



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL ESPACIO DE
DILUCION DEL 5 FLUORO ($6-^3\text{H}$)
URACILO EN PERROS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O
P R E S E N T A:**

RICARDO ARROYO ANDRADE

MEXICO, D.F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Estudio del Espacio de Dilución
del 5 Fluoro ($6\text{-}^3\text{H}$) Uracilo en Perros.

I.- INTRODUCCION.

Ha sido procedimiento consagrado explorar mediante sustancias que llenan ciertos requisitos, volúmenes o espacios en un ser vivo. Como ejemplo ilustrativo se presenta la medición del volumen plasmático y por consiguiente también, el volumen sanguíneo en animales y aún en seres humanos.

En un principio se utilizaba el azul de Evans que se fija en la seroalbúmina in vitro, y una vez teñida ésta, se introducía por vía intravenosa al torrente circulatorio, permaneciendo en el espacio que ocupa la sangre. De la misma manera, más tarde se ha podido marcar con el empleo de elementos radioactivos la misma seroalbúmina, utilizándose en un principio el yodo radiactivo (^{131}I) y más tarde el tecnecio radiactivo ($^{99\text{m}}\text{Tc}$).

Para tal propósito ha sido utilizado el así llamado principio de dilución. Al distribuirse uniformemente el agente explorador, como algunos de los arriba citados, su concentración guardará una relación inversa con el tamaño del volumen, lo que se puede expresar con la siguiente fórmula:

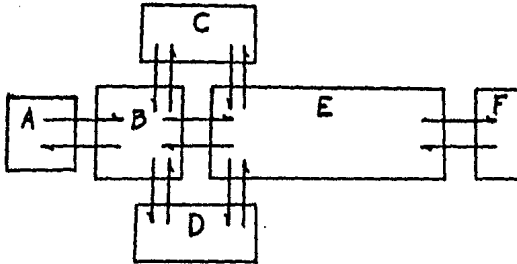
$$V = \frac{q}{C} \quad (I)$$

donde q es la cantidad de agente explorador inyectado, C su concentración una vez que se ha alcanzado una mezcla uniforme, y V el volumen por explorar.

La medición del volumen plasmático ha permitido no sólo medir la cantidad de sangre que tiene un ser vivo, sino también valorar la reducción de este volumen en casos de hemorragia; estudiar mecanismos naturales de restitución y aspectos que se correlacionan.

Así también, mediante el empleo de agua marcada con deuterio (D_2O) o tritio (HTO) se ha explorado el contenido de agua total en los organismos vivos (5). A su vez, de acuerdo con apreciaciones de tipo anatómico, histológico y fisiológico, el volumen de agua total ha sido dividido (fig. 1) en seis espacios o compartimentos (9) (6).

Para ilustrar la forma de medición, por ejemplo del volumen intersticial de la figura 1, hay que considerar un volumen absoluto (en litros) en determinado sujeto y lo que representa porcentualmente con relación a algún volumen de agua total (el 20% según la figura 1). La medición se realiza de la manera siguiente: primero, determinar el volumen del agua total; segundo, medir el volumen del espacio conocido como el "espacio de la inulina" (que es la suma de



- A agua del plasma - 7.5% del agua corporal
- B agua de la linfa - intersticial - 20.0%
- C agua del tejido conectivo denso y cartilago - 7.5%
- D agua del hueso - 7.5%
- E agua intracelular - 55.0%
- F agua transcelular - 2.5%

Fig. 1. Espacios o compartimentos en los que se ha dividido el volumen de agua total del cuerpo humano.

los compartimentos A+B); tercero, determinar el volumen del espacio intravascular A, el cual se resta finalmente del espacio de la inulina A+B, obteniéndose así el volumen del espacio intersticial buscado B, o sea $(A+B)-A=B$. Conociendo el volumen de agua total y conociendo el volumen del espacio intersticial, se podrán calcular los porcentajes respectivos de A y B.

Recientemente en el Centro de Estudios Nucleares se investigó el comportamiento de varias sustancias marcadas (8) (publicado en 1984), ^{113m}In EDTA, ^{99m}Tc DTPA, ^{131}I Talamato, y comparándolas con la ^3H inulina pero en forma simultánea; se comprobó la similitud existente entre estas sustancias con la inulina en cuanto al espacio de dilución que abarcan. Posteriormente se comparó en perros también a la ^{14}C Creatinina con alguno de los agentes antes citados marcados con γ -emisores, en forma simultánea en el mismo sujeto de estudio (7). Se encontró que en algunos animales el espacio de dilución de la creatinina era igual al de la inulina, pero que en otros, el espacio de la creatinina era definitivamente mayor que el espacio de la inulina, o más bien, que el espacio de las sustancias γ -emisoras estudiadas que se comportan como la inulina.

Habiéndose encontrado diferencias entre diversos sujetos en el tamaño del espacio de la creatinina marcada con ^{14}C , creatinina exógena, se pensó que esta propiedad podría

hacerse extensiva a otras sustancias. Se consideró que sustancias con acción terapéutica contra tumores malignos, sustancias cancericidas, podrían tener espacios funcionales de dilución diferentes en diferentes sujetos. Planteándose se la posibilidad de que estas sustancias en algunos sujetos, por consiguiente, pudiesen llegar al sitio donde deben de actuar y en otros no. El objetivo del presente estudio es el de medir el espacio de dilución del 5 fluorouracilo en perros, con el fin de averiguar si existen diferencias en cuanto al tamaño de dicho espacio de un perro a otro. De haber estas diferencias, existe la posibilidad de desarrollar un método diagnóstico que pronostique la penetración de un medicamento al sitio donde debe actuar. Antes de seguir adelante es pertinente, sin embargo, abordar algunos aspectos fundamentales referentes a sustancias cancericidas (quimioterápicos) que revisten importancia en aspectos reales del tratamiento de procesos malignos en la actualidad; a su vez, se aprovecha para explicar el motivo por el cual se escogió al 5 fluorouracilo, sus aspectos farmacodinámicos esenciales, y decir algunas palabras sobre su mecanismo de acción.

El 5 fluorouracilo es una sustancia utilizada en la quimioterapia contra el cáncer. La quimioterapia ha adquirido una importancia relevante en el tratamiento de neoplasmas u otros procesos malignos similares, pudiendo lo-

grarse incluso que individuos afectados lleguen a longevidades normales. Como se puede apreciar en la tabla 1, son varias las entidades nosológicas en las cuales la quimioterapia ha cambiado el pronóstico en un sentido favorable, de una manera radical.

En la leucemia linfocítica aguda de los niños se ha llegado a remisiones completas hasta en un 97% de los pacientes tratados con una combinación de prednisona, vincristina y daunorubicina. En la enfermedad de Hodgkin se llega a curar al 20% de los pacientes usándose ciclofosfamida, y hasta un 81% empleando terapia de drogas en combinación (vincristina + prednisona + mostaza nitrogenada + procarbazona). El 5 fluorouracilo se utiliza contra el cáncer de la mama, logrando menos del 5% de remisiones totales en los enfermos. Si se le emplea en combinación con metotrexate, ciclofosfamida, vincristina y prednisona, su efectividad aumenta al 25% de remisiones completas y hasta un 90% de remisiones parciales.

El 5 fluorouracilo es administrado directamente al torrente sanguíneo debido a que su absorción por el tracto gastrointestinal es incompleta. La droga se diluye, según los estudios hasta ahora publicados, en todos los compartimentos del cuerpo, incluyendo el del líquido cefalorraquídeo (2), en donde los niveles más altos de concentración se al-

Tabla 1. Porcentaje de pacientes con leucemia linfocítica aguda, enfermedad de Hodgkin o cáncer avanzado de la mama, llegando a remisiones completas con terapia de droga única o en combinación (15).

ENFERMEDAD	TRATAMIENTO	PORCIENTO DE PACIENTES QUE LLEGAN A REMISIONES COMPLETAS ^a
Leucemia linfocítica aguda de los niños	Metotrexate	22
	6-Mercaptopurina	27
	Prednisona	63
	Ciclofosfamida	40
	Vincristina	57
	Daunorubicina	38
	Asparaginasa	67
	Prednisona + Vincristina	90
	Vincristina + prednisona + metotrexate + 6-mercaptopurina	94
	Prednisona + vincristina + daunorubicina	97
Enfermedad de Hodgkin	Prednisona	< 5
	Mostaza nitrogenada	20
	Ciclofosfamida	20
	Vinblastina	27
	Vincristina	< 10
	Procarbazina	< 10
	Carbustina	< 5
	Vinblastina + clorambucil	40
	Vincristina + prednisona + mostaza nitrogenada + procarbazina	81
	Cáncer avanzado de la mama	Fluorouracilo
Metotrexate		< 5 (45)
Ciclofosfamida		< 5 (27)
Vincristina		< 5 (22)
Fluorouracilo + metotrexate + ciclofosfamida + vincristina + prednisona		17-25 (37-90)

^aLos números entre paréntesis representan remisiones parciales.

canzan a los 90 minutos aproximadamente, después de la inyección intravenosa. Pruebas del líquido cefalorraquídeo muestran que una cantidad apreciable de droga persiste por más de 8 horas (2). En un estudio detallado de la distribución del 5 fluorouracilo en macacos, se deduce que la sustancia entra a este líquido por difusión simple (1).

El 5 fluorouracilo es eliminado rápidamente del torrente sanguíneo, teniendo una vida media entre 10 y 20 minutos en el plasma (2). La droga es metabolizada por los tejidos hepáticos principalmente de manera catabólica. La droga es convertida a un dihidroderivado, y el anillo es desdoblado a ácido α -fluoro- β -ureidopropiónico, el cual es catabolizado a α -fluoro- β -alanina, amonio, urea y bióxido de carbono, como ocurre en la degradación del uracilo (12). Si el catabolismo disminuye, la toxicidad y el efecto antitumoral aumentan (19). Si el 5 fluorouracilo es dado por infusión intravenosa lenta, el catabolismo es mayor que cuando la droga se suministra mediante una sola inyección intravenosa (13), lo cual puede explicar la baja toxicidad reportada con administración por goteo intravenoso continuo (11).

El 5 fluorouracilo bloquea la síntesis de ADN, principalmente por la inhibición de una enzima, la timidilato sintetasa (10). Esta enzima dirige la transferencia y reducción de un grupo metileno, desde ácido fólico reducido hasta ácido desoxiuridílico monofosfato (dUMP), para formar ácido

desoxitimidílico monofosfato (dTMP). La timidilato sintetasa es bloqueada debido a la formación de un complejo ternario covalente con la fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP) y el cofactor metilenotetrahidrofolato (CH_2FH_4), (fig. 2).

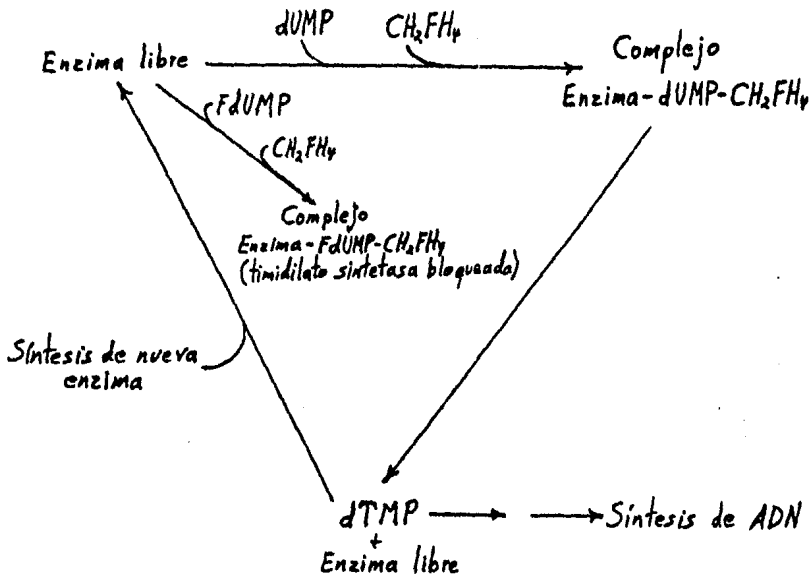


Fig. 2. Interrupción de la síntesis de ADN debida al bloqueo de la timidilato sintetasa.

Los niveles libres de dUMP entonces se elevan, mientras que los niveles de FdUMP decrecen. Como más dUMP libre resulta útil para competir con el FdUMP por la nueva enzima sintetizada, la tasa de inactivación de nueva timidilato sin

tetasa baja y cantidades mayores de dTMP son creadas para permitir la síntesis de ADN y la recuperación celular.

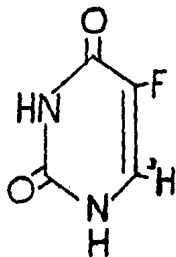
II.- MATERIAL.

II.1. BIOLOGICO.

Para el presente estudio se utilizaron 8 perros sanos para cirugía experimental, de 9.5 kg. a 20.0 kg. de peso (ver en resultados la tabla No. 2), proporcionados por la Facultad de Medicina de la UNAM. Se realizaron 12 experimentos en total, desarrollándose dos con el primer perro y cuatro con el segundo para efectos de comparación.

II.2. RADIATIVO.

El fármaco marcado a investigar fue el 5 Fluoro ($6-^3\text{H}$) Uracilo (1mCi/ml); con una actividad específica de 840 mCi/mmol , o sea 31 GBq/mmol .



II.3. ELECTRONICO.

II.3. a. COMPUTACIONAL.

Una calculadora programable TI - 59

II.3. b. DE DETECCION.

Un contador de centelleo líquido automático con circuito de coincidencia BF 5000/300, marca Berthold.

II.4. COMPLEMENTARIO.

Balanza analítica

Jeringas desechables

Anestosal Smith Kline (1ml/2.5 kg.) Pentobarbital sódico 0.063g, vehículo c.b.p. 1ml

Insta - Gel (mezcla centelladora)

Frascos de vidrio especial libre de potasio y carbono radiactivos (viales)

Suero fisiológico

Propipetas

Otros materiales e instrumentos convencionales.

III.- METODO.

Para realizar mediciones exactas de volúmenes pequeños, se utilizan sustancias marcadas que para investigaciones biológicas son comunmente β -emisoras. Estas sustancias tienen la desventaja de que las partículas β emitidas son de poco alcance y no atraviesan los espesores que logran los γ -emisores, en el caso del tritio, no atraviesa ni siquiera una hoja de papel. Por lo tanto, su detección se lleva a cabo mediante el empleo de un aparato especial conocido como contador de centelleo líquido. Para la detección es necesario mezclar la sustancia radiactiva con líquido centellador, el cual convierte la energía de las partículas β en fotones ultravioleta. Estos fotones son registrados por el contador de centelleo, que consta básicamente de dos tubos fotomultiplicadores en posición opuesta y un circuito de coincidencia que detecta sólo los fotones que chocan simultáneamente en ambos fototubos. Tiene también un sistema de refrigeración, en el cual se encuentran los fotomultiplicadores, que sirve para reducir las cuentas del así llamado ruido electrónico que emiten estos fototubos por causa térmica.

De las técnicas para detectar la radiactividad de una muestra (tales como la de relación de canales, la de estándar interno y la de estándar externo), la mejor por ser más

exacta es la técnica de estándar interno.

TECNICA DE ESTANDAR INTERNO EMPLEADA.

1°. En un par de frascos A y B (de vidrio especial libre de material radiactivo natural) se colocan 15.0 ml del líquido de centelleo Insta - Gel en cada frasco (fig. 3a). Después se introducen en el contador de centelleo y se toman sus cuentas por minuto (c.p.m.) de fondo, mismas que se registrarán posteriormente a las cuentas por minuto de la muestra radiactiva. Las cuentas de fondo sirven también para detectar una posible contaminación.

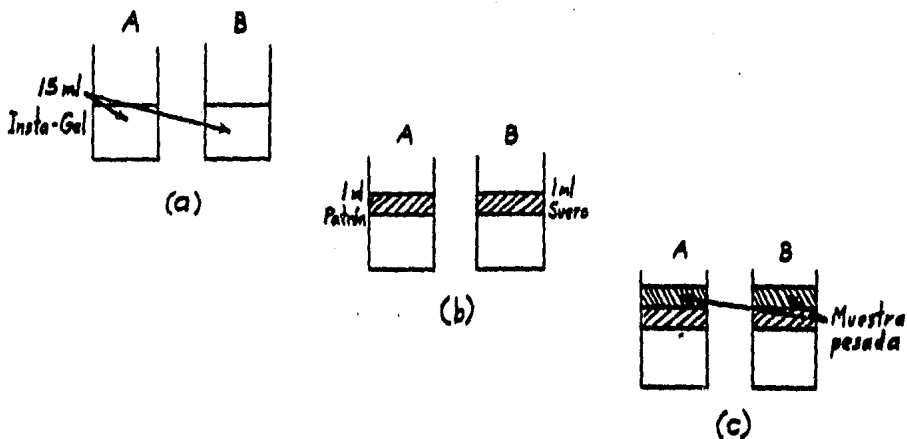
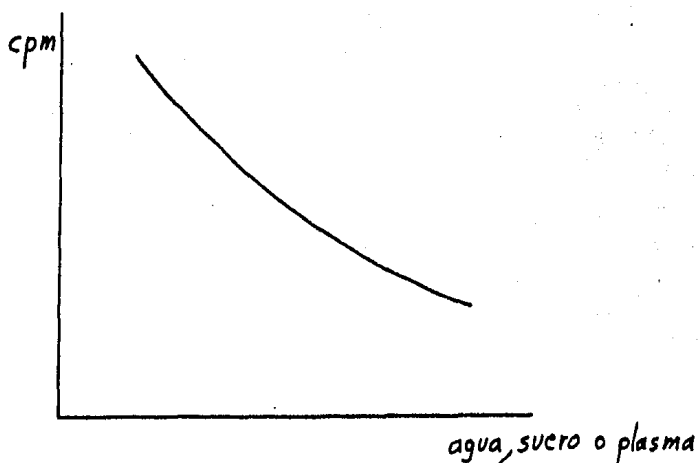


Fig. 3. Estándar o patrón interno; (3a) frascos con líquido de centelleo; (3b) frasco A con solución patrón y el B con suero para igualar el quenching; (3c) frascos con la muestra radiactiva problema.

2°. Al frasco A se le agrega un mililitro (al cual se le tomó su peso) de la solución patrón radiactiva, en tanto que al frasco B se le añade un mililitro de suero fisiológico (fig. 3b) con el propósito de igualar la extinción (quenching). Este fenómeno consiste en la pérdida de cuentas (gráfica I) debida al aumento de algún volumen en la muestra radiactiva entre otras causas, pues las cuentas pueden disminuir también por extinción química y por color (cromógeno). Las cuentas pueden aumentar por termoluminiscencia y por quimioluminiscencia. El método permite con estos cuidados, determinaciones para cada muestra en particular.



Gráfica I. Extinción o quenching.

Para enfatizar, debido al fenómeno de extinción, el número de cuentas por minuto (cpm) de una muestra radiactiva, no será el mismo que el número de desintegraciones por minuto (dpm) netas de la muestra, por lo que se hace indispensable obtener su eficiencia y así convertir c.p.m. en d.p.m.

3°. Enseguida a cada frasco se le añade el mismo volumen de muestra biológica radiactiva (fig. 3c), se toman sus cuentas, con lo cual es posible calcular ahora la eficiencia y con ésto la radiactividad de la muestra biológica en desintegraciones por minuto, siempre y cuando se hayan pesado estos volúmenes. La eficiencia se obtiene restando las cpm del frasco B a las del frasco A, lo que da las cuentas de la solución patrón ($A-B=Patrón$). Como se conocen las dpm del patrón, basta sacar la relación entre las cpm y las dpm para obtener la eficiencia. Conociendo ésta se calculan las desintegraciones de la muestra biológica del frasco B.

Para ilustrar con más detalle, se describe la técnica utilizada confrontándola con una determinación directa pesando un volumen en una balanza analítica.

En un experimento control se diluyó una muestra radiactiva conocida en una cantidad también conocida de suero fisiológico (volumen de dilución), con el propósito de deducir esta cantidad de suero mediante la técnica de estándar interno antes descrita, probando así su validez.

a).- En un tubo de ensayo se colocaron 5.12297g de suero fisiológico. Esta cantidad se determinó pesando en una balanza analítica una jeringa que contenía 5.0ml de suero, y después pesando nuevamente la jeringa pero vacía.

b).- Después se agregaron 0.96836g de solución patrón radiactiva (con 47 885 dpm/g), la cual tenía una actividad de 46 370 dpm. Estas desintegraciones estaban contenidas ahora en 6.09133g de suero fisiológico, cantidad que se debe obtener o deducir mediante la técnica de estándar interno:

1°. A cada uno de la pareja de frascos A y B se le colocaron 15.0ml de Insta - Gel usando una pipeta con propipeta, y se tomaron sus cuentas de fondo en el contador de centelleo líquido. Para el frasco A el fondo fue de 29 cpm, en tanto que para el frasco B el fondo fue de 30 cpm.

2°. Al frasco A se le agregó 1.0ml de la solución patrón (fig. 4), y para una determinación más minuciosa, se obtuvo su peso en una balanza analítica; éste fue de 1.0269g, por lo tanto, su actividad era de 49 173 dpm. Al frasco B se le añadió 1.0ml de suero fisiológico para igualar la extinción (quenching).

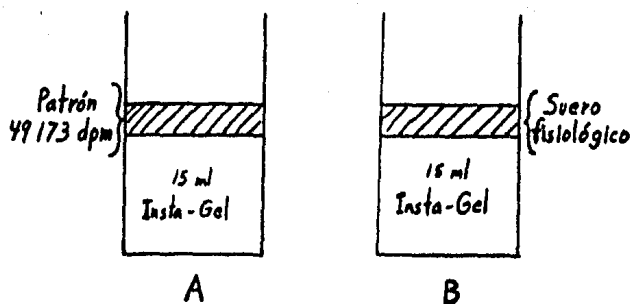


Fig. 4. Frascos con patrón y suero en un experimento control de la técnica de estándar interno.

3º. A cada frasco se le agregó 1.0ml de la muestra radiactiva problema contenida en el tubo de ensayo. El peso de éste fue de 1.01927g para el frasco A, dando un total de 19073 cpm (ya sustraídas las cuentas de fondo). Para el frasco B la muestra pesó 1.028g, dando 2 620 cpm en total.

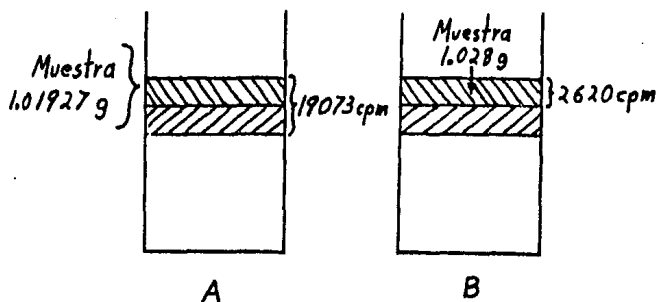


Fig. 5. Frascos con la muestra radiactiva en un experimento control de la técnica de estándar interno.

Para obtener la eficiencia de la pareja de frascos (fig. 5), primero se deben de restar las cuentas de la muestra reales del frasco B, a las cuentas de la muestra y el patrón reales del frasco A, siendo necesario saber cuántas cpm hay en un gramo de la muestra del frasco B ($2620 \text{ cpm} \div 1.0289 \text{ g} = 2549 \text{ cpm/g}$). Si se tienen 2549 cpm/g en un gramo de la ya mencionada muestra radiactiva del frasco B, en 1.01927 g de dicha muestra en el frasco A se tendrán 2598 cpm ($2549 \text{ cpm/g} \times 1.01927 \text{ g} = 2598 \text{ cpm}$). Restando estas cuentas a las 19073 cpm registradas en el mismo frasco A, se tendrán

las cuentas netas del patrón; esto es: 19 073 cpm de la muestra y el patrón, menos 2 598 cpm de la muestra, se obtienen 16 475 cpm del patrón.

Como se sabe que el patrón tenía 49 173 dpm y sólo se registran 16 475 cpm, entonces la eficiencia fue de 33.50415%. ($16\ 475 \times 100 \div 49\ 173 = 33.50415$). Una vez obtenida la eficiencia, se relaciona ésta con las cuentas por gramo de la muestra existentes en el frasco B (2 549 cpm/g), para tener así el número de desintegraciones por gramo de la muestra radiactiva: $2\ 549 \times 100 \div 33.50415 = 7\ 608$ dpm/g.

Finalmente, como en el tubo de ensayo se tenían 46 370 dpm y la muestra extraída de él sólo presentaba 7 608 dpm/g, entonces se dedujo que las 46 370 dpm estaban contenidas en 6.0949g de suero fisiológico ($46\ 370 \text{ dpm} \div 7\ 608 \text{ dpm/g} = 6.09490\text{g}$). Este resultado es poco diferente de 6.09133g que es el valor que se esperaba obtener. La diferencia es de 0.00357g que equivale a 0.06% de error. La imprecisión posiblemente se debe a errores en la determinación de los pesos con la balanza analítica, o a error estadístico ya que las cuentas por minuto que registra el contador de centelleo son debidas a un proceso aleatorio (del cual se acepta un error estándar del 1.0% bajo las condiciones utilizadas en el presente estudio).

PREPARACION DE LA SOLUCION DEL 5 FLUOROURACILO

MARCADO PARA INYECTAR.

A la solución de 5 fluorouracilo (1mCi/ml), (840 mCi/mmol), con peso estimado de 1.00015g, se le agregó suero fisiológico con peso de 9.10129g, obteniéndose una actividad específica de 98.9967 μ Ci/g. Se procedió de la manera siguiente:

- a).- Siendo el peso molecular del 5 fluorouracilo de 130.
- b).- Una milimol equivale a 0.13g.
- c).- Si 840 mCi existen en 0.13g de 5 fluorouracilo, habrá 1mCi en 0.00015g de la droga.
- d).- Como el mCi de 5 fluorouracilo se encontraba en 1.0g de agua, la solución pesaba en total 1.00015g.
- e).- Tomando 9 ml de suero fisiológico con una jeringa, y precisando su peso en una balanza analítica, se obtuvieron 18.83988g (se incluye el peso de la jeringa).
- f).- El suero se agregó a la solución de 5 fluorouracilo y se pesó ahora la jeringa vacía, dando 9.73859g, por lo que el suero agregado tuvo un peso de 9.10129g.
- g).- Sumando los pesos del 5 fluorouracilo y del suero resulta que la solución para inyectar pesaba

10.10134g.

- h).- Finalmente, si se tiene 1mCi , ó $1000\ \mu\text{Ci}$ en 10.10134g de solución inyectable, por cada gramo de esta solución se tendrán $98.9967\ \mu\text{Ci} = 2.19772 \times 10^8$ dpm.
($1\ \mu\text{Ci} = 2.22 \times 10^6$ dpm). Se describe con detalle para ilustrar la precisión indispensable.

PREPARACION DE LA SOLUCION MADRE PARA

EL ESTANDAR INTERNO.

A un matr az aforado de 50 ml se le agregaron 49.70559g de suero fisiológico, empleando jeringas de la manera antes citada (pes ndolas con el suero y después sin él). Posteriormente se añadieron 0.10963g de la solución para inyectar antes descrita, que corresponde a una actividad de $10.853\ \mu\text{Ci/g} = 2.40937 \times 10^7$ dpm/g. Teniendo la solución un peso total de 49.81522g, la actividad nueva por gramo es de $0.2179\ \mu\text{Ci} = 483\ 661$ dpm.

PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON PARA EL

ESTANDAR INTERNO.

A un matr az aforado de 100ml se agregaron 10 ml de la solución madre, con un peso de 9.89241g y por lo tanto una actividad de $2.1555561\ \mu\text{Ci/g}$. Después se añadieron

90.04194g de suero. Teniendo la solución hija un peso total de 99.93435g, su actividad específica es de $2.15697 \cdot 10^{-2} \mu\text{Ci/g} = 47885 \text{ dpm/g}$.

OBTENCION DE MUESTRAS SANGUINEAS.

a).- Se anestesió al animal en turno inyectándole por vía intravenosa 1.0 ml con 0.63g de Pentobarbital sódico por cada 2.5 kg. de peso.

b).- Una vez anestesiado, se colocó sobre una mesa especial forrada con plástico como medida de seguridad radiológica, para evitar una posible contaminación por orina o heces fecales en el transcurso del experimento.

c).- Se inyectó por vía intravenosa la solución radiactiva del 5 fluorouracilo (0.3ml), precisando su peso para tener una mayor exactitud (pesando primero una jeringa vacía y después pesándola con la solución radiactiva). Después de inyectar la solución, sin desprender la jeringa se sució nó sangre y se inyectó de nuevo, repitiendo seis veces este procedimiento para garantizar la total penetración de la solución radiactiva en el torrente circulatorio.

d).- A determinados intervalos después de la inyección de 5 fluorouracilo (10,25,45,60,90 y 120 minutos), se obtuvieron 5.0 ml de sangre venosa cada vez.

e).- Las muestras sanguíneas radiactivas fueron colocadas en tubos de ensayo y centrifugadas.

f).- El suero de cada muestra fue agregado a un par de frascos en cantidad pesada semejante, para medir su radiactividad empleando la técnica de estandar interno ya descrita.

De manera colateral se buscó probar si el 5 fluorouracilo penetraba en los eritrocitos. Para ello, antes de inyectar el 5 fluorouracilo se extrajo una muestra de 4.0 ml de sangre, la cual se colocó en un tubo de ensayo previamente pesado. Enseguida se pesó el tubo con la sangre; agregándose posteriormente 1.0 ml de solución patrón radiactiva también pesada. Después de una hora, la muestra fue procesada para un análisis mediante estandar interno.

PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION DE LAS MUESTRAS.

Una vez determinadas las dpm de las muestras en los tiempos indicados, que podían variar un poco de acuerdo con la posibilidad de obtener las muestras justamente a tiempo, se procedió a graficar los resultados.

Para valorar el espacio de dilución, se procedió a introducir en una calculadora programable los valores conocidos, y con una técnica manual de mejor ajuste, se determinó fundamentalmente el volumen de dilución desconocido.

Se apreciará la situación de una manera esquemática en la figura siguiente:

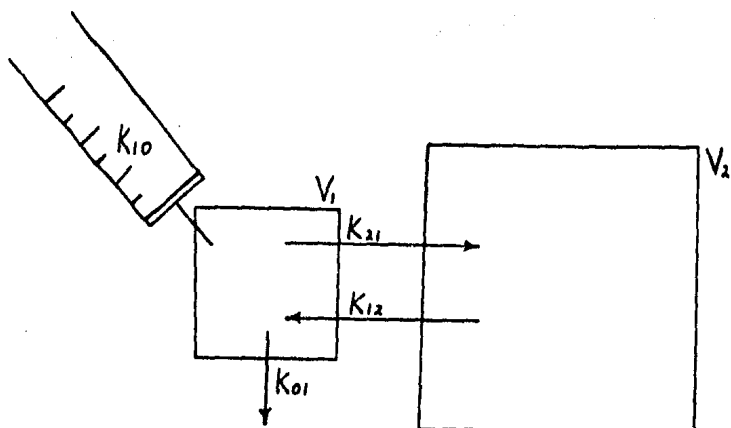


Fig. 6. Valores conocidos y desconocido (V_2) del modelo matemático bicompartimental.

VALORES CONOCIDOS:

1).- K_{10} ; cantidad de 5 fluorouracilo inyectada, constante e invariable en cada experimento, expresada en dm^3 .

2).- V_1 ; por previa experiencia se acepta un 70% de agua total en el animal explorado, hubo excepciones según lo reveló el mal ajuste de las curvas, elevándose este porcentaje. V_1 se tomó como $V_T (e^2/100)$; $e^2=7.3890561$.

3).- $K_{21} = V_1/e$; $e=2.7182816$.

4).- $K_{12} = K_{21}$; los ajustes a la curva podían hacerlos

variar, sobre todo al K_{12} .

5).- K_{01} ; valor que se determinaba para cada nuevo juego de valores de acuerdo con la fórmula siguiente (desarrollada por P. Eberstadt):

$$K_{01} = \frac{\lambda(\lambda V_1 V_2 - K_{21} V_2 - K_{12})}{\lambda V_1 - K_{12}} \quad (\text{II})$$

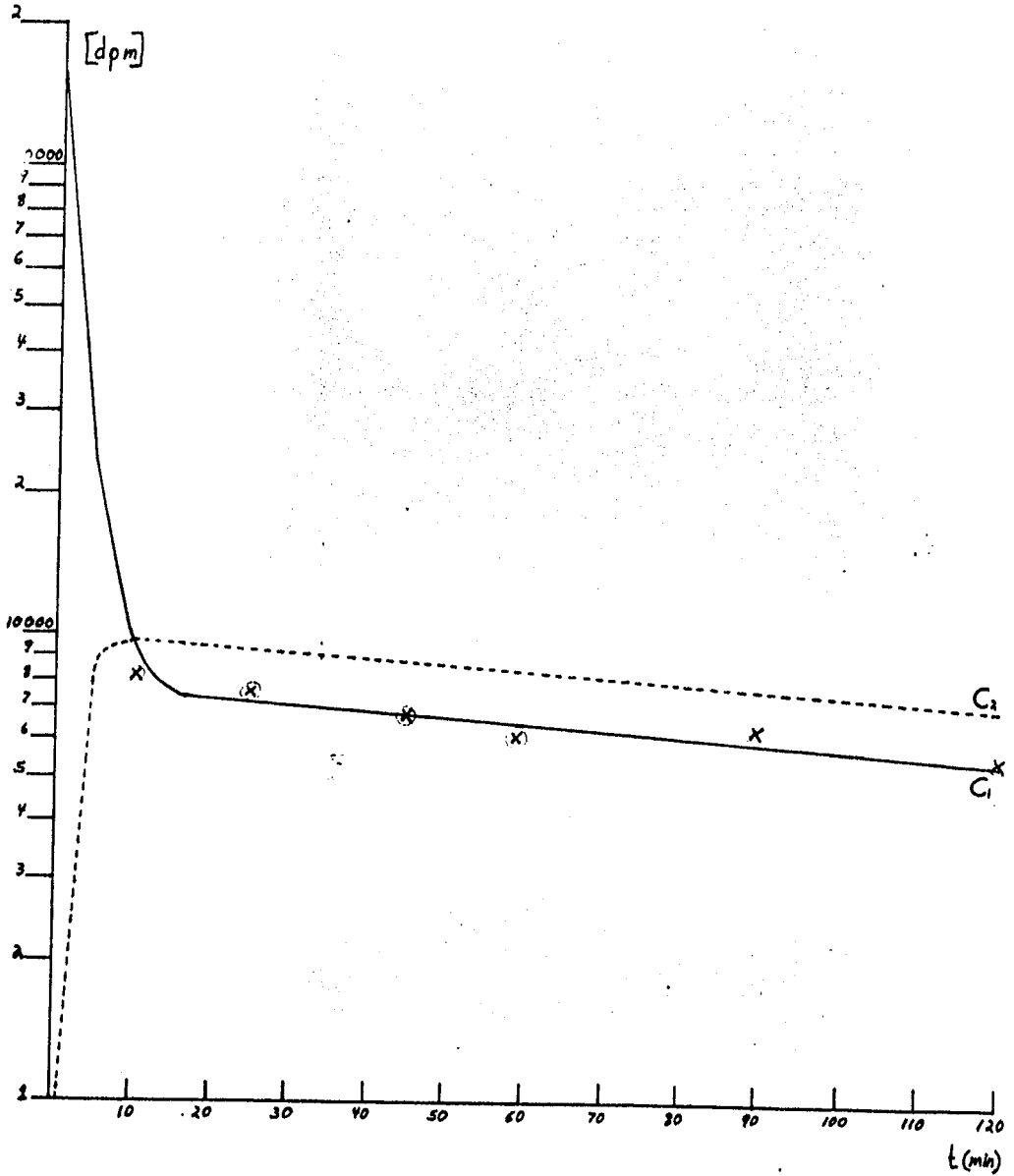
La λ se determina mediante un programa de mínimos cuadrados, obtenida del logaritmo natural de los valores de la $\log m$ para las muestras más allá de los 25 minutos, o sea, a partir del momento en que se había alcanzado un equilibrio, rama lenta de la curva de decaimiento (gráfica II).

VALOR DESCONOCIDO O INCOGNITA V_2 :

Se comenzaba con $V_2 = V_T - V_1$

Si el ajuste era bueno, es decir, si los valores experimentales coincidían con los valores teóricos del modelo matemático, $V_2 + V_1$ correspondían al espacio del agua total (V_T) ó 100% del agua. De no ser así, por pasos sucesivos se disminuía V_2 hasta alcanzar una buena correlación entre los valores experimentales y los del modelo matemático. En algunas ocasiones se requería de una revaloración del K_{12} .

El modelo matemático se basó en la solución de las siguientes ecuaciones diferenciales:



Gráfica II. Desintegraciones por minuto en los espacios 1 y 2
a diferentes tiempos.

$$dq_1/dt = K_{12}q_2/V_2 - K_{21}q_1/V_1 - K_{01}q_1/V_1 + K_{10}C_e \quad (\text{III})$$

$$dq_2/dt = K_{21}q_1/V_1 - K_{12}q_2/V_2 \quad (\text{IV})$$

$$dq_{01}/dt = K_{01}q_1/V_1 \quad (\text{V})$$

Como en realidad las dpm de cada muestra son representativas de la concentración en el espacio 1, es importante recordar que una concentración está dada por una cantidad total sobre un volumen. La fórmula (III) permite el cálculo total de q_1 , o sea, la cantidad de 5 fluorouracilo en el espacio 1 ó intravascular y entonces $C_1 = q_1/V_1$, lo que también es cierto para $C_2 = q_2/V_2$.

La cantidad total eliminada (q_{01}) también puede ser calculada restándole a la cantidad administrada (q_{10}) la cantidad que se encuentra aún en el organismo, que es la suma de $q_1 + q_2$, de tal manera que $q_{01} = q_{10} - (q_1 + q_2)$. (Se aclara esta situación para que se entienda el contenido de las tablas ilustrativas que se encuentran en los resultados).

NOMENCLATURA EMPLEADA.

C_e .- Concentración en la entrada.

C_1 .- Concentración en el espacio 1. Es igual a q_1/V_1 .

Corresponde a las dpm que se obtuvieron en las muestras experimentales.

C_2 .- Concentración en el espacio 2. Equivale a q_2/V_2 .

No hay manera de determinarla experimentalmente. Se

puede deducir por medio del modelo matemático; y se han graficado sus valores.

K.- Constante.

K_{01} .- El subíndice indica el movimiento de algo en un cierto sentido. Significa que algo se mueve al espacio cero proveniente del espacio uno. En este caso el cero es el exterior y el uno es el espacio intravascular (fig. 6). Debido a que las magnitudes están expresadas en kg, una $K_{01} = 0.07$ significa lo mismo que depuración de sangre del agua del plasma en un minuto. Cuantitativamente indica la salida de 5 fluorouracilo contenido en 0.07 litros de agua plasmática, o sea en 70g. Si determinada droga o sustancia es depurada exclusivamente por el mecanismo de filtración glomerular, tiene también el significado de cantidad filtrada por minuto. Como el peso específico del agua es 1, también se puede decir que la filtración glomerular fue de 70ml/min. En un sentido muy riguroso por pequeños cambios debidos a la temperatura, y a causa del método que se utilizó para pesar los volúmenes, la expresión es en kg.

K_{10} .- Significa una cantidad en gramos por minuto procedente del exterior, introducida directamente al espacio intravenoso. En las fórmulas siempre aparece $C_e \times$

K_{10} , donde C_e es la concentración que hay en determinado peso de disolvente. La cantidad en sí podría haberse expresado en gramos, pero para fines prácticos se expresó en dpm. La C_e está prevista para infusiones continuas, no utilizadas en estos estudios.

K_{12} .- Expresa los kilogramos por minuto de agua con su soluto que pasan al espacio 1 (intravascular) procedentes del espacio 2.

K_{21} .- Expresa los kilogramos de agua que pasan al espacio 2 procedentes del espacio 1 cada minuto, o soluto.

q_1 .- Cantidad de material radiactivo en un momento dado en el espacio 1.

q_2 .- Cantidad de material radiactivo en un momento dado en el espacio 2.

q_{01} .- Expresa la cantidad de radiactividad existente en el exterior. Son las dpm que salieron del plasma. De acuerdo con las fórmulas utilizadas, expresa la cantidad total eliminada hasta el momento estudiado; por ejemplo, si se dice que en el minuto 30, q_{01} equivalía a 10^6 dpm, significa que un millón de dpm se han eliminado en 30 minutos.

q_{10} .- Cantidad de disolvente administrada cada minuto.

$q_{10} \times C_e =$ d.p.m. administradas por minuto.

$q_1(0)$.- Cantidad administrada en el espacio 1 al inicio del

estudio, es decir, en el tiempo cero. El subíndice único entre paréntesis se refiere al tiempo.

Si un gramo de solución hubiese tenido una concentración de 10 000 dpm y se hubieran pesado 1.2g, en realidad se habrían administrado 12 000 dpm. En el presente estudio y en las fechas en que se realizaron los experimentos, la solución inyectada tenía $98.9967 \mu\text{Ci/g} = 2.19772 \times 10^8 \text{ dpm/g}$.

$q(12)$.- Implica la administración en el minuto 12. En este estudio solamente se administraron cantidades al iniciar el experimento, pero las fórmulas permiten explorar otras eventualidades como la aquí ilustrada.

t .- Tiempo.

V_T .- Espacio del agua total, en Kg.

V_1 .- Agua intravascular, en Kg.

V_2 .- Espacio por determinar que, como se dijo antes, puede llegar hasta el tamaño de lo que resta de $V_T - V_1$.

λ_1 .- Pendiente de caída rápida. Es la pendiente inicial y aunque es negativa, en este estudio se omite el signo. Se determinó con una fórmula matemática; ver más adelante.

λ_2 .- Pendiente lenta que corresponde prácticamente a la depuración renal del agente explorado. Se determinó por el método de mínimos cuadrados a partir de los datos experimentales. Como en el caso de λ_1 la pendiente es negativa, pero en el texto se omitió

el signo. (Por supuesto, se hicieron las correcciones necesarias en las fórmulas).

SECUENCIA DE VALORACION.

1).- Primero se valoraba K_{01} empleando la fórmula (II), con $V_1 = V_T (e^2/100)$ y $V_2 = V_T - V_1$. Con la fórmula (VI) se puede emplear indistintamente λ_1 o λ_2 , dando idénticos resultados; son los únicos dos valores que deben dar el mismo K_{01} . El K_{12} primero se ponía del mismo valor que $K_{21} = V_1/c$.

El K_{01} es el único valor que falta para introducir a la fórmula siguiente que sirve para determinar λ_1 o λ_2 :

$$\lambda_{1,2} = \frac{\frac{K_{01}}{V_1} + \frac{K_{21}}{V_1} + \frac{K_{12}}{V_2} \pm \sqrt{\left(\frac{K_{01}}{V_1} + \frac{K_{21}}{V_1} + \frac{K_{12}}{V_2}\right)^2 - \frac{4K_{01} K_{12}}{V_1 V_2}}}{2} \quad (VI)$$

2).- Completando los valores con λ_1 se introduce en la fórmula (VII) siguiente:

$$q = K_{10} C e \left[\frac{a}{\lambda_1 \lambda_2} + \frac{(a-\lambda_1) e^{-\lambda_1 t}}{\lambda_1 (\lambda_1 - \lambda_2)} + \frac{(a-\lambda_2) e^{-\lambda_2 t}}{\lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_1)} \right] + q_{1(0)} \left[\frac{(a-\lambda_2) e^{-\lambda_1 t} - (a-\lambda_1) e^{-\lambda_2 t}}{\lambda_1 - \lambda_2} \right] \quad (VII)$$

donde $a = \frac{K_{12}}{V_2}$

Cada valor de q_1 era dividido por V_1 para los t respectivos y se comparaba con las lecturas experimentales. Si

estas lecturas no concordaban, por pasos sucesivos se disminuían los valores de V_2 hasta obtener una mejor correlación. Cada nuevo valor de V_2 significaba repetir todo el procedimiento desde 1) para conseguir un nuevo K_{01} siguiendo la secuencia descrita. Si el ajuste a la curva con sus valores experimentales era bueno, se aceptaban estos valores. De no ser así, se hacían ajustes similares cambiando primero K_{12} y después posiblemente K_{21} . Se podía haber automatizado un programa para encontrar los mejores ajustes, pero esto se hacía manualmente.

3).- Para poder graficar q_2 o C_2 , se utilizó la solución de la ecuación diferencial (IV):

$$q_2 = \frac{K_{21}}{V_1} \left\{ K_{10} C_e \left[\frac{1}{\lambda_1 \lambda_2} + \frac{\lambda_1 e^{-\lambda_2 t} - \lambda_2 e^{-\lambda_1 t}}{\lambda_1 \lambda_2 (\lambda_2 - \lambda_1)} \right] + q_1(0) \left[\frac{e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}}{\lambda_2 - \lambda_1} \right] \right\} \quad (\text{VIII})$$

4).- Se determinó q_{01} , que por simplicidad se puede reducir a:

$$q_{01} = q_1(0) - (q_1 + q_2) \quad (\text{IX})$$

La última ecuación diferencial (V) al ser resuelta da el mismo resultado hasta la décima decimal que con la fórmula (IX), siendo esto una prueba de que el sistema de ecuaciones funciona.

A continuación se ilustra el caso de una perrita llamada "pinta" estudiada en dos ocasiones. Hay que advertir que para poder establecer la repetitividad, se introdujo el

valor de $a_1(0) = 1 \times 10^8$ dpm con las debidas correcciones en las lecturas:

"Pinta" (primer estudio).

peso de 17.5 kg.	tiempo (min)	C_1 experimental (dpm/g)	C_1 teórica (dpm/g)
$V_T = 12.25$ kg.	10	12 133	10 508
$V_1 = 0.9051593721$ kg.	21	9 093	8 984
$V_2 = 6.5998$ kg.	30	8 364	8 597
$K_{21} = 0.332989524$ kg.	45	7 837	7 999
$K_{12} = 0.3$ kg.	60	7 276	7 442
$\lambda_1 = 0.4568901334$	90	6 278	6 441
$\lambda_2 = 0.004812$			
$K_{01} = 0.0437798878$ kg.			

"Pinta" (segundo estudio)

peso de 17.5 kg.	tiempo (min)	C_1 experimental (dpm/g)	C_1 teórica (dpm/g)
$V_T = 12.25$ kg.	10.5	9 746	11 760
$V_1 = 0.9051593721$ kg.	25	7 815	10 347
$V_2 = 6.5998$ kg.	45	7 482	9 849
$K_{21} = 0.332989524$ kg.	61	7 888	9 470
$K_{12} = 0.3$ kg.	90	7 266	8 819
$\lambda_1 = 0.4343381196$	119	6 841	8 213
$\lambda_2 = 0.002455$			
$K_{01} = 0.0212332606$ kg.			

Disminuyendo el K_{12} se ajustan más los datos teóricos a

los experimentales, aunque la λ_1 es más pequeña:

Modificación del K_{12} a 0.25 kg.

peso de 17.5 kg.	tiempo (min)	C_1 experimental (dpm/g)	C_1 teórica (dpm/g)
$V_T = 12.25$ kg.	10.5	9 746	9 989
$V_1 = 0.9051593721$ kg.	25	7 815	8 586
$V_2 = 6.5998$ kg.	45	7 482	8 172
$K_{21} = 0.332989524$ kg.	61	7 888	7 858
$K_{12} = 0.25$ kg.	90	7 266	7 318
$\lambda_1 = 0.4312538964$	119	6 841	6 815
$\lambda_2 = 0.002455$			
$K_{01} = 0.0252989805$ kg			

Resumiendo: contando con todas las constantes para realizar un experimento, éstas fueron introducidas en una calculadora con el programa respectivo. Inicialmente se corría el programa utilizando la cifra teórica que se obtenía como agua total (V_T). El volumen invariable de agua (V_1) se refiere al agua intravascular. V_2 es la resta del volumen de agua total menos V_1 . Si las cifras obtenidas como concentraciones (C_1) se parecían a las obtenidas experimentalmente, se consideraba que el espacio de dilución de la droga correspondía al espacio del volumen de agua total. De no ser así, se reducía progresivamente V_2 hasta lograr un acuerdo óptimo en las cifras. En esta forma el procedimiento se convierte en iterativo. Por supuesto que para

realizar cada corrida se tenían que calcular los valores necesarios en cada ocasión, como se explicó con anterioridad. Había casos en los cuales las constantes de difusión (K_{21} , K_{12}) eran cambiadas para lograr un mejor ajuste a la curva, también con un procedimiento iterativo.

IV.- RESULTADOS.

Los resultados se exponen en los cuadros siguientes:

Tabla 2. Porcentaje del agua total o volumen de dilución.

Estudio No.	Perros.	Peso (kg).	Valoración		Porcentaje del agua total.
			K_{01}	K_{21} vs K_{12}	
1	Pinta #1	17.5	0.0441	$K_{21} > K_{12}$	65%
5	Pinta #2	15.5	0.022	$K_{21} > K_{12}$	85%
2	Sasha #1	20.0	0.0264	$K_{21} \gg K_{12}$	65%
3	Sasha #2	20.0	0.0478	$K_{21} = K_{12}$	65%
4	Sasha #3	19.0	0.0278	$K_{21} < K_{12}$	65%
6	Sasha #4	19.0	0.0118	$K_{21} > K_{12}$	65%
7	Perro #3	12.0	0.028	$K_{21} > K_{12}$	100%
8	Perro #4	13.0	0.034	$K_{21} > K_{12}$	100%
9	Perro #5	9.5	0.033	$K_{21} < K_{12}$	88%
10	Perro #6	14.0	0.042	$K_{21} < K_{12}$	100%
11	Perro #7	13.0	0.021	$K_{21} > K_{12}$	100%
12	Perro #8	14.0	0.032	$K_{21} > K_{12}$	100%

Comentarios: se realizaron 12 experimentos en total con 8 perros; una perra llamada "Pinta" fue estudiada en dos ocasiones, en tanto que con otra, denominada "Sasha", se realizaron cuatro estudios obteniéndose porcentajes repetitivos. Ambos animales perdieron peso, debido posiblemente al cautiverio en que se encontraban, aún estando embarazada la "Pinta", que tuvo una camada de tres perritos sanos. Se encontró también que el K_{01} (depuración renal) variaba en cada o-

casión. En 8 casos el K_{21} resultó mayor que el K_{12} ; en un caso ambos flujos fueron iguales; y en 3 casos el K_{21} fue menor que el K_{12} . Finalmente puede decirse que en el 62.5% de los estudios el volumen de dilución era igual al 100% del volumen de agua estipulado, y el 37.5% restante fue menor del 100% mencionado.

Tabla 3. Volumen de dilución medido en sangre total.

Estudio No.	Perros.	Espacio de dilución en sangre total.
5	Pinta # 2	87%
6	Sasha # 4	57%
7	Perro # 3	85%
8	Perro # 4	concentró
9	Perro # 5	92%
10	Perro # 6	concentró
11	Perro # 7	concentró
12	Perro # 8	91%

Habiendo encontrado diferencias en el volumen de dilución, se pensó averiguar si también existían esas diferencias en un sistema más sencillo. Para esto se habían ya realizado algunos experimentos en sangre total de los mismos animales experimentales de la manera antes descrita, para averiguar si el 5 fluorouracilo penetraba o no a los eritrocitos. Se estudiaron todos los animales menos algunas repeticiones. Como resultado interesante se encontró que la droga no penetró a los eritrocitos en la perra "Sasha", que

en sus 4 repeticiones experimentales mostró un volumen de dilución del 65% solamente. En el caso del dálmata que tuvo un espacio de dilución del 85%, se encontró que el 5 fluorouracilo entró parcial o totalmente a los eritrocitos, pues un volumen de dilución en sangre del 87% puede corresponder al volumen total del agua y el resto a los solutos. Se obtuvieron cifras similares en 4 animales experimentales, en tanto que en 3 el fármaco aparentemente se concentró en los eritrocitos, como se indica en la tabla tres.

Es importante mencionar aquí que la medición del tritio comprende al 5 fluorouracilo y a sus metabolitos. La grá-fica II ilustra el comportamiento de las concentraciones en rigor del tritio, que no sigue exactamente al modelo matemático propuesto. Las cruces encerradas en un círculo de dicha gráfica indican las concentraciones que incluso transitoriamente se elevan en forma discreta, lo que se interpreta como indicativo de la acumulación de los metabolitos marcados en la sangre periférica y que en los experimentos marcaba variaciones de caso en caso.

V.- DISCUSION.

El interés despertado al estudiar el 5 fluorouracilo para el desarrollo de este trabajo se ha basado en numerosos puntos:

1.- Se trata de una sustancia que interviene directamente en el proceso reproductor celular.

2.- La respuesta de los tumores malignos ha sido variable en estirpes celulares idénticas (14).

3.- Los estudios existentes en la literatura científica se enfocan principalmente a las rutas metabólicas del 5 fluorouracilo (3); se ha demostrado, por lo menos en cultivos clonales, que la incorporación a las células varía en diversas estirpes. Sin embargo, estos sistemas son artificiales, por lo que es deseable realizar esta exploración en seres vivos.

4.- Hacer énfasis en explorar la posibilidad de comparar diferencias de difusibilidad a diversos espacios funcionales o metabólicos en diferentes sujetos, tratando de encontrar en caso afirmativo, criterios que pudiesen pronosticar una respuesta favorable en el caso de existir tumores, haciendo más lógica una planeación adecuada con fines terapéuticos.

5.- Otras consideraciones promisorias se refieren a estudios evaluadores en casos de neoplasias que pudieran ser

valorados antes de recibir un tratamiento con el 5 fluorouracilo y posiblemente combinaciones de otros agentes quimioterápicos o tumorocidas.

Para proceder con cierto orden es pertinente señalar los conceptos clásicos de las rutas metabólicas (2) que sigue el 5 fluorouracilo.

El átomo de F en el carbono 5 del uracilo no permite la metilación de este carbono, por lo que no se convierte el 5-fluoro -2'-desoxiuridin-5'-monofosfato en un análogo correspondiente al ácido timidílico. El 5 fluorouracilo al igual que la fluorodesoxiuridina son desdobladas in vivo convirtiéndose en 5-fluorouridina (FUR) (fig.8), y éste a su vez se convierte en los correspondientes monofosfato, difosfato y trifosfato de la fluorouridina. El monofosfato de fluorouridina (FURMP) se reduce para formar el 5-fluoro-2' -desoxiuridina-5'-monofosfato (FUDRMP). No existe anabolismo subsiguiente del difosfato y trifosfato de la fluorouridina. Según algunos autores, la formación del monofosfato de fluorodesoxiuridina es la base principal de acción del 5 fluorouracilo, ya que bloquea la timidilato sintetasa que es necesaria para catalizar la metilación del ácido 2'-desoxiuridílico para formar ácido timidílico. Debido a que este es el camino metabólico principal para la síntesis endógena del ácido timidílico, y según los criterios clásicos es un componente esencial del ADN, el bloqueo de esta

reacción inhibe la síntesis del ADN.

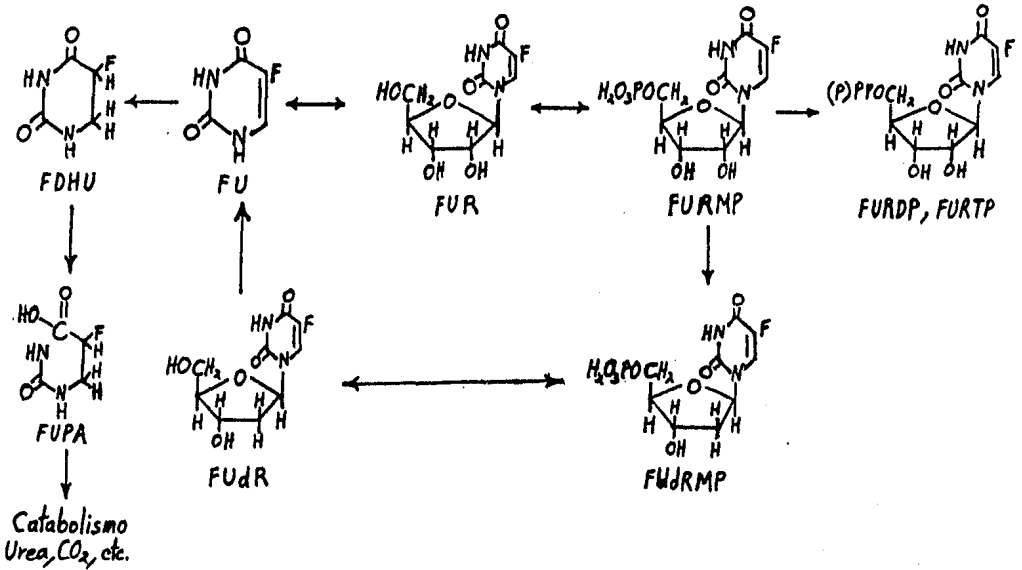


Fig. 8. Metabolismo del 5 fluorouracilo (FU).

También se ha demostrado que el 5 fluorouracilo afecta el metabolismo del ARN, inhibiendo la incorporación del ácido crótico y del uracilo al ARN. Con relación a las rutas catabólicas se advierte que la fluorodesoxiuridina (FUDR) se puede convertir nuevamente en 5 fluorouracilo (FU); y que és

te a su vez puede seguir el camino antes expuesto o convertirse en dihidrofluorouracilo (FDHU); el cual a su vez se convierte en ácido α -fluoro- β -ureidopropiónico, ácido α -fluoroguanidopropiónico y en α -fluoro- β -alanina; descomponiéndose en urea, CO_2 y NH_3 . Estos últimos productos de degradación, haciendo referencia a las pirimidinas fluorinadas, no tienen efecto antitumoral ni son tóxicas a los tejidos normales.

Los puntos de vista recientes (20) sugieren que el desoxiuridilato se combina con la timidilato sintetasa que a dosis adecuada la bloquea por completo; que el 5 fluorouracilo se incorpora al ARN a través de un complejo que contiene la enzima; y que el 5 fluoro-2'-desoxiuridin-5'-monofosfato y el cofactor metileno-tetrahidrofolato agotan la existencia de timidilato, haciendo que cese la síntesis de ADN.

La medición del tritio de las diversas moléculas en cuestión en el estudio emprendido, no logra dosificar los compuestos a los que se ha hecho referencia.

En la literatura relativamente antigua aparece un trabajo en el cual se estudia la distribución del 5 fluorouracilo en primates de la especie Macaca mulatta pero en el líquido cefalorraquídeo (1).. Los cálculos reflejan una distribución similar al de la antipirina (que mide el espacio del agua total), y aunque el estudio se haya hecho en un buen número de animales, supone una distribución en todo el

espacio del agua. El estudio denota una distribución aparentemente idéntica en todos los animales. Es sorprendente ver que el 91% de la dosis original de 5 fluorouracilo se había salido del compartimento plasmático (espacio intravascular) a los 0.4 minutos después de una infusión intravenosa, y el 98% a los 56.4 minutos.

El estudio realizado en este trabajo muestra que existe una fase de caída rápida e de dilución rápida y más tarde una fase lenta, pero en ningún caso una desaparición tan violenta. Los apoyos fuertes se encuentran en una medición muy rigurosa con el empleo del método de estándar interno y el análisis bicompartimental en paralelo.

Las variaciones de difusión como características casi individuales se han reflejado en estudios bastante recientes pero a nivel de cultivo de tejidos.

En una publicación de 1981, Schilsky y colaboradores (16) investigaron otro agente cancericida, el metotrexate análogo del ácido fólico, y se estudiaron las características del transporte en las membranas, descubriéndose posibles alteraciones de éste, que se han reconocido como mecanismos bien establecidos de resistencia al metotrexate en tumores experimentales (4) (17) (18).

Las diferencias de difusión o entrada a células de cultivo de diversas estirpes han sido establecidas para el 5

fluorouracilo por Wendy L. Washtien (1984), quien compara células de tumores gastrointestinales humanos cultivadas denominadas Hutu 80 y HT29, demostrando que se repiten en un sistema de cultivo de tejidos concentraciones intracelulares muy diferentes a largo plazo.

El estudio emprendido en este trabajo define características de distribución de carácter individual, ya que las concentraciones a lo largo de 120 minutos fueron reproducibles en el mismo perro en diversas ocasiones, como reflejo de dilución pero con variaciones francamente notorias entre diversos animales.

Se encuentran fuera de lugar consideraciones exhaustivas sobre todas las posibilidades en juego desde el punto de vista biológico; sí es muy notable la existencia de una respuesta de tipo individual a la sustancia estudiada. El tratar en este momento de afirmar si el 5 fluorouracilo llega o no al espacio intracelular y si se incorpora o no al camino metabólico que ha de bloquear la timidilato sintetasa es prematuro. Puede pensarse desde luego que en los casos en que el espacio de dilución fue del 100% del agua total, sea muy probable que el 5 fluorouracilo haya entrado a las células. En los casos en que se diluyó la droga sólo en el 65% u 85% del agua total, se puede plantear la posibilidad de que no hubiese entrado al espacio intracelular o más bien a parte de dicho espacio, y se podría concluir que es-

ta fuese una explicación de los fracasos terapéuticos del 5 fluorouracilo en el tratamiento de pacientes con tumores malignos.

Puede decirse que el método empleado en el presente estudio tiene atractivos para ensayarse de antemano en los casos tumorales que se pretendiesen tratar con 5 fluorouracilo, en otras palabras, establecer anticipadamente las posibilidades de éxito de la droga en cada paciente, evitando la toxicidad de los tejidos normales sensibles (como el tejido hematopoyético) cuando la probabilidad de éxito sea escasa.

Con respecto al estudio colateral sobre la penetración o no del 5 fluorouracilo a los eritrocitos, se puede mencionar que:

- a).- La droga penetró a los glóbulos rojos en siete de los animales estudiados.
- b).- En el perro que tuvo un volumen de dilución de sólo el 65% del agua total, el 5 fluorouracilo no penetró.
- c).- Hubo tres casos en los que la droga incluso se concentró, de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 4. Resultado del estudio en sangre total.

Estudio No.	Espacio de Dilución (%)	Resultado
5	85	penetró
6	65	no penetró
7	100	penetró
8	100	concentró
9	88	penetró
10	100	concentró
11	100	concentró
12	100	penetró

El estudio hecho en sangre abarcó a todos los animales experimentales, aunque se inició a partir del experimento 5. En realidad no hubo manera de hacer observaciones repetidas en la misma sangre, pero se concentraron los 3 diferentes resultados ya mencionados.

VI.- CONCLUSIONES.

La exploración del espacio de dilución del 5 fluorouracilo en perros, realizada en forma dinámica y con ayuda de un modelo matemático bicompartimental para fines comparativos, llevó a las siguientes conclusiones:

- 1.- En el tiempo de observación, los primeros 120 minutos postinyección intravenosa, el espacio de dilución del 5 fluorouracilo correspondió aparentemente en la mayor parte de los animales explorados, al 100% del espacio del agua total.
- 2.- En algunos animales el espacio de dilución fue menor del 100%, observándose un caso con el 65% del espacio del agua con 4 repeticiones en el mismo animal, confirmando la repetitividad, y otro con el 85% del espacio del agua total.
- 3.- En vista de que se observaron algunas oscilaciones de la concentración frente al modelo matemático, se consideró la posibilidad de descomposición del 5 fluorouracilo en diversos metabolitos con dinámica propia en el intervalo de los primeros 120 minutos explorados, y que requieren de identificación precisa en estudios futuros.
- 4.- En vista de que el 5 fluorouracilo es una sustancia empleada como cancericida de resultados variables, se plantea una metodología exploradora que a largo plazo pudiese

se llegar a pronosticar si una droga es útil o no en la terapia de pacientes neoplásicos.

- 5.- Se plantea con la metodología empleada, un procedimiento de exploración de sinnúmero de sustancias en su comportamiento frente a diversas membranas vivas. En otras palabras, se confirma un carácter metabólico individual a algunas sustancias. No es posible en este momento caracterizar las sustancias que puedan presentar comportamientos particulares en cada sujeto. La observación original partió de una dinámica propia para la creatinina exógena, que es un metabolito natural propio de los seres vivos, comprobable desde formas relativamente simples en la escala biológica.
- 6.- El carácter propio de tipo metabólico a nivel de membrana, no es la única explicación de respuestas desiguales de tipo metabólico a nivel de reproducción celular, ya que la literatura consultada muestra variaciones cuantitativas relacionables con el tiempo en el metabolismo de sustancias como el 5 fluorouracilo.
- 7.- Hasta el momento no es posible conocer espacios que concentren el 5 fluorouracilo o señalar tejidos que en determinados sujetos e casos lo hagan, aunque teóricamente se debe de reconocer esta posibilidad. Para averiguarlo se podría incorporar en la molécula del fluorouracilo el γ emisor ^{18}F , que se visualizaría por medio de los gam-

mágrafos que son aparatos de uso corriente.

- 8.- En el terreno de aplicación clínica se señala la posibilidad de correlacionar buenos resultados terapéuticos con patrones de dilución definidos, que permitan a media no plazo seleccionar los casos de pacientes que puedan responder favorablemente al 5 fluorouracilo como agente terapéutico.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bourke, R.S., West, C.R., Chheda, G. and Tower, D.B. (1973). Kinetics of entry and distribution of 5-fluorouracil in cerebrospinal fluid and brain following intravenous injection in a primate. *Cancer Res.*, 33: 1735-1746.
- 2.- Clarkson, B., O'Conner, A., Winston, L. and Hutchison, D. (1965). The physiologic disposition of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 5:581-610.
- 3.- Ceaser, G.M., Dunning, W.F. and Greer, S. (1972). Role of catabolism in pyrimidine utilization for nucleic acid synthesis in vivo. *Cancer Res.*, 32: 390-397.
- 4.- Chaudhuri, N.K., Mukherjee, K.L. and Heidelberger, C. (1958). Studies on fluorinated pyrimidines VII. The degradative pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 1: 328-341.
- 5.- Eberstadt, P.L. (1974). Total body water determination with a practical internal standard method. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, 1: 191-195.
- 6.- Eberstadt, P.L. and Gee, J.J. (1977). The distribution of body water. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, 4(2): 144-145.
- 7.- Eberstadt, P.L. and Liverant, J. (1982). Clearance of

labelled creatinine. Proceedings of the Third World Congress on Nuclear Medicine and Biology, Vol. 1: 561-564.

- 8.- Eberstadt, P.L. (1984). Comparative study of glomerular filtration rate with diverse labelled agents, Int. Urol. Nephrol., 16(1): 3-11.
- 9.- Edelman, I.S. and Leibman, J. (1959). Anatomy of body water and electrolytes. Am. J. Med., 27: 256-277.
- 10.- Heidelberger, C. (1965). "Fluorinated pyrimidines" in progress in nucleic acid research. Vol 14. ed. by J. N. Davidson and W.E. Cohen, New York Academic Press. pp. 1-50.
- 11.- Lemen, H.M., Medzen, P.J., Mirchandani, R., Farmer, D.A. and Athans, J. (1963). Decreased intoxication by fluorouracil when slowly administered in glucose. J. Am. Med. Assoc., 185: 1012-1016.
- 12.- Mukherjee, K.L. and Heidelberger, C. (1960). Studies on fluorinated pyrimidines. IX. The degradation of 5-fluorouracil-6-C¹⁴. J. Biol. Chem., 235: 433-437.
- 13.- Mukherjee, K.L., Boshar, J., Wentland, D., Ansfield, F. J. and Heidelberger, C. (1963). Studies on fluorinated pyrimidines. XVI. Metabolism of 5-fluorouracil-2-C¹⁴

- and 5-fluoro-2'-deoxyuridine-2-C¹⁴ in cancer patients. *Cancer Res.*, 23: 49-66.
- 14.- Mukherjee, K.L., Curreri, A.R., Javid, M. and Heidelberger, C. (1963). Studies on fluorinated pyrimidines XVII. Tissue distribution of 5-fluorouracil-2-C¹⁴ and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in cancer patients. *Cancer Res.*, 23: 67-77.
- 15.- Pratt, W.B. and Rudden, R.W. (1979). The anticancer drugs. Oxford University Press, New York. 323 pp.
- 16.- Schilsky, R.L., Bailey, B.D. and Chabner, B.A. (1981). Characteristics of membrane transport of methotrexate by cultured human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, 30(12): 1537-1542.
- 17.- Siretnak, F.M., Kurita, S. and Hutchison, D. (1968). On the nature of a transport alteration determining resistance to amethopterin in the L1210 Leukemia. *Cancer Res.*, 28: 75-80.
- 18.- Siretnak, F.M. and Densbach, R.C. (1976). Kinetic correlates of methotrexate transport and therapeutic responsiveness in murine tumors. *Cancer Res.*, 36: 1151-1158.
- 19.- Valdivieso, M., et al. (1976). Clinical evaluation of

fterafur (pyrimidine-deoxyribose N₁-2'-furanidyl-5-flu
erouracil). Cancer Res., 36: 1821-1824.

- 20.- Washtien, W.L. (1984). Comparison of 5-fluorouracil me
tabolism in two human gastrointestinal tumor cell lines.
Cancer Res., 44: 909-914.