos y estimar sus parámetros farmacocinéticos a partir del curso temporal plasmático de la misma tras una administración oral.

Kramecina

La kramecina es un compuesto con estructura de peróxido cíclico, con actividad anti-inflamatoria aislado de las partes aéreas de *Krameria cytisoides*, cuya toxicidad aguda es extremadamente baja. A diferencia de otros anti-inflamatorios no esteroideos asociados con daños hepatocelulares y renales (Brooks y Day, 1991), no se observaron daños en hígado, pulmón, corazón, ni riñón en ratones CD1 tras la administración 5 000 mg/kg (Pérez-Gutiérrez y col., 2012).

Dado que en la literatura no existe información sobre la farmacocinética del compuesto ni se describen métodos analíticos para su cuantificación, el presente trabajo corresponde al primer acercamiento a la estimación de sus parámetros farmacocinéticos tras el radiomarcaje de kramecina con yodo-125 (KACY-I).

Los resultados mostrados en este trabajo fueron estimados a partir de la curva del curso temporal de KACY-I en plasma. Para ello se administró KACY-I a roedores por vía oral y se cuantificó la concentración plasmática a diferentes tiempos, los resultados fueron procesados con el programa WinNonlin 4.1, se eligió el modelo farmacocinético que mejor describe la relación entre la concentración plasmática y el tiempo medido a partir de la administración del compuesto. De manera adicional, se determinó si la kramecina era capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y el curso temporal del compuesto en hígado y riñón.

2. Antecedentes

2.1 El proceso inflamatorio

La inflamación es una respuesta fisiológica asociada a mecanismos de destrucción y reparación de tejidos en caso de heridas, así como protección contra infecciones, lesiones y daño tisular (Schiffer y col. 2011). Comprende un conjunto complejo de interacciones entre mediadores y células que tienen lugar en cualquier tejido como respuesta a daños traumáticos, infecciosos, post-isquémicos, tóxicos o autoinmunes (Nathan, 2002).

El proceso inflamatorio es causado por la liberación de diferentes sustancias en los tejidos, junto con migración celular en respuesta a un estímulo; en ese proceso participan prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, factor de activación plaquetaria e interleucina, entre otros (Acton, 2013).

Normalmente, la inflamación conlleva a la recuperación del organismo. Sin embargo, si la destrucción y la reparación del tejido no se llevan a cabo correctamente, la inflamación puede causar daño tisular persistente por leucocitos, linfocitos y colágeno (Nathan, 2002).

En la práctica clínica, los procesos inflamatorios son tratados con anti-inflamatorios no esteroideos y corticoesteroides, mismos que presentan algunos efectos adversos (Pérez-Gutiérrez y col., 2012). Los efectos adversos dependen de la naturaleza del fármaco e incluyen gastritis, disminución de formación ósea, cambios en el apetito, hipocalcemia, hiperglicemia, irregularidades menstruales, efectos gastrointestinales, por citar algunos (Dubois y col., 1998).

2.2 Plantas medicinales

Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad para atender problemas relacionados con la salud. Desde hace más de 2000 años, diversas culturas han empleado plantas para el tratamiento de las enfermedades. Además, en algunas ocasiones los remedios herbolarios tienen una efectividad similar a los medicamentos alopáticos (Van der Put, 1978), a tal grado que en la actualidad el 25% de las prescripciones médicas en los Estados Unidos contienen cuando menos un compuesto de origen vegetal (Pandley y col., 2011).

México es un país rico en diversidad vegetal y es el segundo lugar mundial en especies con uso medicinal. Estudios etnobotánicos revelan que de la vegetación total encontrada en las comunidades, al menos el 50% tiene algún uso medicinal (Estrada Lugo, 1994) y las plantas medicinales son una fuente importante de recursos terapéuticos de origen natural (Rates, 2001).

2.3 *Krameria cytisoides*

Krameria cytisoides Cav. es un arbusto de hasta 1.8 m de alto con hojas sedosas oblongo-lanceoladas u ovaladas de hasta 2 cm, flores color morado pálido con 5 pétalos y 4 estambres, y fruto globoso, cubierto de espinas (Figura 1) (Martínez, 1994).



Figura 1. *Krameria cytisoides*

En México, se conoce comúnmente como donapé o ratania y se utiliza en el tratamiento de cáncer de estómago, como enjuague para tratar el sangrado de encías (Martínez, 1995), en el tratamiento de diarrea, hemorroides, mucosas irritadas, inflamación de genitales, entre otros (Innvista, 2011). De su raíz se han aislado lignanos, neolignanos y nomeolignanos como el conocarpano, la licarina A, eupomatenoides, entre otros (Achenbach y col., 1987).

Esta especie figura en la lista de 112 plantas medicinales empleadas por otomíes para el tratamiento de afecciones como dolor de estómago, dolor del riñón, diarrea, fiebre, mal de ojo, entre otras. Los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Estado de Hidalgo la utilizan para curar heridas y aliviar el dolor de estómago. En esta región, las plantas medicinales representan la opción más viable para el mantenimiento de la salud ante sus condiciones socioeconómicas, geográficas y culturales (Sánchez-González y col., 2008).

2.4 Kramecina

La kramecina es un peróxido cíclico polimérico aislado de las partes aéreas de *K. cytisoides*. Está formado por seis monómeros unidos por los átomos 4 y 9

formando un enlace éter; cada uno de ellos posee un grupo peróxido y un grupo hidroxilo, como se muestra en la figura 2.

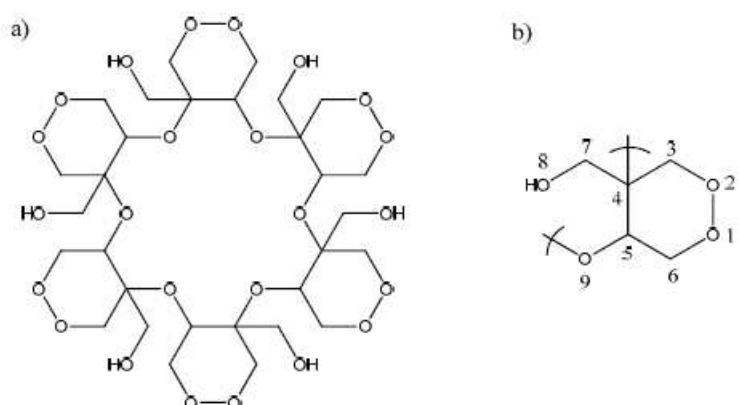


Figura 2. Estructura de la kramecina.

a) Kramecina (oligómero cíclico)

b) Monómero

En un estudio se encontró que la kramecina a dosis de 2 mg/oreja inhibía la inflamación auricular en ratón, inducida por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) al 51.8 % en forma aguda, a dosis de 50 mg/kg reducía el edema plantar inducido por carragenina en rata en un 63.1 % y en el estudio de toxicidad realizado en ratones CD1, no se observaron daños en hígado, pulmón, corazón, ni riñón después de la administración de 5 000 mg/kg (Pérez-Gutiérrez y col., 2012).

En el ensayo de respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido en macrófagos peritoneales de ratón *in vitro*, se demostró que en aquellos cuyo medio de cultivo tenía kramecina en concentraciones de 31.25 a 250 $\mu\text{g/mL}$, se inhibía la producción de factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Además, se suprimía significativamente el aumento de los niveles de ciclooxigenasa-2 (COX-2), sintetasa de óxido nítrico (iNOS) y óxido nítrico (NO). La mayor actividad se logró con 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de kramecina (Sánchez-Miranda y col., 2013).

3. Marco teórico

3.1 Estudios preclínicos y técnicas analíticas

Todo fármaco debe superar una serie de estudios clínicos y preclínicos antes de emplearse en la terapéutica. Para el desarrollo de los estudios clínicos se necesita conocer el perfil farmacocinético del principio activo a evaluar, mismo que es determinado en modelos animales de experimentación (Bacchieri y Della Cioppa, 2007).

Los estudios de farmacocinética involucran la determinación del principio activo en fluidos biológicos; esto, a su vez, requiere que el método analítico permita conocer la concentración del analito (o analitos) de interés con exactitud en su matriz biológica. Las técnicas analíticas más comunes incluyen métodos cromatográficos convencionales (GC-ECD y HPLC-UV), espectroscopía (GC-MS y LC-MS), espectroscopía tándem (LC-MS-MS) y ensayos con ligandos (RIA y ELISA) (Shan y col., 2000).

Los métodos cromatográficos son una herramienta analítica empleada en la detección de fármacos y separación de componentes de mezclas complejas o soluciones diluidas. En los sistemas cromatográficos la separación depende de las características del analito, la fase móvil y la fase estacionaria (Singh, 2002).

Independientemente de la técnica analítica elegida, la muestra debe ser representativa, por lo que el método de muestreo debe ser estadísticamente válido. Las muestras frecuentemente se someten a tratamientos para remoción de partículas, extracción de analitos, derivatización u otros procesos como eliminación de sales, evaporación o liofilización con la finalidad de eliminar el mayor número de componentes que puedan interferir en el análisis.

Los métodos empleados en la preparación de la muestra incluyen la extracción en fase sólida (EFS), extracción líquido-líquido, liofilización, microdiálisis, entre otros. En EFS, la muestra se hace circular a través de una columna empacada y en la fase estacionaria se separa de manera selectiva el analito de los componentes de

la matriz, por lo que además de ser un método de purificación, puede emplearse para concentrar el analito.

En el caso de la extracción líquido-líquido, la muestra es particionada entre dos fases inmiscibles y los analitos se recuperan de una de ellas. La eficiencia de la separación depende del coeficiente de partición (K_D) y puede alterarse modificando parámetros como pH, temperatura, iones en solución, entre otros. Uno de los problemas que se pueden presentar es la formación de emulsiones. Entre las técnicas destacadas para la purificación de los analitos se encuentran la diálisis, la ultrafiltración y ósmosis inversa (Snyder y col., 2010).

3.2 Estudios con moléculas radio-marcadas

Otra práctica común en los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos es el uso de moléculas radio-marcadas (Isin y col., 2012).

Los estudios *in vivo* en animales de experimentación con compuestos radio-marcados proveen información de la excreción del fármaco y compuestos relacionados. Dichos estudios son empleados, generalmente, para determinar el balance de masa, las rutas de eliminación, la tasa de absorción, la distribución del compuesto en órganos y tejidos, la exposición al compuesto y a sus metabolitos, validar las especies empleadas en estudios toxicológicos y determinar si los metabolitos contribuyen al efecto terapéutico o causan toxicidad (Penner y col., 2012).

La selección del radioisótopo, su posición en la molécula, la pureza radioquímica y la actividad específica son parámetros importantes para el diseño de estudios con compuestos radio-marcados. Debido a que el carbono y el hidrógeno son los elementos más abundantes en la mayoría de las moléculas orgánicas; es común emplear carbono-14 y tritio para el marcado de las mismas. Por otro lado, en la práctica clínica los métodos más comunes para marcar anticuerpos consisten en la radioyodación directa en presencia de agentes como la cloramina T y el

acoplamiento de metales a través de quelatos bifuncionales como el ácido dietilentriamino-pentacético (DTPA) (Hiltunen, 1993).

El yodo-125 es un isótopo radiactivo con una vida media de 60.2 días; en su decaimiento radiactivo emite rayos gama y rayos X de energía comprendida entre los 27 y los 35 keV, por lo que puede ser detectado por cámaras sensibles a ese tipo de radiación. Este isótopo se encuentra disponible comercialmente como radionúclido, en kits para yodación de compuestos (Beekman y col., 2002).

3.3 Estudios farmacocinéticos

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, todas las investigaciones que se realicen en farmacología clínica deberán estar precedidas por estudios preclínicos completos que incluyan características físico-químicas, actividad farmacológica, toxicidad, farmacocinética, absorción, distribución, metabolismo y excreción del medicamento en diferentes especies animales, así como estudios de mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis (Secretaría de Salud, 1984).

Según el Reglamento de Insumos para la Salud vigente en los Estados Unidos Mexicanos, los estudios preclínicos *in vivo* se deben llevar a cabo en animales para demostrar la calidad, seguridad y eficacia de un producto farmacéutico, de forma tal que los resultados de dichos estudios puedan ser extrapolados a los humanos (Secretaría de Salud, 2012)

En el ámbito internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde 1974 cuenta con una guía denominada “Pautas para la Evaluación de los Medicamentos en el Hombre” en la que detalla las consideraciones generales que deben tomarse en cuenta antes y durante los estudios clínicos. De acuerdo con dicho documento, los estudios preclínicos se pueden clasificar como farmacológicos para determinar la farmacodinamia y la farmacocinética así como toxicológicos en donde se determinará la toxicología preclínica, junto con los estudios toxicológicos especiales.

En cuanto a los estudios preclínicos de farmacocinética en animales, la OMS recomienda la administración de una sola dosis por diferentes vías y estudios con dosis repetidas; en ambos casos se determina la concentración del fármaco en fluidos biológicos del animal con la finalidad de evaluar la tasa de absorción, la velocidad y vía de eliminación del organismo, así como la localización en los tejidos. Las técnicas sugeridas incluyen cromatografía, radioinmunología, y cromatografía acoplada a espectrometría de masa. (Organización Mundial de la Salud, 1975).

3.4 Modelos farmacocinéticos

En los estudios farmacocinéticos, se adoptan modelos que describen la distribución de un fármaco en el organismo. En los modelos compartimentales, se considera que existe un compartimento que representa el espacio físico donde reside la sustancia en estudio o el estado químico específico de la misma; en un compartimento, la variable $x(t)$ obedece a la ecuación $\frac{dx}{dt} = -Kx(t) + r(t)$, donde K , que es constante, corresponde a la tasa de eliminación y r es la tasa de ingreso (Vicini y col., 2008).

Bajo esta perspectiva, el organismo puede considerarse como uno o varios compartimentos en los que el fármaco ingresa y se elimina. Las tasas de ingreso y eliminación del fármaco en dichos compartimentos están descritas por ecuaciones diferenciales, generalmente de primer orden.

Si el modelo es monocompartimental, el proceso únicamente estará descrito por una constante de absorción y otra de eliminación. Por otro lado, si el modelo es multicompartimental, además de las constantes de absorción y eliminación, existirán constantes que describan la transferencia del fármaco entre los distintos compartimentos.

Otra forma de analizar la cinética de un fármaco en el organismo es a través de los momentos estadísticos de la concentración plasmática a lo largo del tiempo.

En este modelo, conocido como modelo no compartimental, los parámetros más representativos son el área bajo la curva ($S_0 = \int_0^{\infty} C(t)dt$) y el área bajo la curva del primer momento ($S_1 = \int_0^{\infty} t \cdot C(t)dt$) (Yamaoka y col., 1978).

En la actualidad, el análisis no compartimental es la herramienta de elección cuando se busca obtener información sobre el nivel de exposición a una sustancia y en estudios farmacocinéticos permite estimar parámetros como aclaramiento, vida media de eliminación, concentración máxima, tiempo de la concentración máxima, entre otros (Gabrielsson y Weiner, 2012).

4. Planteamiento del problema

Entre los posibles candidatos para el tratamiento de la inflamación se encuentra la kramecina. Sin embargo, se desconocen los parámetros farmacocinéticos de dicho compuesto y no existen métodos analíticos para su cuantificación en fluidos biológicos.

Por tal motivo, se pretende que la información emanada del presente trabajo sirva como preámbulo para el desarrollo de estudios clínicos de esta molécula prometedora.

5. Hipótesis

La kramecina administrada por vía oral experimenta procesos de distribución, metabolismo y excreción que se manifiestan como un decaimiento en su concentración plasmática, misma que puede ser cuantificada a diferentes tiempos mediante técnicas analíticas.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Determinar los parámetros farmacocinéticos de la kramecina en ratas Wistar mediante la cuantificación de su concentración plasmática a diferentes tiempos.

6.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar y validar un método para la detección de kramecina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.
2. Construir una curva de calibración para cuantificar kramecina mediante el método cromatográfico.
3. Determinar el curso temporal de la concentración de kramecina en plasma de ratas Wistar a diferentes tiempos posteriores a la administración de una dosis oral de 50 mg/kg de dicho compuesto.
4. Estimar la concentración plasmática máxima (C_{max}), el tiempo de la concentración plasmática máxima (T_{max}), área bajo la curva y constante de eliminación de la kramecina en el organismo.

7. Materiales y métodos

7.1 Material biológico

7.1.1 Planta

Las partes aéreas de *Krameria cytisoides* Cav. se recolectaron en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, cuyas coordenadas geográficas son: Latitud 22.61, Longitud 100.46.

La identificación de la planta fue realizada por el taxónomo José García Pérez del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, y un espécimen (SLPM 44560) se guardó en el Herbario Isidro Palacios. El material vegetal fue secado a la sombra y posteriormente molido.

7.1.2 Animales

Se emplearon ratas Wistar macho de 250 a 300 g de peso, ratones machos y hembras cepa CD1 de 25 a 30 g, procedentes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco. Los animales fueron alimentados con dieta estándar (Purina LabDiet 5001) y agua *ad libitum*, mantenidos con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y manipulados según los estándares éticos internacionales para el uso y cuidado de animales de experimentación - International Standards for Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999

7.2 Obtención de Kramecina

En un matraz balón de 12 L, se colocaron 600 g de *Krameria cytisoides*; posteriormente, se añadieron 6 L de hexano y se llevaron a ebullición durante cuatro horas, con la finalidad de remover grasas. El material vegetal desgrasado seco, se introdujo a un matraz balón de 12 L. Se añadieron 6 L de etanol y se llevó a ebullición por cuatro horas. La mitad del etanol se eliminó a presión reducida, se

recuperó un precipitado, se le determinó el punto de descomposición y se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (500 MHz) y de carbono-13 (125.77 MHz) en espectrómetro Bruker Avance DMX500.

7.3 Obtención de plasma

A cuatro ratas wistar machos anestesiadas, con ayuno de 12 horas, se les practicó punción cardíaca, siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. De cada rata se extrajeron 8 mL de sangre con jeringa heparinizada. La sangre fue depositada en tubos de ensayo a temperatura ambiente y centrifugada durante 15 minutos a 3 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se conservó en congelación a -70 °C.

7.4 Cuantificación de kramecina por HPLC

Para la determinación de kramecina por cromatografía de líquidos de alta resolución, se empleó un cromatógrafo Varian ProStar 210 con detector evaporativo de luz dispersa (ELSD) Alltech ELSD 2000, una columna Alltech Econosphere C-18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm a 40 °C y una columna Agilent Hi-Plex H 100 mm x 7.7 mm x 8 µm a 40 °C. Como fase móvil, distintas proporciones de metanol, agua, acetonitrilo y ácido fórmico al 1%.

7.5 Curva de calibración

Se prepararon soluciones metanólicas de 100, 150, 200, 300 y 400 µg/mL a partir de la solución de kramecina de 400 µg/mL.

Para la determinación de la linealidad, se inyectó por triplicado al cromatógrafo de líquidos 50 µL de las soluciones de kramecina en metanol.

Se realizó una regresión lineal del área bajo la curva contra concentración de kramecina, se calculó el coeficiente de correlación para determinar el nivel de linealidad entre ambas variables. Para conocer la precisión se calculó el coeficiente de variación en cada punto.

7.6 Tratamiento de muestras adicionadas con kramecina

A 10 mL de plasma de rata se les adicionó 4 mg de kramecina para obtener una concentración de 400 ppm. Con la finalidad de eliminar lípidos y desnaturalizar proteínas, se adicionó cloroformo 1:1 v/v y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos en centrífuga Eppendorf 5415 R.

De la fase acuosa se tomaron siete muestras de 1 mL y se dializaron con una membrana Spectra/Por de celulosa con MWCO de 6 a 8 kDa durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas, con recambio de agua en el medio dializante a las 2 y a las 8 horas.

Las muestras dializadas fueron liofilizadas, reconstituidas con 1 mL de metanol y filtradas. Posteriormente, se inyectaron al cromatógrafo para cuantificar la kramecina y obtener el porcentaje de recuperación en cada tratamiento.

7.7 Estudio comparativo de métodos de precipitación de proteínas

A cinco muestras de plasma se les adicionó ácido tricloro-acético (ATC) al 5 % w/v, sulfato de zinc ($ZnSO_4$) al 1.5 % w/v, metanol 1:1 v:v, metanol 1:1 v:v + ATC al 5 % w/v o metanol 1:1 v:v + $ZnSO_4$ al 5 %, respectivamente. Las muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf 51415 R).

Se tomaron 200 μ L del sobrenadante de cada muestra, se llevaron a 1 mL con agua destilada y se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante en las proporciones 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320.

Se preparó una solución de $CuSO_4$ al 1% y una solución de Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 M. Para preparar el reactivo de Lowry se mezclaron 49 mL de la solución de Na_2CO_3 con 1 mL de una solución de $CuSO_4$.

Se prepararon cinco suspensiones de 1 mL de albúmina de suero bovino (BSA) con una concentración de 12.5, 25, 50, 75 y 100 μ g/mL, respectivamente, a partir de un estándar de BSA de 1 mg/mL.

A 100 μ L de las muestras, soluciones de BSA y un blanco de agua destilada, se les adicionó 1 mL de reactivo de Lowry, se incubaron por 30 minutos a

temperatura ambiente y se les adicionó 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu Bio-Rad; se incubaron nuevamente por 30 minutos a temperatura ambiente y se tomaron lecturas de absorbancia en espectrofotómetro Shimadzu 1200 a 540 nm.

Se elaboró una curva de calibración con las absorbancias correspondientes a las soluciones de BSA y, por interpolación, se determinó la concentración de proteínas presentes en cada muestra.

7.8 Determinación de unión a proteínas por electroforesis

Se tomaron tres alícuotas de 1 mL de BSA (1 mg/mL) y se les adicionó 25, 125 y 250 μL de una suspensión de 300 ppm de kramecina en agua, respectivamente, para obtener las relaciones molares kramecina:albúmina de 10:1, 50:1 y 100:1. Las muestras se incubaron por 24 horas en refrigeración ($T \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Se preparó un gel para separación de proteínas con 10 % de acrilamida/bisacrilamida en el gel separador y 2.5 % de acrilamida/bisacrilamida en gel concentrador (Anexo 1).

Se tomaron 5 μL de cada muestra y de una referencia de BSA 1 mg/mL, se les adicionó 10 μL de buffer de carga (Anexo 1), se colocaron en el gel y se llevó a cabo la electroforesis por 40 minutos con una diferencia de potencial de 190 V, en buffer de corrida. El buffer se preparó con una dilución 1:5 de buffer de corrida 5X (Anexo 1)

El gel fue teñido con Azul de Coomasie por 30 minutos y desteñido con una solución de metanol/ácido acético/agua 4/1/5 v/v/v por 15 minutos. Se comparó la migración de la albúmina en el estándar de BSA y en las tres muestras.

7.9 Marcaje de kramecina con yodo-125

El radio-marcaje de la kramecina se llevó a cabo por el método de yodación con cloramina T y yoduro de sodio de Greenwood y Hunter modificado (Greenwood y Hunter, 1963).

7.9.1 Yodación de la kramecina

A una alícuota de 50 μL de una disolución de yoduro $[\text{I-125}]$ de sodio en metanol:agua 50:50 (v/v) equivalente a 2 mCi, se le añadieron 20 μL de una solución de kramecina de 1 mg/mL en metanol:agua 50:50 (v/v) y 15 μL de una solución de 10 mg/mL de cloramina T, posteriormente la mezcla se agitó a temperatura ambiente por un minuto. Después, se adicionaron 50 μL de una solución de 30 mg/mL de metabisulfito de sodio.

7.9.2 Purificación de la kramecina radiomarcada (KACY-I)

Se purificó la KACY-I por cromatografía de exclusión molecular en columna empleando Sephadex LH-20 dispersa en medio hidroalcohólico (Metanol-Agua 1:1) y metanol absoluto como eluyente. Las fracciones fueron leídas en Contador de Centelleo LS6500 Beckman Coulter. A partir de las cuentas por minuto (CPM) y el tiempo de elución de cada fracción se construyó un cromatograma. Las fracciones correspondientes al primer pico fueron reunidas y reducidas a 10 mL para obtener una concentración de KACY-I de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.9.2.1 Cuantificación de KACY-I en contador de centelleo

De la solución de KACY-I de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se tomaron alícuotas correspondientes a 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 ng de KACY-I. Se depositaron en tubos de ensayo de boro-silicato de 14 x 75 mm y se registró el número de cuentas por minuto (CPM) en Contador de Centelleo LS6500 Beckman Coulter. Se realizó una curva de calibración de CPM vs. ng de KACY-I y se determinó la linealidad de la curva.

7.9.3 Prueba preliminar de cuantificación en muestras biológicas

Con ayuda de una cánula, se administraron por vía oral 100 μ L de una solución de 1 μ g/mL de KACY-I a un ratón macho CD1 de 30 g. Una hora después de la administración, se sacrificó el animal por dislocación cervical, se practicó punción cardíaca, se diseccionó y se tomaron muestras de hígado y riñón. Las muestras biológicas fueron pesadas y se determinó la cantidad de cuentas radiactivas de cada una de ellas.

7.9.3.1 Tratamiento de las muestras biológicas

Inmediatamente después de sacrificar al animal, se recuperó por punción cardíaca un volumen de 500 μ L de sangre. El animal fue diseccionado y se recuperó hígado, riñón y cerebro. Cada órgano fue enjuagado con solución salina y pesado. Todas las muestras fueron depositadas en tubos de ensayo de borosilicato de 75 x 14 mm y conservadas en refrigeración (2 $^{\circ}$ C – 4 $^{\circ}$ C).

7.9.3.2 Registro de las cuentas radiactivas

Las cuentas radiactivas emitidas por las muestras fueron registradas en el Contador de Centelleo LS6500 Beckman Coulter. Por interpolación en la curva descrita en 7.9.2.1, se determinó la cantidad de KACY-I presente en cada muestra. La cantidad de KACY-I determinada fue dividida entre la masa registrada del órgano en cuestión y reportada como nanogramos de KACY-I sobre miligramo de tejido.

7.10 Estudio de la cinética y biodistribución de la kramecina radiomarcada

Con ayuda de una cánula, se administraron por vía oral, alícuotas de 100 μ L de KACY-I (100 μ Ci/mL) a ocho lotes de tres ratones machos CD1 y tres hembras CD1 cada uno. Se sacrificó un lote a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas.

Las muestras fueron procesadas según 7.9.3.1 y 7.9.3.2. Los datos plasmáticos fueron tratados con WinNonlin 4.1, utilizando los modelos compilados: monocompartimental, bicompartimental y no compartimental.

8. Resultados y discusión

La kramecina obtenida de *Krameria cytisooides* con un rendimiento del 2.8 %, mostró un punto de descomposición de 172 °C; el punto de descomposición y los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono 13 concuerdan con lo reportado en la literatura (Pérez-Gutiérrez y col., 2012).

Debido a su estructura química, la kramecina presenta elevada polaridad y es soluble en metanol, etanol y mezclas hidroalcohólicas. Los compuestos orgánicos con grupos funcionales polares frecuentemente son analizados mediante cromatografía en fase reversa, tal es el caso de muchos metabolitos vegetales, incluyendo carbohidratos y glicoproteínas (Waksmundzka Hajnos y Sherma, 2011).

Dado que las soluciones de kramecina presentan una coloración amarilla, se planteó la posibilidad de analizar dicho compuesto por cromatografía de líquidos de alta resolución empleando un detector UV-Vis. Sin embargo el compuesto carece de grupos cromóforos y al hacer las pruebas preliminares se encontró que el compuesto no absorbe en la región ultravioleta ni en la región visible.

Por esta razón, para su detección es preciso emplear otro tipo de detectores como el espectrómetro de masas (MS), detector de aerosol cargado (CAD), detector evaporativo de luz dispersa (ELSD), detector de luz dispersa de núcleos condensados (CNLSD), entre otros.

Ante la imposibilidad de cuantificar dicha molécula con detector UV, se decidió emplear un detector ELSD. Se buscaron las condiciones cromatográficas que permitieran la obtención de señales bien definidas con tiempos de retención pequeños y los mejores resultados se obtuvieron con Metanol:Agua 40:60.

8.1 Cuantificación de Kramecina por HPLC fase reversa

La kramecina disuelta en metanol por cromatografía, empleando una columna Econosphere C-18 5 μm , 250 x 4.6 mm y Metanol:Agua 40:60 como fase móvil, es cuantificable. La respuesta es lineal ($R^2 = 0.9998$) en el intervalo de 100 ppm a 300 ppm (Figura 3). Los coeficientes de variación para los cuatro puntos evaluados son de 2.02 %, 0.87 %, 1.30 % y 1.54 %, respectivamente.

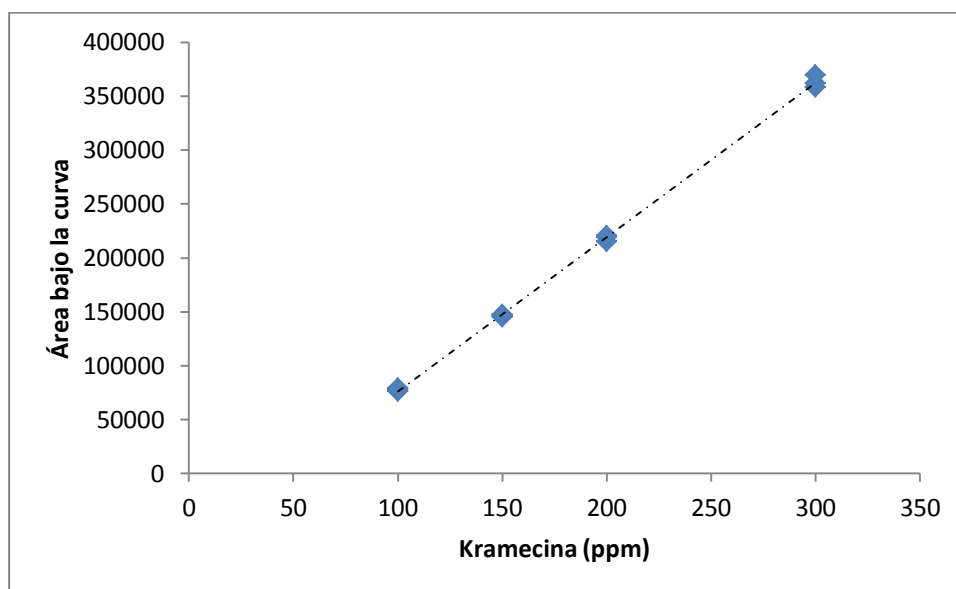


Figura 3. Curva de calibración para la determinación de kramecina por HPLC con ELSD

Estos resultados indican que hay linealidad y precisión en el sistema, por lo que se procedió a tratar el plasma de rata para adicionarlo con kramecina y llevar a cabo su determinación.

8.2 Precipitación de proteínas

El plasma es una matriz compleja, rica en lípidos, proteínas, glucosa y electrolitos; algunos de estos componentes pueden interferir con el análisis de la sustancia de interés o, incluso, causar daños al sistema cromatográfico, por lo que se decidió someterlo a un tratamiento que permita la eliminación de dichos constituyentes.

Para elegir el método óptimo para la eliminación de proteínas del plasma, se decidió evaluar la eficiencia de diferentes tratamientos de precipitación. Para ello, se cuantificaron por el método de Lowry las proteínas presentes en las muestras tratadas. La curva de calibración para cuantificación de proteínas mostró una respuesta lineal ($R^2 = 0.9826$) en el intervalo de 12.5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

Al comparar la concentración de proteínas en muestras tratadas con ácido tricloroacético (ATC) al 5 %, sulfato de zinc (ZnSO_4) al 1.5%, metanol (MeOH) 1:1 v:v y tratamiento seriado con MeOH + ATC o MeOH + ZnSO_4 , se encontró que la técnica más eficiente es la adición de ATC al 5 % w/v (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración de proteínas en los sobrenadantes de las muestras sometidas a distintos tratamientos de precipitación de proteínas

Tratamiento	Proteínas
ATC	0.25 mg/mL
ZnSO₄	8.21 mg/mL
MeOH	1.53 mg/mL
MeOH + ATC	1.44 mg/mL
MeOH + ZnSO₄	8.99 mg/mL

Sin embargo, se observó que la kramicina se descomponía cuando se ponía en contacto con el ATC y se decidió eliminar componentes liposolubles del plasma por extracción con cloroformo y desnaturalizar proteínas hidrosolubles por adición de metanol.

8.3 Efecto matriz

Al inyectar al cromatógrafo una muestra de plasma tratado con cloroformo y metanol, en el cromatograma se observó una señal muy intensa con un tiempo de retención de 6 minutos. Dado que dicha señal interfiere con la cuantificación de la kramecina en las condiciones cromatográficas evaluadas, se decidió modificar la composición de la fase móvil, empleando distintas proporciones de metanol, acetonitrilo, agua y ácido fórmico al 1 %. Sin embargo, con ninguna de las proporciones evaluadas se logró una resolución aceptable.

El plasma es rico en glucosa y ésta tiene una alta polaridad, motivo por el cual se planteó que la señal observada en la muestra de plasma podría corresponder a dicho compuesto.

Con la finalidad de eliminar glucosa, sales y otras posibles interferencias de bajo peso molecular, se propuso adicionar kramecina a las muestras de plasma, tratarlas con cloroformo, dializar las muestras tratadas y liofilizar el dializado.

Cuando se inyectaron al cromatógrafo muestras reconstituidas en metanol de plasma tratado, dializado durante diferentes intervalos de tiempo, el cromatograma mostró una señal de elevada intensidad cuya área bajo la curva era inversamente proporcional al tiempo de diálisis. En las muestras correspondientes a las primeras cuatro horas, la señal se traslapaba de manera importante con la de la kramecina, por lo que no fue posible su cuantificación. En cambio, en las muestras cuyos tiempos de diálisis fueron 5, 6 y 24 horas, la kramecina fue cuantificable, sin embargo el porcentaje de recuperación fue bajo. Esto sugiere que la kramecina difunde de manera importante a través de la membrana de diálisis.

Por otro lado, existen otros factores que pueden influir en el porcentaje de recuperación, uno de ellos es la pérdida de kramecina durante la precipitación de las proteínas. Si la kramecina se uniera a proteínas, existe la posibilidad que ésta permaneciera unida a las proteínas precipitadas y se eliminara junto con ellas en el tratamiento de las muestras plasmáticas.

8.4 Determinación de unión a proteínas

La albúmina es la proteína más abundante en el suero y posee una capacidad de unión extraordinaria para sustancias endógenas y exógenas, incluyendo una gran cantidad de fármacos (Zsila y col., 2011); por esta razón, si hubiera alguna interacción entre la kramecina y las proteínas plasmáticas, existe una alta probabilidad de que dicha interacción tuviera lugar entre la kramecina y la albúmina. Además, la estructura de la albúmina sérica es muy similar entre las especies animales (Nygren y col., 1990), por lo que de existir interacciones entre kramecina y albúmina de suero bovino (BSA), éstas tendrían lugar con albúmina de diferentes especies.

En la electroforesis realizada a las suspensiones de BSA y BSA adicionado con kramecina, se encontró que tanto el estándar de BSA puro como las muestras adicionadas con kramecina tuvieron la misma migración, lo que indica que la kramecina no se une a la albúmina.

En vista de que la kramecina no se une a la albúmina y es poco probable que existan pérdidas durante la precipitación de proteínas, el bajo porcentaje de recuperación se puede atribuir a la difusión de la molécula a través de la membrana de diálisis y, por lo tanto, es necesario explorar otras opciones para evitar que la glucosa interfiera con su cuantificación.

8.5 HPLC de intercambio iónico para carbohidratos

Con la intención de resolver la glucosa y la kramecina, se decidió trabajar con una columna para carbohidratos Hi-Plex H. Dicha columna emplea como fase móvil agua, ácidos diluidos o soluciones acuosas diluidas de metanol (< 5%) o acetonitrilo (< 30%); por tal motivo, se eligió una fase móvil constituida por agua en su totalidad.

La columna Hi-Plex H es una columna de intercambio iónico para HPLC empleada predominantemente en el análisis de carbohidratos y ácidos orgánicos (Ball y

Lloyd, 2011). El hecho de que la kramecina tiene grupos hidroxilo libres sugiere que esta molécula puede ser analizada por HPLC empleando dicha columna.

Sin embargo, al inyectar una muestra de plasma tratado adicionada con 200 ppm de kramecina, hubo un incremento importante en la presión. Esto indica que la muestra precipita en la columna y que el método cromatográfico es inadecuado para la cuantificación de kramecina en plasma.

8.6 Marcaje con yodo-125

En vista de que la kramecina no pudo cuantificarse en fluidos biológicos por los métodos cromatográficos propuestos, se decidió hacerla reaccionar con yodo-125 y cuantificarla por medio del número de cuentas radiactivas registradas en un contador de centelleo.

Al construir la curva de calibración de número de cuentas por minuto (CPM) contra nanogramos de kramecina marcada con yodo-125 (KACY-I), se observó una relación lineal un intervalo de 0.5 a 100 ng ($R^2=0.9988$). El límite de detección estimado fue de 0.019 ng y el límite de cuantificación, de 0.065 ng; lo que indica que KACY-I es cuantificable (Figura 4).

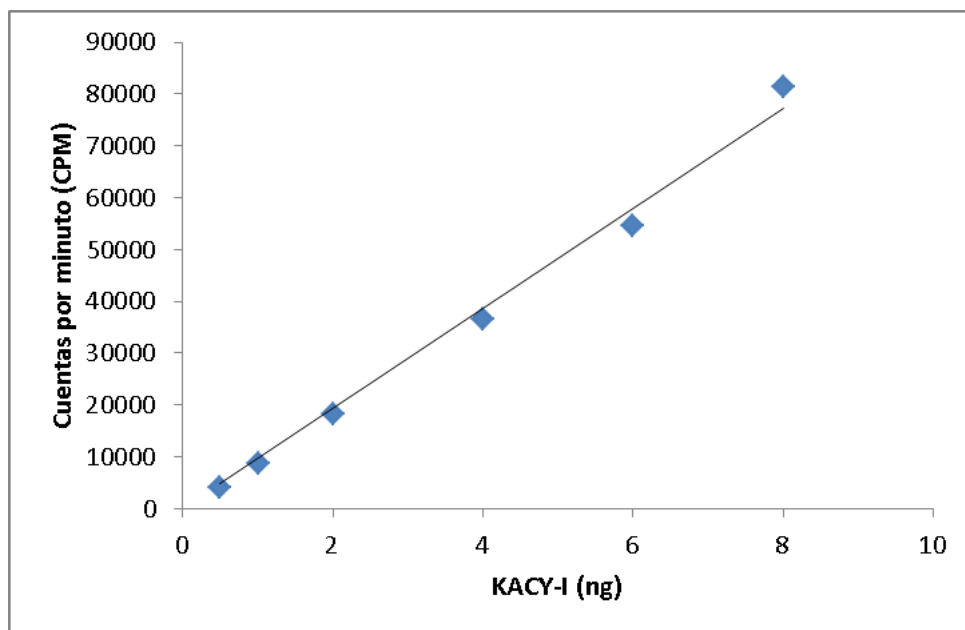


Figura 4. Curva de calibración de cuentas por minuto contra concentración de KACY-I en nanogramos

En un experimento preliminar, al administrar a un ratón macho CD1 100 ng de KACY-I correspondientes a 10 μCi , sacrificarlo una hora posterior a la administración y extraer muestras de sangre, hígado y riñón, se encontró que todas las muestras poseían actividad radiactiva cuantificable mediante un contador de centelleo. Esto indica que la KACY-I administrada por vía oral es absorbida y distribuida a distintos tejidos, por lo que se puede cuantificar su curso temporal en el organismo.

8.7 Estudio farmacocinético de KACY-I

Por cuestiones éticas se decidió emplear una dosis de radiación mínima, dado que en el estudio preliminar se encontró que una dosis oral de 10 μCi era suficiente para la cuantificación del compuesto en fluidos biológicos, se decidió administrar 100 ng de KACY-I equivalentes a 10 μCi . Con la administración de 100 ng de KACY-I por vía oral a ratones CD1, se encontró que ésta alcanza circulación sistémica y se distribuye en el organismo. En machos y hembras, la concentración

máxima en hígado se alcanza alrededor de la primera hora, mientras que la concentración máxima en riñón se encuentra alrededor de los treinta minutos.

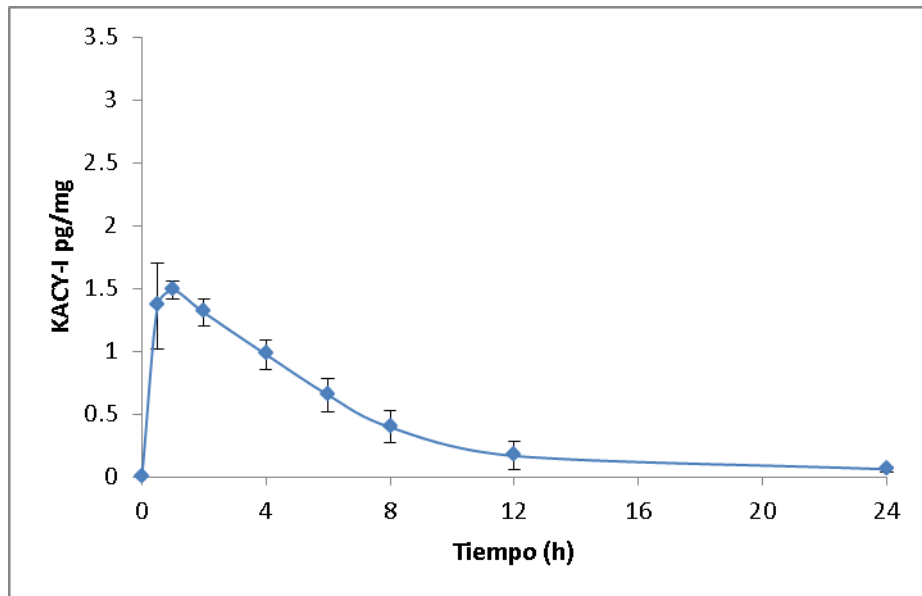


Figura 5. Concentración de KACY-I (pg/mg de tejido) contra tiempo en hígado de ratones CD1 machos

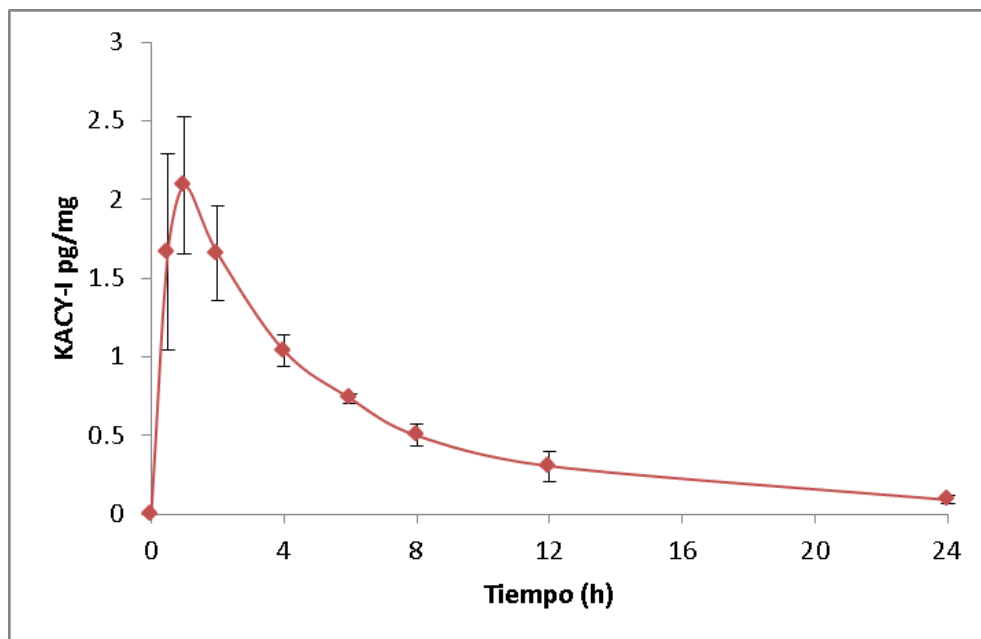


Figura 6. Concentración de KACY-I (pg/mg de tejido) contra tiempo en hígado de ratones CD1 hembras

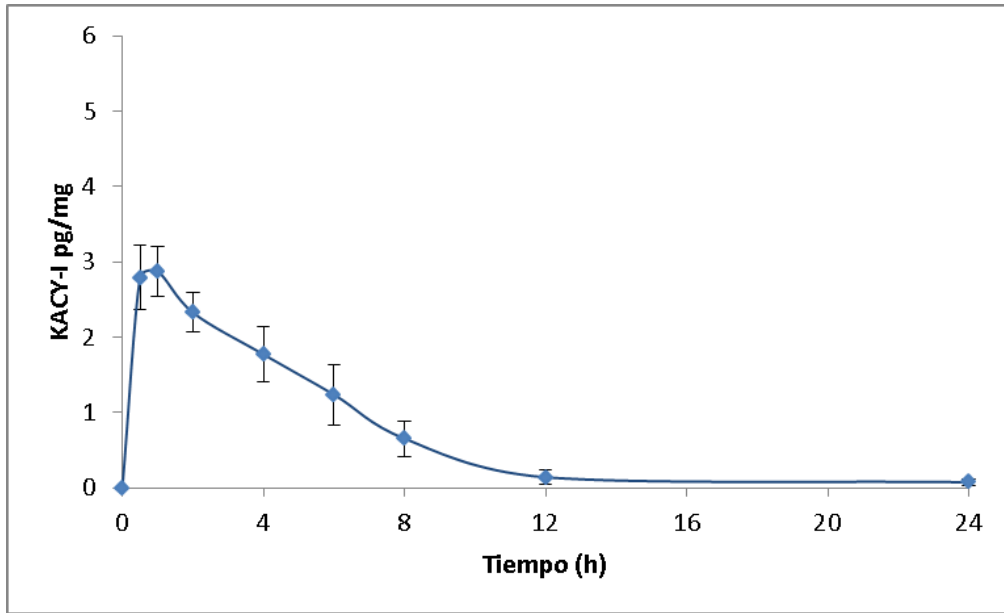


Figura 7. Concentración de KACY-I (pg/mg de tejido) contra tiempo en riñón de ratones CD1 machos.

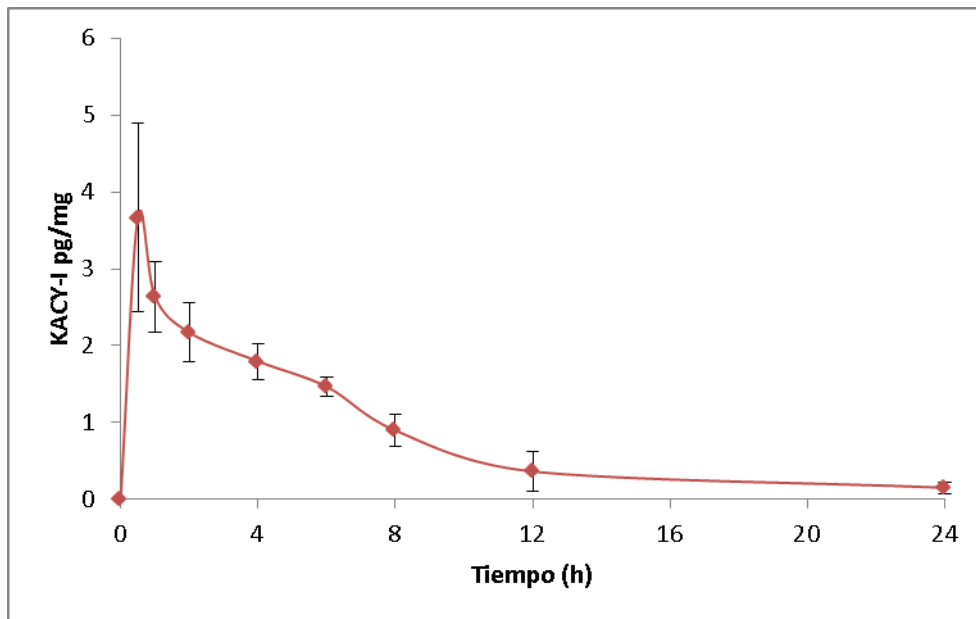


Figura 8. Concentración de KACY-I (pg/mg de tejido) contra tiempo en riñón de tres lotes de ratones CD1 hembras.

En tejido cerebral no se encontró KACY-I, lo que indica que dicho compuesto no atraviesa la barrera hematoencefálica.

Con las concentraciones plasmáticas de KACY-I obtenidas a los diferentes tiempos, fue posible construir la curva del curso temporal de KACY-I para machos y hembras, respectivamente (Figura 9). Al introducir los datos plasmáticos a WinNonlin, se encontró que el modelo más apropiado era el no compartimental. En dichas curvas la concentración plasmática máxima se encuentra a la hora posterior a la administración en hembras y a las 2 horas posteriores a la administración en machos, lo que sugiere que la absorción de la kramicina cuando ésta es administrada por vía oral es más lenta en machos que en hembras.

Si bien es cierto que la variación en la tasa de absorción de fármacos es más notoria entre grupos etarios que entre grupos de distinto sexo (O'Malley y col., 1971), se ha reportado que, además de KACY-I, existen otros compuestos cuya absorción es mayor en determinado género. Por ejemplo, el antihistamínico mizolastino administrado vía oral se absorbe más lentamente en pacientes de sexo masculino (Soldin y col., 2011); Sin embargo, en la mayoría de los casos, las diferencias entre el tiempo y la tasa de absorción de fármacos entre individuos de distintos géneros carecen de relevancia clínica (Beierle y col., 1999).

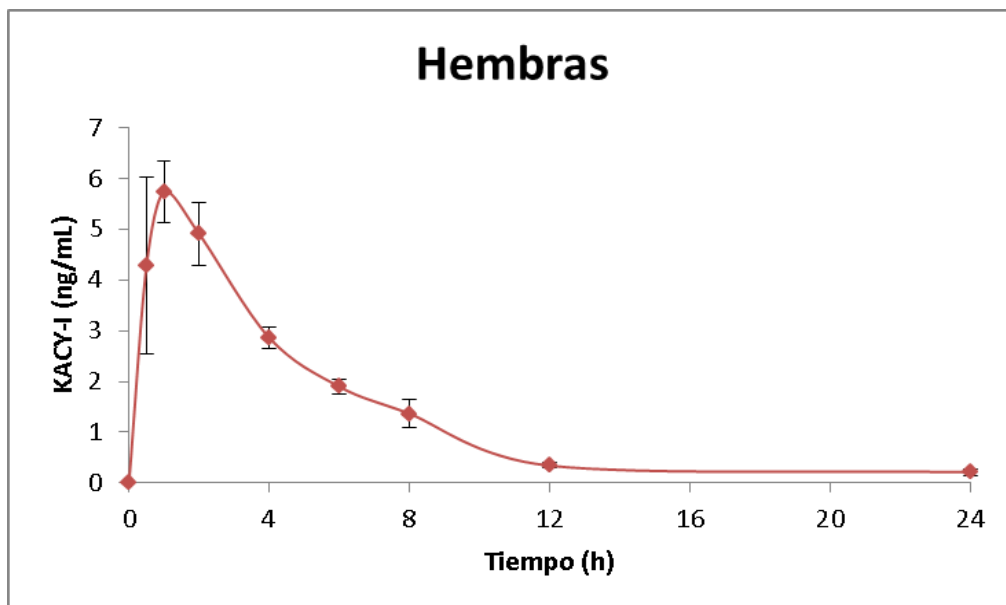
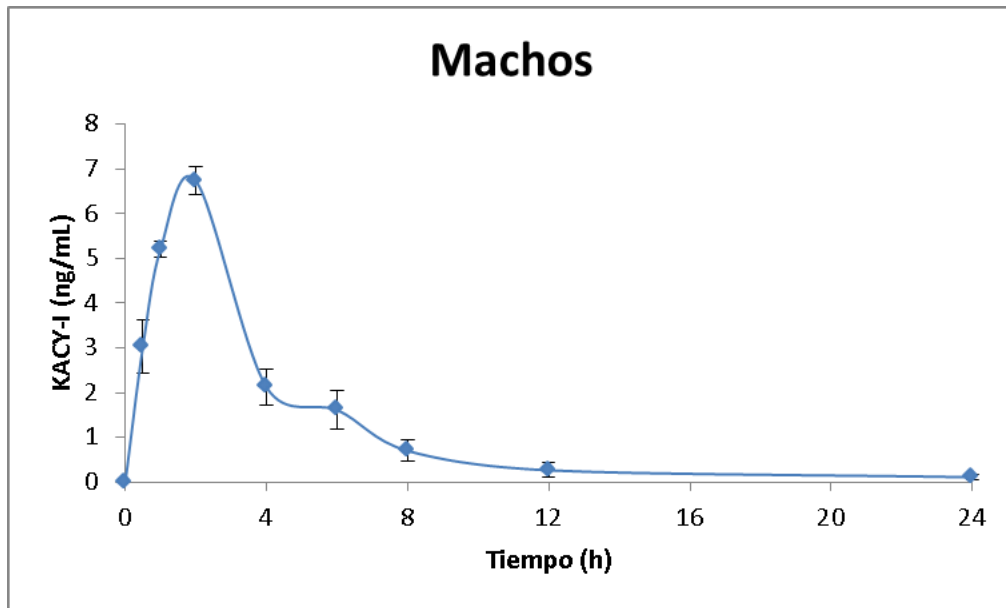


Figura 9. Curvas del curso temporal de KACY-I en plasma para lotes de ratones machos y hembras.

En el modelo monocompartimental, se asumió que el fármaco ingresa a un compartimiento central y se elimina en función del tiempo obedeciendo a la ecuación:

$$C_p = \frac{D}{V} \frac{K_{10}}{K_{01} - K_{10}} (e^{-K_{10}t} - e^{-K_{01}t})$$

Donde C_p es la concentración plasmática, D es la cantidad de fármaco administrada, V es el volumen de distribución aparente, K_{01} es la constante de absorción y K_{10} la constante de eliminación. La razón $\frac{D}{V}$ es calculada mediante el método de los residuales y corresponde al intercepto en el eje “y” obtenido por extrapolación de la función de los datos de eliminación (Baggot, 1978). Sin embargo, el modelo abierto de un compartimento no representa adecuadamente las características de distribución de la mayoría de los fármacos (Saavedra-López y col., 2013); en el caso de la kramecina, algunos de los datos plasmáticos no pudieron ser procesados por WinNonlin para este modelo.

El modelo bicompartimental, por otra parte, supone que el fármaco ingresa a un compartimento central, difunde hacia un compartimento periférico y regresa al compartimento central para ser eliminado. El modelo supone eliminación de primer orden y obedece a una ecuación exponencial $C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-K_a t}$, donde A , B , α y β son las constantes que describen la eliminación del fármaco del compartimento central, mientras que C y K_a son las constantes que describen el proceso de absorción (Bertrand y Mentré, 2008). Sin embargo, los datos plasmáticos obtenidos no pudieron procesarse con el modelo bi-compartimental de WinNonlin, por lo que fue imposible determinar el perfil farmacocinético basado en dicho modelo.

Por otro lado, el curso temporal de un fármaco puede analizarse en función de momentos estadísticos como el área bajo la curva y el área bajo el momento de la curva (Yamaoka y col., 1978). El modelo no compartimental, como se denomina al modelo matemático que, basado en momentos estadísticos, describe la concentración plasmática a lo largo del tiempo o la tasa de excreción urinaria de un fármaco tras la administración de una dosis única, permite estimar parámetros de interés como la tasa de eliminación del fármaco en términos de área bajo la curva (Gabrielsson y Weiner, 2012).

Desde esta perspectiva, se pudo integrar el área bajo la curva (AUC_{0-24}) de cada uno de los seis perfiles de C_p vs. t , y estimar el área bajo la curva de cero a infinito ($AUC_{0-\infty}$), para cada uno de ellos con la finalidad de determinar la cantidad de kramecina que cursó por el organismo en las primeras 24 horas posteriores a la administración y estimar la cantidad total de la molécula que ingresó a circulación.

Además, a partir de las curvas de C_p vs. t construidas con los datos plasmáticos, se pudieron calcular valores estimados de concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo correspondiente a C_{max} (t_{max}), concentración plasmática a las 24 horas (C_{24}) y áreas bajo la curva de cero a 24 horas y de cero a infinito (AUC_{0-24} y $AUC_{0-\infty}$), mismos que se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros farmacocinéticos de KACY-I en ratones CD1 tras la administración de una monodosis de 100 ng de KACY-I

Parámetro	Machos (IC 95 %)	Hembras (IC 95 %)
^a C_{max} (ng/mL)	6.72 (6.21, 7.24)	5.99 (4.67, 7.31)
^b t_{max} (h)	2	1
^a C_{24} (ng/mL)	0.11 (0.03, 0.20)	0.13 (-0.05, 0.31)
^a AUC_{0-24} (ng h/mL)	29.41 (26.33, 32.49)	32.01 (25.08, 38.94)
^a $AUC_{0-\infty}$ (ng h/mL)	30.39 (26.39, 34.39)	33.78 (25.62, 41.94)

^aMedia aritmética ^bMediana

A partir de las rectas de mejor ajuste del logaritmo de concentración plasmática ($\ln C_p$) contra tiempo, obtenidas por regresión lineal de la fase terminal de cada uno de los seis perfiles en el programa WinNonlin se pudieron estimar las constantes de eliminación (λ_z).

Las medias aritméticas de las constantes de eliminación fueron de 0.16 h^{-1} (0.09, 0.24) para machos y de 0.22 h^{-1} (0.12, 0.32) para hembras. Se estima que la vida media de KACY-I para machos y hembras es de 4.98 h (2.53, 7.44) y 3.91 h (1.58, 6.23), respectivamente.

En cuanto al tiempo de residencia medio (MRT), que indica el tiempo que, en promedio, permanece cada molécula del fármaco en el organismo y se calcula como la razón entre el área bajo el primer momento de la curva $\int_0^{\infty} t \cdot C(t)dt$ y el área bajo la curva $\int_0^{\infty} C(t)dt$, se estimó que cada molécula de KACY-I permanecía, en promedio, 5.19 h (3.11, 8.68) en los machos y 5.04 h (2.17, 11.69) en las hembras.

Según el perfil farmacocinético, la kramecina se absorbe rápidamente; sin embargo, se cree que su biodisponibilidad es pobre, pues el volumen de distribución estimado fue de 23.00 mL (13.10, 32.90) para machos y de 20.97 mL (15.29, 26.64) para hembras, siendo que el volumen de sangre circulante del ratón oscila entre los 78 y 80 mL/kg (Universidad de Zaragoza, 2014), por lo que en un ratón de 30 g, éste será de 2.3 a 2.4 mL. Cabe mencionar que para determinar la concentración plasmática de KACY-I en plasma, se realizó la cuantificación total del compuesto en plasma y que la kramecina no mostró unión a la albúmina sérica.

En comparación con la indometacina, fármaco empleado como control positivo en estudios de inhibición de la inflamación en los modelos de edema plantar y auricular en roedores, la exposición total del organismo a la kramecina en ratón es menor a la de la indometacina en rata. Se ha reportado que, tras la administración oral de 1 mg/kg de indometacina en ratas, se alcanza una concentración plasmática máxima de 3.84 $\mu\text{g/mL}$ a la primera hora posterior a la administración; el tiempo medio de residencia es de 7.74 horas y el área bajo la curva es de 31.38 $\mu\text{g h/mL}$ (Li y col., 2008). La relación entre el área bajo la curva de la kramecina (Cuadro 2) y la dosis administrada (100 ng, equivalentes a 3.4 $\mu\text{g/kg}$), es tres veces menor al cociente AUC/Dosis de la indometacina en rata según dicho estudio. Sin embargo, cabe mencionar que en ese estudio se estimó, para la indometacina una vida media de 8.16 horas, mientras que en otro estudio se reporta que la vida media de la indometacina es de 4.6 ± 1 h (Paine y col., 2008).

Los parámetros farmacocinéticos estimados de las muestras plasmáticas sugieren que no existen diferencias significativas en la eliminación de KACY-I entre machos y hembras; sin embargo, el estudio posee bajo poder estadístico debido al reducido tamaño de muestra y a la elevada dispersión de los datos. Dicha dispersión se atribuye a que las curvas del curso temporal de KACY-I en plasma fueron construidas a partir de concentraciones plasmáticas procedentes de diferentes animales.

Estudios previos muestran que cuando se emplean muestras de distintos animales y se procesa una sola muestra de cada animal para la cuantificación del curso temporal de un analito, la información es imprecisa y puede presentar sesgos; por ello es recomendable tomar, cuando menos, dos muestras de cada animal (Ette y col., 1995). Sin embargo, en ocasiones es imposible obtener múltiples muestras de cada animal, por ejemplo cuando el método analítico requiere un volumen elevado de sangre (Henri y col., 2009).

En el caso del presente trabajo, la metodología empleada para estimar los parámetros farmacocinéticos de KACY-I imposibilita construir una curva de concentración plasmática vs. tiempo a partir de un mismo animal, dado que el estudio de biodistribución exige diseccionar los animales. Además, para poder cuantificar KACY-I en plasma, es necesario contar con un volumen elevado de sangre; sobre todo en las muestras posteriores a las 6 horas, pues si el volumen de la muestra es pequeño se corre el riesgo de que la cantidad de KACY-I en la muestra sea tan pequeña que las cuentas radiactivas que emita se encuentren por debajo del límite de cuantificación.

Aunado a esto, la variabilidad interindividual representa un factor importante en el tiempo de vida media o de residencia media del fármaco en el organismo. Sin embargo, el impacto que tiene la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos estimados en la salud de la población depende del fármaco o xenobiótico que se esté estudiando. Dicha variabilidad es de singular importancia en estudios encaminados a determinar factores de riesgo, estudios toxicológicos o estudios en

los que se desea conocer la exposición global de una población a determinada sustancia.

En el caso de la kramicina, se espera que el haber encontrado intervalos de confianza amplios para los parámetros farmacocinéticos sea poco relevante clínicamente, pues el compuesto carece de toxicidad aguda a dosis de hasta 5 g/kg y es común encontrar variabilidad interindividual elevada para la respuesta a anti-inflamatorios no esteroideos (Day y Brooks, 1987). Por ejemplo, la vida media reportada del naproxeno es de 24.7 ± 6.4 h y en un estudio se reportó que el valor de dicho parámetro oscila entre las 7 y las 36 horas entre los participantes del estudio (Vree y col., 1993).

Por estas razones, la información presentada en este trabajo representa un estudio preliminar. Sin embargo, hace falta enriquecer esta información mediante estudios farmacológicos cuyo tamaño de muestra sea más grande y que cuenten con un mayor número de puntos de muestreo.

9. Conclusiones

La kramecina puede identificarse y cuantificarse por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) fase reversa, en soluciones metanólicas en un intervalo de 100 a 300 µg/mL.

No fue posible desarrollar un método de preparación de muestras que permitiera la cuantificación de kramecina en fluidos biológicos por HPLC.

La kramecina puede halogenarse con yodo-125 en presencia de cloramina T.

La kramecina yodada (KACY-I) se distribuye en el organismo y emite radiación gamma por lo que puede ser cuantificada con un contador de centelleo. KACY-I es cuantificable en riñón, hígado y plasma. No atraviesa la barrera hematoencefálica.

10. Referencias

- Achenbach, H., Grob, J., Dominguez, X., Cano, G., Verde, S. y Brussolo, L. (1987). Lignans, neolignans, and norneolignans from *Krameria cistoides*. *Phytochemistry*, 1159-1166.
- Acton, A. (2013). *Inflammation Mediators - Advances in Research and Application*. Atlanta, GA: Scholarly Editions.
- Bacchieri, A. y Della Cioppa, G. (2007). *Fundamentals of Clinical Research: Bridging Medicine, Statistics and Operations*. Milano: Springer-Verlag.
- Baggot, J. (1978). Some aspects of clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. I. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 5-18.
- Ball, S. y Lloyd, L. (30 de Junio de 2011). *Agilent Hi-Plex Columns for Carbohydrates, Alcohols, and Acids*. Obtenido de Application note, Agilent Technologies, Inc.: Obtenido de <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990--8264EN.pdf>
- Beekman, F., McElroy, D., Berger, F., Gambhir, S., Hoffman, E. y Cherry, S. (2002). Towards in vivo nuclear microscopy: iodine-125 imaging in mice using micro-pinholes. *European Journal of Nuclear Medicine*, 933 - 938.
- Beierle, I., Meibohm, B. y Derendorf, H. (1999). Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 529-547.
- Bertrand, J. y Mentré, F. (09 de 2008). *Mathematical Expressions of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Models implemented in the Monolix software*. Obtenido de <http://www.lixoft.eu/wp-content/resources/docs/PKPDlibrary.pdf>
- Brooks, P. y Day, R. (1991). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs - Differences and Similarities. *New England Journal of Medicine*, 1716-1725.
- Day, R. y Brooks, P. (1987). Variations in response to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 655-658.
- Dubois, R., Abramson, S., Crofford, L., Gupta, R., Simon, L. y Van de Putte, L. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, 12(12), 1063-1073.
- Estrada Lugo, E. (1994). *Plantas Medicinales de México*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Ette, E., Kelman, A., Howie, C. y Whiting, B. (1995). Analysis of animal pharmacokinetic data: Performance of the one point per animal design. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 551-566.

- European Medicines Agency. (1998). *ICH Topic E 8, General Considerations for Clinical Trials*. London, UK: EMEA.
- European Medicines Agency. (2009). *ICH Topic M 2 (R2) Non-clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals*. London, UK: EMEA.
- Gabrielsson, J. y Weiner, D. (2012). Non-compartmental analysis. *Computational Toxicology, Methods in Molecular Biology*, 377-389.
- Greenwood, F. y Hunter, W. (1963). The preparation of ¹³¹I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochemical Journal*, 114-124.
- Henri, J., Burel, C., Sanders, P. y Lawrentie, M. (2009). Bioavailability, distribution and depletion of monesin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 451-456.
- Hiltunen, J. (1993). Search for new and improved radiolabeling methods for monoclonal antibodies. A review of different methods. *Acta Oncologica*, 831 - 839.
- Innvista. (2011). *Rhatany*. Obtenido de <http://www.innvista.com/health/herbs/rhatany.htm>
- Isin, E., Elmore, C., Nilsson, G., Thompson, R. y Weidolf, L. (2012). Use of Radiolabeled Compounds in Drug Metabolism and Pharmacokinetic Studies. *Chemical Research in Toxicology*, 532 - 542.
- Kaushal K., C. y Srivastava, B. (2010). A process of method development: A chromatographic approach. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(2), 519-545.
- Li, T., Fang, L., Ren, C., Wang, M. y Zhao, L. (2008). Determination of transdermally and orally applied indomethacin in rat plasma and excised skin and muscle samples. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 269-275.
- Martínez, M. (1994). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México, D.F.: Fondo de cultura económica.
- Martínez, M. (1995). *Las plantas medicinales de México*. México, D.F.: Ediciones Botas.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 846-852.
- NIH. (1996). Guide for Care and Use of Laboratory Animals. *NAP*, 21-25, 65-66.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.
- Nygren, P., Ljungquist, C., Tromborg, H., Nustad, K. y Uhlén, M. (1990). Species-dependent binding of serum albumins to the streptococcal receptor protein G. *European Journal of Biochemistry*, 143-148.

- O'Malley, K., Crooks, J., Duke, E. y Stevenson, I. (1971). Effect of Age and Sex on Human Drug Metabolism. *Brittish Medical Journal*, 607-609.
- Organización Mundial de la Salud. (1975). *Pautas para la evaluación de los medicamentos destinados al hombre*. Ginebra.
- Paine, S., Parker, A., Gardiner, P., Webborn, P. y Riley, R. (2008). Prediction of the Pharmacokinetics of Atorvastatin, Cerivastatin and Indomethacin Using Kinetic Models Applied to Isolated Rat Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 1365-1374.
- Pandley, M., Debnath, M., Gupta, S. y Chikara, S. (2011). Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3(1), 113-117.
- Penner, N., Xu, L. y Prakash, C. (2012). Radiolabeled Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Studies in Drug Development: Why, When and How? *Chemical Research in Toxicology*, 513 - 531.
- Pérez-Gutiérrez, S., Sánchez-Mendoza, E., Martínez-González, D., Zavala-Sánchez, M. y Pérez-González, C. (2012). Kramecyne - A New Anti-inflammatory Compound Isolated from *Krameria cytisoides*. *Molecules*, 17, 2049-2057.
- Rates, S. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 603-613.
- Saavedra-López, D., Armentero-Moreno, Y., y Morales-Tabares, Z. (2013). Aplicación Web para la realización de estudios farmacocinéticos, versión 2.0. *Revista Cubana de Informática Médica*, 5(2), 118-131.
- Sanchez-Miranda, E., Lemus-Bautista, J., Pérez-Gutiérrez, S. y Pérez-Ramos, J. (2013). Effect of Kramecyne on the Inflammatory Response in Lipopolysaccharide-Stimulated Peritoneal Macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8.
- Sánchez-González, A., Granados-Sánchez, D. y Simón-Nabor, R. (2008). Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3);, 271-270.
- Schiffer, C., Lalanne, A., Cassard, L., Mancardi, D., Malbec, O. y Bruhns, P. (2011). A Strain of *Lactobacillus casei* Inhibits the Effector Phase of Immune Inflammation. *J Immunol*, 2646 - 2655.
- Secretaría de Salud. (1984). *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*. Estados Unidos Mexicanos.
- Secretaría de Salud. (2012). *Reglamento de Insumos para la Salud*. Estados Unidos Mexicanos.

- Shan, V., Midha, K., Findlay, J., Hill, H., Hulse, J. y McGilveray, I. (2000). Bioanalytical Method Validation - A revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, 17(12), 1551-1557.
- Singh, R. (2002). *Chromatography*. New Delhi: Mittal Publications.
- Snyder, L., Kirkland, J. y Dolan, J. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Hoboken, NJ: John Wiley y Sons, Inc.
- Soldin, O., Chung, S. y Mattison, D. (2011). Sex Differences in Drug Disposition. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-14.
- Universidad de Zaragoza. (2014). *Volumen de sangre circulante*. Obtenido de http://cea.unizar.es/Disenos_experimentales/Sangre/VOLUMEN%20SANGRE%20CIRCULANTE.pdf
- Van der Put, A. (1978). *Plantas Medicinales*. Barcelona, España: Editorial y librería Sintés.
- Vicini, P., Brill, A., Stabin, M. y Rescigno, A. (2008). Kinetic Modeling in Support of Radionuclide Dose Assessment. *Seminars in Nuclear Medicine*, 335-346.
- Vree, T., Van den Biggelaar Martea, M., Verwey Van Wissen, C., Vree, M. y Guelen, P. (1993). The pharmacokinetics of naproxen, its metabolite O-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. Effect of cimetidine. *Br. J. clin. Pharmac.*, 467-472.
- Waksmundzka Hajnos, M. y Sherma, j. (2011). *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T. y Uno, T. (1978). Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 547-558.
- Zsila, F., Bikadi, Z., Malik, D., Hari, P., Pechan, I. y Berces, A. (2011). Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics*, 1806-1813.

Anexo 1

Composición de los geles y soluciones tampón empleados en la evaluación de la unión de la kramecina a proteínas.

Cuadro A.1 Contenido de los geles concentradores y separadores

Solución	Gel separador (10 mL)	Gel concentrador (5 mL)
Acrilamida:bis-acrilamida 73:4 al 30 %	3.33 mL	650 µL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	-
Tris 0.5 M pH 6.8	-	1 250 µL
Agua desionizada	4 mL	3 050 µL
Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%	100 µL	50 µL
Persulfato de amonio al 10 %	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	10 µL

Cuadro A.2 Contenido de Buffer de carga para sistema Laemmli

Cada 9.5 mL contienen:	
Tris 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
Glicerol	2.50 mL
SDS 10 % w/v	2.00 mL
Azul de bromofenol 0.05 % w/v	200 µL
Agua desionizada	3.55 mL

Tabla A.3. Contenido del Buffer de corrida 5X pH 8.3

Cada 500 mL contienen:

Tris base (THAM)	7.5 g
Glicina	36 g
SDS	2.5 g
Agua desionizada	cbp 500 mL
