



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

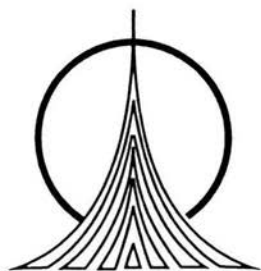
ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA COMBINACIÓN
DE CISPLATINO Y MIFEPRISTONA EN TUMORES DE
CÉRVIX, DESARROLLADOS EN RATONES ATÍMICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
LUZ ANGELICA LÓPEZ FLORES

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A MI FAMILIA

Por brindarme un apoyo constante y por estar ahí siempre que los
necesito.

Dora Estela, gracias por hacerme fuerte, por enseñarme a trabajar y a
saber que puedo levantarme de mis errores.

José Epifanio, te agradezco todo este tiempo de esfuerzo, por sacarnos
adelante a mí y al resto de la familia.

Mónica, gracias por ayudarme a crecer, por darme tanto cariño y
confianza.

Rafael y Ricardo, gracias por enseñarme que la vida tiene diferentes
matices.

A MIS AMIGOS

Catalina Ramírez, Mireya García, Irais Huerta,
Iker Said Escalona, Iván Pavón, quienes me ayudaron a crear durante toda
la carrera este momento lleno de felicidad, esperanza y fe.

A MI DIRECTORA DE TESIS

Dra. Patricia García, gracias por su apoyo desinteresado,
por la aportación de sus conocimientos y por el tiempo prestado en la
realización de este trabajo.

A MIS SINODALES

Dra. Leticia Cruz, Dra. Patricia García, Dra. Raquel Retana,
Q.F.B. Graciela Rojas, Q.F.B. Claudia Fabiola Martínez,
por su tiempo y valiosas aportaciones.

ÍNDICE

Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes Teóricos.....	4
A. Generalidades de Cáncer.....	4
1. Definición de Cáncer.....	4
2. Carcinogénesis.....	4
3. Tipos de Cáncer.....	6
a. Cáncer Cérvico Uterino.....	6
b. Tratamiento del Cáncer Cervical.....	7
B. Farmacología.....	8
1. Farmacodinamia.....	8
2. Farmacocinética.....	9
C. Quimioterapia.....	11
1. Principios de la quimioterapia combinada.....	14
2. Mifepristona.....	15
a. Características Fisicoquímicas.....	15
b. Mecanismo de Acción.....	16
c. Características Farmacocinéticas.....	16
d. Toxicidad.....	17
e. Aplicaciones terapéuticas y perspectivas.....	17
3. Cisplatino.....	17
a. Características Fisicoquímicas.....	18
b. Mecanismo de acción.....	20
c. Características Farmacocinéticas.....	22
d. Aplicaciones Terapéuticas.....	23
e. Toxicidad.....	24

D. Determinación Cromatográfica.....	24
1. Generalidades de Cromatografía.....	24
a. Clasificación.....	25
b. Esquema de un cromatógrafo.....	26
2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	27
3. Preparación de la Muestra.....	28
a. Extracción.....	29
b. Derivatización.....	29
4. Validación de Métodos.....	30
III. Planteamiento del Problema.....	32
IV. Objetivos.....	34
V. Hipótesis.....	35
VI. Metodología.....	36
VII. Resultados.....	44
VIII. Análisis de resultados.....	62
IX. Conclusiones.....	71
XI. Referencias Bibliográficas.....	72

RESUMEN

La quimioterapia coadyuvante es el método que complementa sistemáticamente el tratamiento local del cáncer cervico uterino, al respecto se sabe que el cisplatino se considera el fármaco de elección al ofrecer grandes ventajas clínicas; sin embargo, en muchas ocasiones, su uso es restringido por sus serios efectos colaterales, aunado a esto se ha observado que con el uso único de este fármaco se presenta un rápido desarrollo de resistencia. Por todo lo anterior resulta valido enfocar los estudios a la búsqueda de nuevos fármacos capaces de potenciar el efecto antiproliferativo de cisplatino sin incrementar sus efectos colaterales. En el presente trabajo se investigó la influencia de la mifepristona sobre la actividad antitumoral de cisplatino, en ratones atímicos portadores de tumores originados a partir de la línea celular de cáncer cérvico uterino (HeLa). Como primer objetivo se desarrolló y validó un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para determinar las concentraciones de cisplatino en micromuestras plasmáticas, obteniéndose un método sencillo de realizar y que cumple con los parámetros de validación. Como segundo objetivo se empleo un antiprogestageno como posible fármaco capaz de potenciar la actividad antitumoral del cisplatino, los resultados demuestran que al administrar previamente el antiprogestageno a una dosis de 2 mg/Kg/día se presenta una disminución del volumen relativo tumoral con respecto al grupo tratado con cisplatino solamente. Así también, al valorar el comportamiento sistémico de cisplatino en combinación con mifepristona, se mostró un incremento en los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva (ABC) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$), a su vez que una disminución en el valor de depuración (Cl), lo que nos lleva a sugerir que el aumento en la concentración de cisplatino a nivel plasmático, puede provocar un incremento del efecto antitumoral. Cuado se estudio la tolerancia de la combinación de fármacos se observó una disminución de la toxicidad, en comparación a los grupos controles, evaluado por una mayor recuperación del peso corporal. Finalmente estos datos proponen la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que incorporen a la mifepristona en combinación con cisplatino, con la finalidad de incrementar su efecto farmacológico y disminuir sus efectos secundarios en pacientes tratados con dicho antineoplásico.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu), constituye un problema de salud pública importante en nuestro país, al presentar el más alto índice de mortalidad con relación a los padecimientos ginecológicos; estadísticamente se ha demostrado que ocupa más del 30% de todos los cánceres, lo cual revela que es la causa más común de neoplasias malignas, asociada a una infección ginecológica previa por el VPH (Virus del Papiloma Humano)^{1,2}. En la actualidad es considerado como una de las neoplasias potencialmente curables siempre y cuando sea diagnosticado en una etapa temprana; desafortunadamente en la mayoría de los casos es detectado en estadios avanzados en donde el tratamiento local no logra erradicarlo, además de presentar recurrencia del tumor en los próximos años; por tal motivo, aunado a éste se recurre a un enfoque sistémico como la quimioterapia, para un tratamiento eficaz del cáncer, logrando que el pronóstico mejore gracias al empleo combinado de tratamientos.

De acuerdo con la mayoría de los estudios al respecto, el cisplatino ha mostrado ser, un agente efectivo en el tratamiento del cáncer cérvico uterino que se emplea habitualmente solo o en combinación con otros fármacos u otros tratamientos. En relación a esto, cinco ensayos clínicos aleatorios en fase III, han demostrado que existe una ventaja en cuanto a la supervivencia en general, cuando se emplea una terapia a base de cisplatino administrada conjuntamente con radioterapia³⁻⁷, los pacientes presentaron una progresión media que se incrementa mediante el empleo de la quimioterapia, o de la combinación de fármacos en pacientes con tumores resistentes al primer medicamento aplicado, llegando a ser extremadamente efectivo. Sin embargo, son bien conocidos los efectos adversos que produce este antineoplásico, como la nefrotoxicidad y neurotoxicidad^{8,9}, de tal manera que en muchos de los casos es restringido en el tratamiento clínico.

Sumado a lo anterior, se ha advertido que con el uso único del cisplatino se presenta un rápido desarrollo de resistencia. Los mecanismos de resistencia que presenta se consideran como procesos multifactoriales, dentro de los cuales se encuentra; la participación de una proteína de membrana conocida como MRP(multidrug resistance protein) quien promueve la disminución del contenido intracelular de cisplatino, mediante alteraciones en el metabolismo celular como el incremento del contenido de glutatión y de

la metalotioneína, los cuales se unen al cisplatino, transportándolo fuera de la célula, impidiendo la formación de aductos del platino¹⁰. A su vez se presenta la sobre-expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, como otro mecanismo que participa en la resistencia, al prevenir la muerte celular apoptótica mediada por la proteína Bax¹¹.

Por otra parte, dentro de la quimioterapia se ha promovido la integración de regímenes medicamentosos que utilizan una gran variedad de agentes hormonales; al respecto se conoce la incorporación de los antiprogéstágenos, como la mifepristona, en el tratamiento de algunos cánceres dependiente de hormonas^{12,13}. La mifepristona (RU-486) es una hormona sintética antagonista de la unión a receptores progéstágenos, pero no de receptores estrogénicos. Clínicamente, es bien empleada en ensayos para la regulación menstrual, inducción de labor de parto, y tratamiento de cáncer de mama y meningiomas. Además ha demostrado ser un fármaco con actividad antineoplásica en líneas celulares de cáncer epitelial ovárico *in vitro*¹⁴; en donde la disminución de la proliferación se presenta de un modo tiempo y dosis-dependiente. Así también se ha observado que la mifepristona aumenta la quimiosensibilidad de líneas celulares de cáncer de ovario fármaco-resistentes a cisplatino; en este ensayo se advierte que el antiprogéstágeno revierte la resistencia a cisplatino posiblemente a través de la regulación de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax al presentarse una disminución de la expresión de la proteína Bcl-2 de un 23.8% a un 19.39%, mientras que la expresión de Bax se incrementa de un 12.75% a un 25.59%^{15,16}.

En cuanto a la incorporación de RU-486, en el tratamiento clínico de cáncer cérvico uterino es poco lo que se conoce; por tal motivo, en estudios previos, *in vitro*, se determinó el potencial citotóxico de RU-486 sobre una línea celular de CaCu¹⁷, observando que cuando la línea celular HeLa es expuesta concurrentemente a RU-486 y cisplatino, se presenta un evidente sinergismo y aunque no se conocen claramente los mecanismos, los resultados sugieren que uno de estos es mediado a través de la alteración en la expresión de la proteína Bcl-2. Así también, en previos reportes se establece que las hormonas esteroides juegan un papel importante en el control de la proliferación de células de cérvix; estos datos proponen la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que incorporen al RU-486 en combinación con cisplatino, lo que redundara posiblemente en una mejor calidad de vida para el paciente oncológico.

II. ANTECEDENTES TEÓRICOS

A. Generalidades de Cáncer

El cáncer es un término general que abarca una gran variedad de situaciones patológicas distintas, algunas de ellas son de escasa importancia, pero la mayoría son graves y llegan a ocasionar la muerte; este padecimiento representa un problema de salud pública importante en nuestro país, teniendo el segundo lugar en incidencia y mortalidad de acuerdo al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México².

1. DEFINICIÓN DE CÁNCER

El cáncer se caracteriza por la presencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y de proliferación, como consecuencias de anomalías genéticas-proteínicas. De tal manera, que se presenta como una masa creciente de células anormales que derivan de una única célula normal como resultado de una expansión clonal; invade los tejidos normales circundantes y se extiende a través del cuerpo por vía linfática o por la sangre mediante el proceso llamado metástasis¹⁸.

Un tumor se considera canceroso solo si es maligno, eso implica, si sus células tienen la capacidad de invadir tejido circundante y formar tumores secundarios o metástasis en otros lugares del cuerpo, hay que tener en cuenta que un cáncer es más difícil de erradicar cuanto mayor sea su formación de metástasis¹⁸; sin embargo, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única se dice que el tumor es benigno.

2. CARCINOGENÉISIS

EL crecimiento del cáncer se conoce como carcinogénesis o tumorigénesis y se considera un proceso múltiple; involucra a las células cancerosas que surgen por daños en el ADN, las cuales producen aberraciones en su división y diferenciación provocando un aumento en su proliferación y supervivencia¹⁹. Sin embargo, es bien conocido que el factor

genético desempeña un papel poco importante en la aparición de esta enfermedad, siendo los agentes externos causantes de la mayor parte de los cánceres humanos, principalmente al estar expuestos a algunos tipos de radiación, virus, ciertas infecciones bacterianas y parasitarias o agentes químicos, necesitando solo una breve exposición, de horas o días, a la forma activa del carcinógeno²⁰.

Los agentes exógenos dañan el ADN de los cromosomas causando mutaciones en los genes de algunas células. Se han sugerido varios mecanismos por los cuales dichas mutaciones pueden dar lugar al cáncer, uno de ellos viene representado por los denominados protooncogenes, tipos de genes normalmente presentes en las células y que son responsables de algunos aspectos del crecimiento y de la división celular, una mutación en alguno de dichos genes puede convertirlo en oncogen, es decir, un gen capaz de inducir una división descontrolada al codificar factores de crecimiento y factores mitogénicos, y por lo tanto, estimular una transformación de las células normales en cancerosas²¹. Otro posible mecanismo viene dado por los factores supresores de tumor, se cree que estos factores actúan normalmente inhibiendo la expresión de los oncogenes, en ausencia de un factor supresor, el oncogén no será suprimido, sino que se activará y potencialmente podrá causar cáncer.

Los procesos proliferativos están generalmente relacionados con los procesos antiproliferativos, lo que da lugar a un equilibrio; de tal manera que la proliferación esta controlada por un complejo de genes supresores tumorales, que actúan en el ciclo celular, como son la proteína p53 o la proteína del producto del gen del retinoblasto Rb. La proteína p53 puede tener un papel crucial en la respuesta celular al daño o mutación del ADN, generalmente secuestra células antes del proceso de replicación para permitir que tenga lugar la reparación y también inicia la apoptosis (muerte programada de células viejas o dañadas). La pérdida de la función normal de p53, provocada por la exposición a diversos agentes causantes de cáncer, permite al ADN defectuoso replicarse y con esto favorecer la supervivencia de las células defectuosas, lo que finalmente lleva a la presencia de cáncer¹⁸.

3. TIPOS DE CÁNCER

Existen dos grandes tipos de cánceres; el primero y el más frecuente se denomina carcinoma, estos se originan en el epitelio, un tejido que recubre la superficie del cuerpo y las membranas de los órganos huecos. Las localizaciones más frecuentes de aparición de los carcinomas son la piel, el estómago, el intestino grueso, los conductos de las mamas y el cáncer de cuello uterino. El segundo gran grupo, menos frecuente, se origina en los tejidos sólidos como el músculo, huesos, ganglios linfáticos, vasos sanguíneos y tejido conectivo; a los cuales se les denomina sarcomas.

a. Cáncer Cérvico Uterino

El cáncer del cuello de la matriz conocido técnicamente como Carcinoma Cérvico Uterino o simplemente como CaCu; es la causa más importante de tumores malignos en nuestro país, al ocupar más del 30% de todos los cánceres; siendo la epidermoide la variedad más común histológicamente, al constituir el 75% de los casos². Actualmente ocupa en México el primer lugar de mortalidad en mujeres en edad reproductiva de acuerdo a la Secretaría de Salud,

Este cáncer se origina en la mucosa del cérvix, y en esta etapa llamada preinvasora o de carcinoma in situ puede durar varios años, una vez que se ha roto la membrana basal de la mucosa, bastan solo de 2 a 5 años para que el cáncer termine con la vida de la que lo porta¹⁹. El CaCu, es un ejemplo característico de cáncer causado por virus oncogénicos; el factor etiológico más importante de riesgo de contraer carcinoma cervical son ciertos tipos del virus del papiloma humano (HPV)²², el cual se transmite por contacto sexual, es tan estrecha la asociación que diversos autores consideran al CaCu como la infección venérea de nuestros tiempos. Cabe mencionar que el VPH, tiene como característica que su replicación solo se lleva a cabo en células que estén en procesos de diferenciación, por lo que su cultivo hasta el momento es limitado. Sin embargo, el cáncer de cérvix se puede prevenir cuando se detectan los primeros cambios localizados en el epitelio cervical, mediante el programa de chequeo, conocido como prueba de Papanicolau, en donde se detectan cambios citológicos²³.

b. Tratamiento del Cáncer Cervical

Los tratamientos para cáncer cérvico uterino dependerán de la etapa en que se encuentra la enfermedad, el tamaño del tumor, la edad y estado de salud en general. En base a estos aspectos se sugiere un programa de observación o si procede con tratamientos sobre el cérvix como crioterapia, proceso mediante el cual el ginecólogo "mata" las células anormales congelándolas con nitrógeno líquido, o el uso de láser o escisión con electrocauterio en los que se utilizan fuentes de energía para retirar o "quemar" el tejido anormal. En otros casos puede optar por la llamada conización que remueve una "cuña" o cono del cérvix mediante cirugía. Hasta aquí los tratamientos son locales y efectivos para la enfermedad en etapa temprana y de volumen pequeño. En casos más avanzados se recurre a la extirpación total del cérvix, mediante cirugía y finalmente el cáncer que ha llegado a etapas más avanzadas requiere de radioterapia (rayos X) o quimioterapia, tratamiento especializado que requieren el consumo de medicamentos específicos en oncología^{24,25}.

En relación a la terapia con fármacos; dependiendo en el estadio en el que se encuentre el CaCu se emplean el topotecan, 5-FU, compuestos de platino, vinblastine, doxorubicin y metotrexate entre otros. Diversos ensayos clínicos, han mostrado que existe una ventaja en cuanto a la supervivencia en general, cuando se emplea una terapia a base de cisplatino administrada conjuntamente con radioterapia^{4,5} y otros fármacos. A pesar de que los ensayos varían en algo dependiendo de la etapa de la enfermedad, dosis de la radiación y los horarios de cisplatino y radiación, o cisplatino y otros medicamentos, todos han mostrado de manera significativa una marcada ventaja de este enfoque de modalidad combinada. El riesgo de mortalidad por cáncer cervical disminuyó en un 30% para quedar en 50% mediante el uso concurrente de estos tratamientos. Sobre la base de estos resultados, se debe tomar seriamente en consideración la incorporación del uso de la quimioterapia a base de cisplatino en combinación con otros fármacos y con radioterapia, en aquellas mujeres que requieren de un enfoque sistémico para el tratamiento del cáncer cervical⁶.

B. Farmacología

Desde un punto de vista clínico y farmacológico, es importante contar con agentes antineoplásicos eficaces que no produzcan al mismo tiempo riesgos innecesarios y tengan un mínimo de efectos secundarios. De tal manera que en la actualidad los esfuerzos para reducir los efectos adversos han sido encaminados hacia el desarrollo de análogos que tienen menos efectos tóxicos, y por otra parte se busca reducir la toxicidad mediante el empleo de otros agentes. Hay que tener en cuenta, que la actividad de estos fármacos al igual que la de cualquier otro, es evaluada por la farmacología, al ser la ciencia que estudia la interacción fármaco-individuo, desde diversos enfoques, ya que comprende diversas orientaciones o especialidades como son la farmacocinética, farmacodinamia y toxicología.

1. FARMACODINAMIA

La fase farmacodinámica involucra la interacción entre el principio activo y el organismo al cual fue administrado, es decir, se dedica al estudio de las acciones de los efectos de las sustancias químicas, a todos los niveles de organización de la materia viviente, al elucidar los mecanismos de acción²⁶. Por lo cual es necesario entender que los fármacos con actividad citotóxica tienen como sitios de acción diversos componentes celulares incluido el DNA. Se ha observado que con frecuencia hay una relación entre un efecto farmacológico medible y los niveles plasmáticos (concentraciones) del fármaco. Así mismo en esta fase, la concentración del principio activo en la biofase o sitio de acción del fármaco es el parámetro principal de la respuesta.

Como ya se ha dicho la farmacodinamia estudia lo que el fármaco provoca en el organismo y dentro de las interacciones de este grupo se destacan; el sinergismo, el cual es la facilitación de la respuesta farmacológica por el uso concomitante de dos o más fármacos y se conocen dos tipos, sinergismo aditivo y sinergismo con potenciación. Otro tipo de interacción es el agonismo el cual se presenta cuando un fármaco tiene actividad y afinidad por un receptor. Así también, se presenta el antagonismo, clásicamente se divide

en: antagonismo farmacológico, donde el fármaco dependiendo de la dosis disminuye o elimina el efecto de una agonista, al impedir la formación del complejo fármaco-receptor (se conocen el antagonismo competitivo y el no competitivo); el antagonismo fisiológico, éste se presenta con fármacos que tienen acciones opuestas actuando a través de mecanismos y receptores distintos; y finalmente el antagonismo químico, cuando los fármacos administrados reaccionan químicamente²⁷.

2. FARMACOCINÉTICA

Para que un fármaco llegue al sitio de receptor o de acción, a partir del lugar en que fue depositado, se requiere que éste sea transportado a través del organismo. La evolución temporal del fármaco en el organismo se puede esquematizar en cuatro etapas, cuyo desarrollo en vivo es prácticamente simultáneo: absorción, distribución, biotransformación y excreción (proceso ADBE)²⁸.

Se denomina absorción al paso de un fármaco desde su sitio de aplicación hacia la sangre, ya sea por difusión pasiva o por transporte activo, donde el grado de solubilidad es importante²⁷; está puede ser por vía indirecta (vía oral, bucal, rectal, respiratoria, cutánea, etc.) o por vía directa (subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, etc.). El fármaco, una vez absorbido hacia la circulación generalmente se distribuye pasando a través de varias membranas biológicas y uniéndose a diversos biopolímeros. Sin embargo, antes de que pueda actuar en los receptores específicos, debe salir de la sangre y la velocidad con la cual el fármaco sale de la sangre y llega a los sitios de los receptores extravasculares, depende de cierto número de factores farmacológicos y fisiológicos como son el gradiente de concentración, el flujo sanguíneo, la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas y permeabilidad de los capilares.

Normalmente la biotransformación es un factor limitante de la duración de acción de los fármacos y se entiende por biotransformación a los cambios bioquímicos verificados en el organismo, mediante los cuales las sustancias extrañas se convierten en otras más ionizadas, más polares, más hidrosolubles y más fácilmente eliminables que la sustancia

original; esto provoca activación o inactivación del fármaco²⁷. La biotransformación de los fármacos tiene lugar en dos etapas habitualmente de forma secuencial, en la fase I, las reacciones son oxidación, reducción, hidrólisis y descarboxilación, y en la fase II únicamente ocurren reacciones de síntesis o conjugación. Estas reacciones son realizadas por el sistema microsomal, por las mitocondrias, enzimas solubles, lisosomas y por la flora intestinal. Finalmente una forma obvia de terminación de sus acciones farmacológicas se presenta con el fenómeno de excreción, en donde se da el paso de un fármaco del medio interno al externo ya sea por vía renal, biliar, pulmonar, salival, gástrica, intestinal, cutánea, lagrimal y mamaria²⁷. Las principales vías son la renal ya que los fármacos no unidos ingresan en el filtrado glomerular, el pH urinario influye sobre la disolución interviniendo en el proceso de reabsorción; también la excreción biliar la cual es secretada por la bilis hacia el duodeno; sin embargo, se puede presentar reabsorción.

El proceso ADBE forma parte de una disciplina denominada farmacocinética, la cual se define como el estudio de la evolución temporal de concentraciones y cantidades de fármaco y sus metabolitos en fluidos, tejidos y excretas biológicas, así como de la respuesta farmacológica observada y construye modelos matemáticos para interpretar los datos obtenidos, es entonces inoportuno designar de esta manera a un simple estudio de niveles plasmáticos o urinarios en función del tiempo. Sin embargo, se ha demostrado con estudios *in vivo*, en animales y en humanos tanto sanos como enfermos, que existe una relación evidente aunque compleja entre la cantidad de fármaco en el organismo y la respuesta farmacológica obtenida. El tipo de interacción que existe entre la concentración plasmática de un fármaco y una respuesta dada, esta determinada generalmente por dos factores, el primero es la relación directa o indirecta entre concentración plasmática del principio activo y la respuesta farmacológica, y la segunda es la reversibilidad de la unión del fármaco con el sitio de acción o receptor^{26,27}.

El análisis matemático de los datos experimentales mediante el calculo de parámetros farmacocinéticos permite describir la evolución del fármaco *in vivo* (proceso ADBE) y de las respuestas biológicas correspondientes. De éstos los mas importantes son: A) depuración (Cl) que nos indica el volumen del compartimiento (habitualmente

plasmático) del cual el fármaco es totalmente removido (por biotransformación o excreción), por unidad de tiempo; B) volumen de distribución (V_d) el cual es una constante de proporcionalidad que relaciona la concentración de fármaco en sangre o plasma con la cantidad total de fármaco en el cuerpo, es decir mide el espacio disponible en el cuerpo para contener el fármaco, usualmente no tiene un significado fisiológico y no se refiere a un volumen real; C) área bajo la curva (ABC) que describe la concentración del fármaco en la circulación general en función del tiempo, y se utiliza para describir la biodisponibilidad de un fármaco referente a la fracción de dosis administrada que alcanza inalterada la circulación general; D) vida media ($t_{1/2}$) es un periodo de semieliminación, al ser el tiempo que necesita la concentración plasmática o la cantidad del fármaco en el cuerpo para disminuir a la mitad.

La farmacocinética de los agentes antitumorales puede ser compleja; la citotoxicidad es proporcional a la exposición total (área bajo la curva) y no a la concentración plasmática del fármaco. El fármaco tiene que penetrar primero en las células tumorales individuales y entonces interactúa con su diana molecular¹⁸. Como esta interacción es a menudo reversible, al menos inicialmente debe mantenerse una concentración citotóxica en este momento. Además el número de interacciones individuales entre un fármaco y las moléculas diana requeridas para matar a una única célula puede ser enorme; por ejemplo, se estima que deben unirse un millón de moléculas de cisplatino al ADN de una única célula para matarla.

C. Quimioterapia

La farmacología anticancerosa constituye un método terapéutico muy útil que coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia, a mejorar el pronóstico de la enfermedad. En la actualidad pueden curarse cerca del 50% de los pacientes de cáncer, y la quimioterapia contribuye a la curación en cerca de 17% de ellos. La quimioterapia tiene como finalidad la destrucción de las células neoplásicas de forma general, ya sea de forma

sistémica y con esto nos referimos a una distribución no específica de la droga en el organismo, o bien, mediante la quimioterapia dirigida en donde se focaliza la acción terapéutica del fármaco en el sitio del tumor²⁸. Por tal motivo el comprender los mecanismos de acción de los fármacos antitumorales, nos permite actuar efectivamente sobre muchas formas de cáncer, al mejorar la especificidad de los agentes quimioteráuticos.

Para comprender el cáncer e idear procedimientos racionales para tratarlo, resulta esencial conocer a fondo los procesos básicos de la proliferación celular, para el empleo adecuado de la generación actual de antineoplásicos. La proliferación neoplásica se caracteriza por la aparición de clonas celulares que se reproducen con aparente insensibilidad a los mecanismos de regulación del crecimiento celular; este fenómeno puede aprovecharse, en la práctica, para mejorar la especificidad de los agentes quimioteráuticos, al conocer los mecanismos de acción de los fármacos antitumorales.

Todas las células que se reproducen con síntesis de ácido desoxirribonucleico pasan por una serie de fases que se repiten periódicamente y reciben el nombre de ciclo celular. Dicho ciclo puede describirse en la forma siguiente (figura 1.): A) Fase presintética (G_1), intervalo comprendido entre la terminación de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN; hay células en período de latencia que no se preparan para la reproducción celular y se encuentran en una subfase de G_1 , denominada G_0 ; B) Fase S, en que tiene lugar la síntesis de ADN que dura 6-8 horas; C) Fase postsintética (G_2), en que tiene lugar la síntesis de ARN y proteínas, pero no de ADN, dura dos horas; D) Fase M, o período de mitosis, subdividido en profase, metafase, anafase y telofase, se separan los cromosomas y se reparten entre las dos células hijas. Las células en reposo quedan en fase G_1 , aunque también se han encontrado en fase G_2 ²⁷.

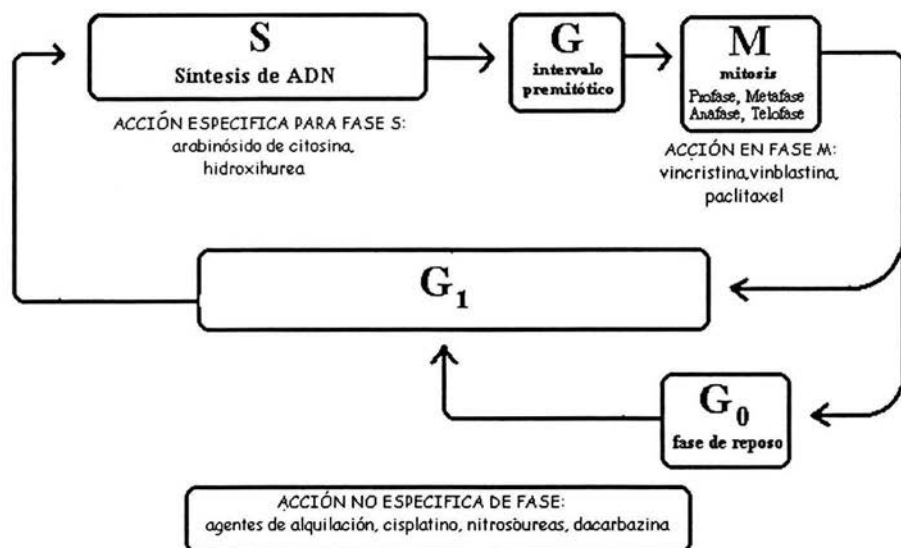


Figura 1. Ciclo celular y su relación con el efecto antitumoral de los fármacos.

La acción de los actuales fármacos antineoplásicos se dirige en su totalidad a frenar la proliferación y/o el crecimiento celular; por ello, muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo, y por consiguiente actúan sólo contra células que están en proceso de división, al actuar sobre la maquinaria reproductora, ya sea sobre el ADN, el ARN o la división mitótica; solo excepcionalmente el objetivo primordial es inhibir la síntesis de proteínas²⁹. Por otra parte, el retraso en el crecimiento y la pérdida celular se correlacionan con factores citológicos y espaciales; en donde la proximidad a los vasos sanguíneos y el acceso al oxígeno son determinantes importantes de la viabilidad celular y del crecimiento y tienen un impacto terapéutico significativo sobre la quimioterapia, ya que la mayoría de los fármacos inciden sobre células en crecimiento.

1. PRINCIPIOS DE LA TERAPIA COMBINADA

A pesar de su amplio uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, la quimioterapia sistémica presenta una serie de inconvenientes lo que produce una disminución en la efectividad de los principios activos utilizados³⁰; ellos son:

- Dificultad de la llegada del fármaco al tumor.
- Baja estabilidad del fármaco en el organismo.
- Alta toxicidad del fármaco en células normales debido a que este tipo de tratamiento es no selectivo.
- Rápido desarrollo de resistencia a los fármacos, un problema que se ha observado con el uso único de cada nuevo fármaco introducido en la clínica.
- La complejidad biológica de los tumores también es una limitante teniendo en cuenta la ubicación de los mismos, su vascularización, el tipo de célula, el tiempo de replicación, etc.

De todo lo anterior se desprende que el tratamiento farmacológico de un tumor rara vez va a responder a un único agente, si se quiere que su acción permanezca un tiempo prolongado y produzcan remisiones significativas o curaciones. Por el contrario, será precisa la acción conjunta de varios fármacos; en ocasiones, esta conjunción cooperativa podrá hacerse al mismo tiempo, pero a menudo se hará de manera sucesiva o en fases, atendiendo a las modificaciones bioquímicas y cinéticas que sufran las células tumorales. La necesidad, pues, de un tratamiento plurifarmacológico es un principio sólidamente incorporado a la terapéutica antineoplásica, merced a sus resultados. Su eficacia será mayor cuando cumpla los siguientes requisitos. A) los fármacos deberán de ser activos frente a más de uno de los tipos de células que forman una población tumoral; B) deberán de actuar por mecanismos bioquímicos diferentes o en fases celulares distintas; C) deberán de poseer toxicidad orgánica diferente, o al menos manifestarse con una secuencia temporal distinta, y D) basta con que sus actividades respectivas se sumen pero es preferible que presenten sinergia o potenciación²⁴.

2. MIFEPRISTONA

La mifepristona, hoy denominada RU 486; es un antagonista del receptor de la progesterona (RP) capaz de bloquear las funciones dependientes de ésta; aunque se generó, en principio, como un antiglucocorticoideo, hasta la fecha se ha utilizado principalmente para promover el termino del embarazo; sin embargo, hoy en día se han incrementado los estudios que sugieren el empleo de los antiprogéstágenos como potenciales fármacos contra el cáncer³¹.

a. Características Fisicoquímicas

La mifepristona es un derivado de la progestina 19-nornorentidrona, que contiene un sustitutivo dimetil-aminofenil en la posición 11 β (figura 2). Es un potente antagonista competitivo de la unión tanto de la progesterona como de los glucocorticoides a sus receptores respectivos^{32,33}. Se han sintetizado muchos otros compuestos con actividad similar y casi todos contienen un grupo 11 β -aromático como en la mifepristona

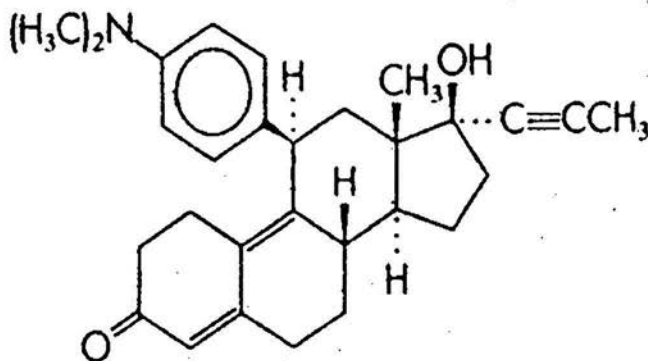


Figura 2. Estructura de la mifepristona.

b. Mecanismo de Acción

En presencia de progestágenos, la mifepristona actúa como antagonista competitivo de los receptores, pero es un agonista parcial con actividad débil cuando se presenta sola; a nivel molecular, lo más importante es su afinidad de unión a los receptores de progesterona (RP) y la interacción del grupo dimetilfenilamino en la posición 11 β con una región específica del receptor.

Aunque no están claros los mecanismos de acción de la mifepristona sobre algunos tipos de cáncer, los informes apuntan a que los antagonistas de la progesterona utilizan la función fisiológica de los RP, que es la inducción de diferenciación, estimulando genes implicados en la muerte celular activa. Sus efectos son antiproliferativos en tumores positivos a RP; sin embargo, tienen también la posibilidad de efectos mitogénicos. De esta manera la mifepristona puede originar efectos sobre cuello uterino, miometrio, tejido endometrial ectópico (esto es, endometriosis) algunos tipos de cáncer mamario y meningiomas, mediante su actividad antiprogestínica³⁴. Por otra parte la mifepristona ha demostrado tener actividad en contra de células de cáncer ovárico en líneas *in vitro*, al estar expuestas a este fármaco, se ha observado un efecto antiproliferativo provocando un arresto de las mismas en las fases Go/G₁ del ciclo celular reduciendo el número de células en fase S³⁵.

c. Características Farmacocinéticas

Posee actividad por vía oral, y muestra biodisponibilidad adecuada por esta vía. Las concentraciones plasmáticas máximas aparecen en el transcurso de varias horas después de la administración, y el fármaco se depura con lentitud; se informa una vida media plasmática de 20 a 40 h³². En el plasma, la mifepristona se une con afinidad alta a la glucoproteína α -ácida, y esto puede contribuir a su vida media prolongada. Los principales metabolitos son los productos mono y didesmetilados, que se cree tienen actividad farmacológica, y en menor grado compuestos hidroxilados. El medicamento sufre metabolismo hepático³⁶ y circulación enterohepática y se encuentra en productos metabólicos, predominantemente en las heces.

d. Toxicidad

Se informa que la mifepristona en dosis única rara vez genera efectos adversos, y éstos incluyen hemorragia copiosa, náusea, vómito, anorexia, dolor abdominal y fatiga. Se han emitido informes de complicaciones cardiovasculares en algunas mujeres que reciben mifepristona y prostaglandinas, pero esas acciones se relacionan con la prostaglandina y disminuyen con el uso de un fármaco por vía oral, como el misoprostol^{32,34}.

e. Aplicaciones Terapéuticas y Perspectivas

Clínicamente, los antagonistas al receptor de progesterona son bien empleados en ensayos para la regulación menstrual, en la inducción de trabajo de parto, y tratamiento de cáncer de mama y meningiomas³⁷. Si bien, la mifepristona está disponible para el tratamiento de dichos padecimientos, en la actualidad se han evaluado otros usos experimentales o potenciales de este fármaco, las cuales comprenden, el tratamiento de endometriosis, y en la disminución de tamaño de leiomiomas³⁴. Así también se ha demostrado que la mifepristona inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer epitelial ovárico *in vitro*³⁸; esta disminución de la proliferación se presenta de un modo tiempo y dosis-dependiente, por otra parte, en un estudio de fase II, manifestó tener actividad sobre el cáncer de ovario resistente a la quimioterapia con cisplatino y paclitaxel^{35,39}. Además ha demostrado ser un fármaco con actividad antineoplásica en líneas celulares de roedores con resistencia farmacológica, inhibiendo la función de la PGP (P-glicoproteína) una proteína de membrana que transporta una amplia cantidad de fármacos citotóxicos fuera de las células tumorales. Dado los usos potenciales de este medicamento para propósitos clínicos y experimentales, se espera que ésta persista como una área importante de investigación terapéutica para padecimientos oncológicos, durante los próximos años.

3. CISPLATINO

El cisplatino es un agente con actividad antineoplásica, descubierta en 1965 por I. Rosenberg³⁰; pertenece a la clase de agentes citotóxicos conocidos como complejos de coordinación del platino y es en los años 70s cuando se emplea ya como tratamiento

clínico, representado hasta la fecha a uno de los grupos de fármacos más importantes en el tratamiento de diversos tipos de cáncer incluyendo al cérvico uterino, el de ovario, pulmón y tumores testiculares; sin embargo son bien conocidos sus serios efectos secundarios ya sean nefrotóxicos o neurotóxicos, de tal manera que la búsqueda de fármacos que incrementen la citotoxicidad del cisplatino al administrarlo en combinación es en parte un esfuerzo para aminorar sus efectos colaterales.

a. Características Fisicoquímicas

El cisplatino es el compuesto inorgánico Cis-diaminodicloroplatino (CDDP), un complejo de coordinación con platino, donde esté se encuentra en estado de oxidación +2, es decir, tiene cuatro enlaces dirigidos hacia las cuatro esquinas de un cuadrado en cuyo centro se encuentra el átomo metálico, formándose así un complejo planar (figura 3). El platino forma enlaces covalentes, por lo que sus reacciones se asemejan en cierto modo a las reacciones de sustitución del carbono, especialmente a las reacciones de alquilación⁴⁰.

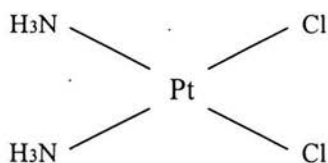


Figura 3. Estructura del cisplatino.

En el ambiente acuoso de la solución del cisplatino y con un pH <5, como se encuentra en los líquidos orgánicos, el platino debe formar enlace covalente con el agua, que sustituye así un Cl, formándose un derivado acuo. Con la concentración de Cl⁻ que existe en el plasma, el cisplatino se puede encontrar en varias formas: dicloro, monoacuo (clorohidroxi), y diacuo (dihidroxi)⁴¹, e incluso se pueden formar dipolímeros (figura 4).

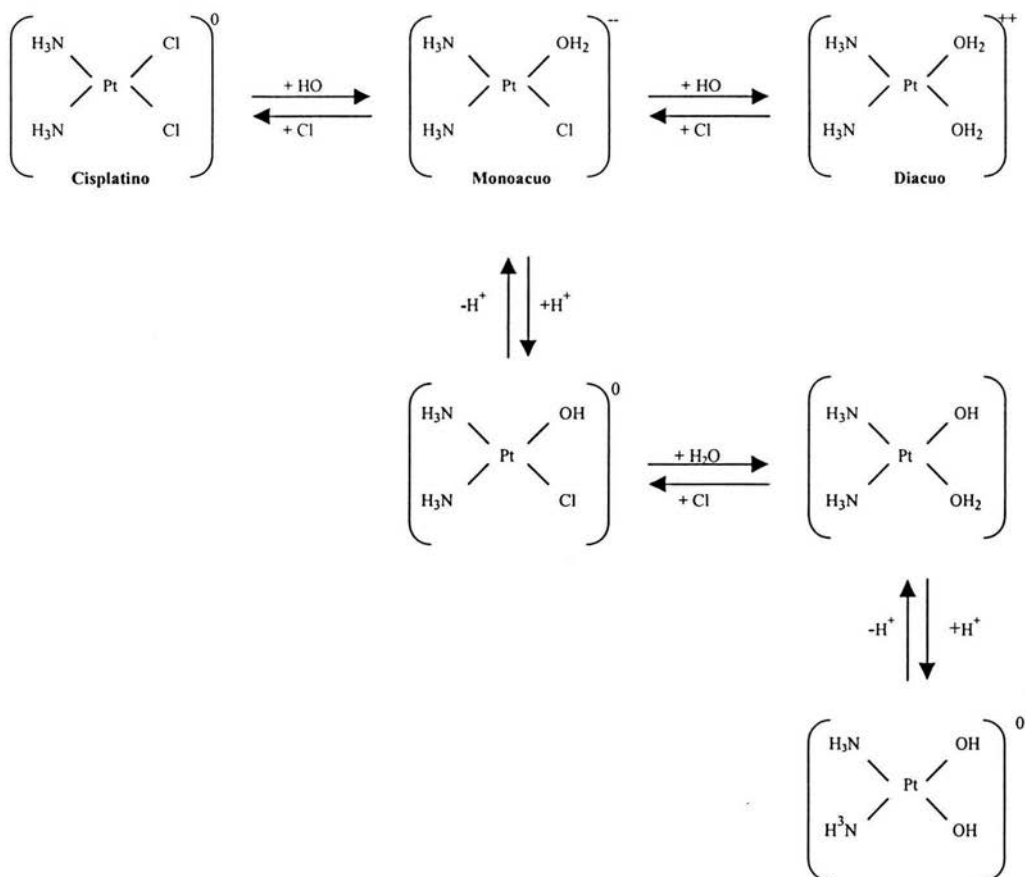


Figura 4. Hidrólisis del cisplatino.

Cualquiera de estas formas tiene capacidad para reaccionar con los productos nucleofílicos que se encuentran en las células, semejantes a tioles, tioéteres, imidazoles, guanidinas, aminas; no obstante, la reacción directa puede ser importante sólo para los grupos biológicos tio, mientras que los grupos amino reaccionan sólo a través del compuesto acuio⁴².

Las reacciones que el cisplatino sufre in vivo pueden dividirse dentro de tres principales clases⁴³:

1. Simple reacción de hidrólisis.

2. Reacciones que involucran coordinación de pequeñas moléculas o iones, con el platino. Las moléculas involucradas pueden ser inorgánicas semejantes a fosfatos, o pequeñas moléculas orgánicas como aminoácidos o péptidos; las cuales pueden reaccionar con el derivado monoacu en una reacción rápida, o bien, un segundo mecanismo involucra el ataque directo de estas especies al cisplatino, de una manera irreversible.
3. Unión del platino a macromoléculas, semejantes al DNA la cual es responsable de la actividad antitumoral del cisplatino.

b. Mecanismo de Acción

El cisplatino generalmente penetra la célula por medio de difusión pasiva, sin embargo algunas evidencias indican que la célula es capaz de regular su entrada¹⁰; este fármaco como tal es inactivo, y solo el isomero cis tiene actividad citotóxica, tras atravesar la membrana plasmática. Dentro de la célula la baja concentración de cloro (3—20mM) activa a la molécula al promover la hidrólisis del cisplatino, resultando una especie electrofílica cargada positivamente; esta molécula activa reacciona o forma enlaces covalentes con una variedad de macromoléculas incluyendo ADN, ARN y proteínas¹⁰ (figura 5).

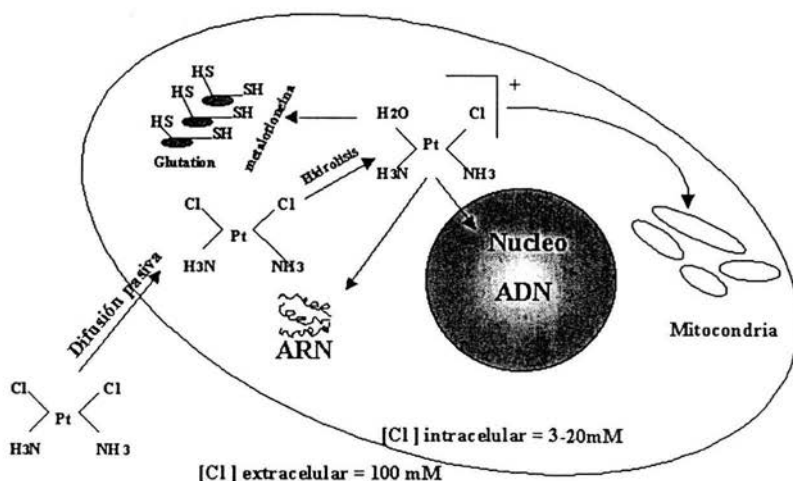


Figura 5. Entrada del cisplatino a la célula y sitios de acción.

El complejo monohidratado es considerado como el agente citotóxico más importante en la reacción con el ADN, actuando preferentemente sobre las bases del ADN formando puentes intracatenarios, en particular con el N-7 de la guanina¹⁰. Además se comporta como un agente bifuncional produciendo enlaces intercatenarios o puentes cruzados entre las dos hebras del ADN (figura 6), alterando su configuración tridimensional; estudios recientes demostraron que el cisplatino curva el ADN, debido a la presencia de múltiples enlaces con participación de cationes divalentes, dándole al ácido nucleico una conformación más semejante al ADN-A que al ADN-B, de tal manera se establece que la deformación que sufre la hendidura menor del ADN al unirse con el cisplatino modifica la relación del ácido nucleico con las proteínas de alta movilidad HMG (High-Mobility Groups) lo que impide que tenga lugar el proceso de reparación del ADN, en el cual participan las moléculas de HMG^{42,43}.

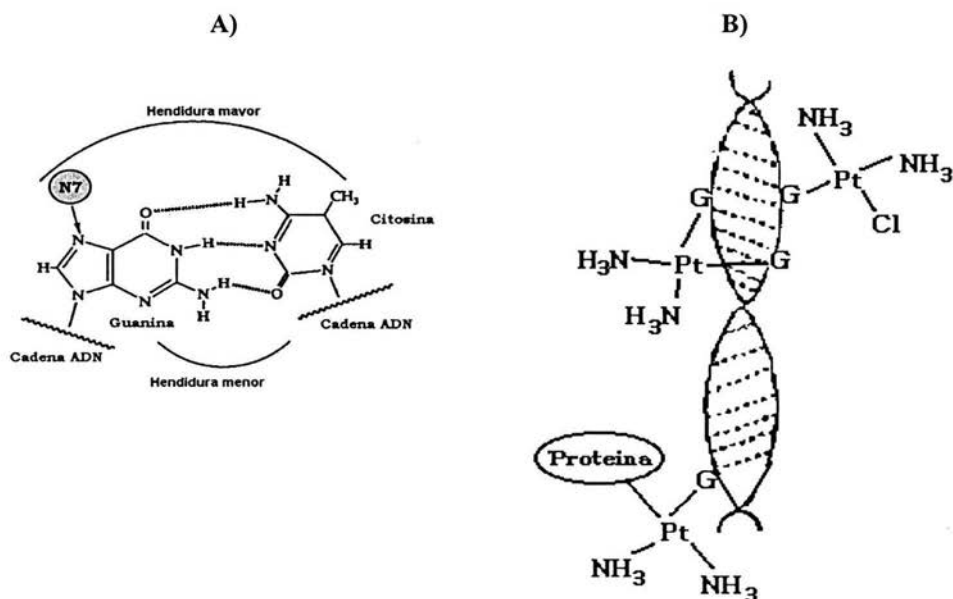


Figura 6. Aductos formados por cisplatino con la doble hélice del ADN. A) coordinación del cisplatino con N-7 de la guanina; B) enlaces intra e intercatenarios con el ADN.

De esta manera, el sitio que contiene el cisplatino elude los mecanismos de escisión normales, lo que sensibiliza a las células a la acción citotóxica, provocando la inhibición de la replicación y transcripción del mismo. Las uniones cruzadas intercatenarias son producidas de forma lenta, y es probable que la forma cis más que la trans sea la capaz de producir estos entrecruzamientos. Por otra parte se considera que este fármaco es mas activo en la fase G1 del ciclo celular, no obstante se clasifique como un agente no específico del ciclo.

c. Características Farmacocinéticas

El cisplatino se administra comúnmente por vía intravenosa, en una solución que contiene suficiente cloruro sódico para evitar la descomposición del fármaco, ya que la estabilidad del cisplatino es inversamente proporcional a la concentración de iones cloro presentes⁴¹; así también la administración puede realizarse por vía intraperitoneal o intraarterial. Ya en sangre, se une en un 90% a las proteínas séricas, siendo el fármaco libre el activo, dentro del plasma la elevada concentración de cloro impide en gran parte la hidrólisis del producto. Por otra parte, el cisplatino se une también a proteínas mediante enlaces covalentes, lo cual puede significar la pérdida irreversible de la actividad biológica. A las células de los tejidos pasaran las formas dicloro, clorohidroxi, e dihidroxi²⁷.

Se distribuye ampliamente alcanzando las mayores concentraciones en el hígado, el riñón, el intestino delgado y el grueso; se fija también en piel, hueso, músculo y pasa escasamente la barrera hematoencefálica. La concentración plasmática disminuye inicialmente con rapidez como consecuencia de su paso a los tejidos con una semivida de 10-30 minutos, luego la concentración plasmática puede aumentar como consecuencia de la creciente unión a proteínas, hasta que vuelve a disminuir lentamente con una larga semivida de 1-5 días²⁸.

La biotransformación de cisplatino es totalmente diferente al metabolismo por procesos enzimáticos de otros fármacos, éste pierde efecto en fluidos biológicos y tejidos por el intercambio iónico de uno o ambos cloros, ligándose con especies nucleofílicas que forman varios complejos. Los ligandos de cloro son desplazados por moléculas de agua formando especies hidratadas más reactivas; en solución acuosa el primer proceso de hidratación es considerado como el paso determinante entre el cisplatino y la especie hidratada, pero la formación reversible del cisplatino, puede ocurrir con la adición de iones cloro; sin embargo algunos autores afirman que el cisplatino es inestable a pesar de la alta concentración de iones cloro extracelular y que; por lo tanto, la adición de cloruro de sodio al plasma ultrafiltrado no tiene efecto en la estabilidad del cisplatino⁴¹. Aproximadamente un 25% de la dosis administrada se elimina durante las primeras 24 h, de la cual el 90% se excreta por el riñón como resultado de la filtración glomerular y la secreción tubular, mientras que la eliminación biliar supone menos del 10%.

d. Aplicaciones Terapéuticas

El cisplatino tiene efectos antitumorales significativos en los cánceres ováricos, de cérvix, de cabeza y cuello, pulmonar y testicular. Si se emplea solo, se administra a la dosis de 100 mg/m²; puede hacerse de una vez o repartido en cinco días, repitiéndose los ciclos cada tres semanas; por otra parte si se utiliza en combinación con otros neoplásicos, la dosis puede reducirse a 20-30 mg/m². La capacidad del cisplatino, cuando se usa en combinación, es de gran relevancia debido a que presenta actividad sinérgica o aditiva. El uso del cisplatino con vinblastina y bleomicina, o más recientemente con etopósido, ha llevado a una alta tasa de curación (77%) en pacientes con cáncer testicular avanzado. En combinación con la ciclofosfamida es el tratamiento de elección del cáncer de ovario con una alta tasa de respuesta (70%) y algunas curaciones (aproximadamente 10%). Las infusiones de cisplatino y 5-FU también son altamente efectivas para producir regresiones tumorales en los pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, si bien las remisiones producidas son sólo transitorias.

e. Toxicidad

El uso clínico del cisplatino está limitado por la aparición de alguno de sus efectos tóxicos. La reacción adversa que se presenta con mayor frecuencia es la acción nefrotóxica, que afecta principalmente los túbulos proximales y distales y en menor medida al glomérulo, produciendo una lesión de la función renal dependiente de la dosis que se observa indirectamente por una elevación de la creatinina sérica²⁷. La toxicidad aparece con dosis de 2 mg/Kg, pero se puede evitar mediante abundante hidratación del paciente y diuresis osmótica con manitol. También se presenta neurotoxicidad principalmente ototoxicidad, la cual consiste en la aparición de tinnitus e hipocausía en el intervalo de frecuencias altas (4000-8000 HZ), puede ser limitante de la dosis y generalmente aparece con dosis acumuladas de 300-600 mg/m², tras la suspensión del fármaco los síntomas suelen mejorar o estabilizarse^{8,9}. Aparecen también problemas gastrointestinales, al ser el citostático más emetógeno, produciendo náuseas y vómitos en prácticamente todos los pacientes con las dosis habituales, las náuseas es común pero puede ser aminorada por antagonista del receptor a serotonina.

D. Determinación Cromatográfica

1. GENERALIDADES DE CROMATOGRAFÍA

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos, basándose en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos, lo cual se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. El reparto de solutos entre las fases móvil y estacionaria es la causa de la separación de solutos, aquel que tenga mayor afinidad por la fase estacionaria se moverá con mayor lentitud a lo largo de la columna⁴⁴.

a. Clasificación

Para clasificar los diferentes tipos de cromatografía el primer criterio que puede establecerse es la naturaleza de las fases involucradas y como segundo criterio, se utiliza a los mecanismos de separación. En la tabla 1, se recogen las diferentes posibilidades.

Tabla 1. Modalidades de Cromatografía

CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS		CROMATOGRAFIA DE GASES
Cromatografía Plana	Cromatografía en Columna	
Cromatografía en Capa Delgada (Adsorción)	Cromatografía Líquido-Sólido (Adsorción)	Cromatografía Gas-Líquido (Partición)
Cromatografía en Papel (Partición)	Cromatografía Líquido-Sólido (Partición)	Cromatografía Gas-Sólido (Partición)
	Cromatografía de Intercambio Iónico	
	Cromatografía de Exclusión Molecular	

Otro criterio es la relación de polaridad entre la fase móvil y la estacionaria.

1. Cuando la fase móvil es menos polar que la estacionaria se denomina **cromatografía en fase normal**.
2. Cuando la fase móvil es la más polar, se denomina **cromatografía en fase inversa**.

Esta última forma, que es la más utilizada actualmente en cromatografía de líquidos, usa como fase estacionaria una molécula no polar (monomérica o polimérica) unida químicamente a un soporte. El comportamiento de este tipo de fase estacionaria es intermedio entre el de un sólido y un líquido, inclinándose más en uno u otro sentido según las condiciones del entorno, fundamentalmente la naturaleza de la fase móvil.

ESQUEMA DE UN CROMATÓGRAFO: La cromatografía en columna se realiza en un equipo instrumental (figura 7), que consta de las siguientes partes:

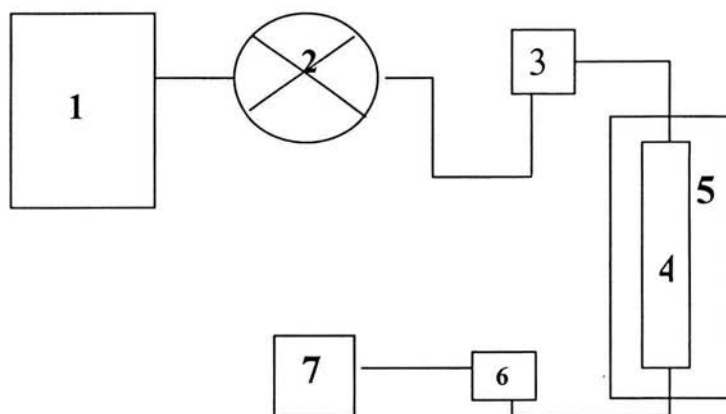


Figura 7. Esquema de un cromatógrafo.

1. Una fuente de fase móvil, cuya naturaleza depende fundamentalmente del tipo de fluido que se utilice
2. Un sistema de regulación y medida del caudal o la presión de la fase móvil.
3. Un sistema de inyección de la muestra; se trata de un dispositivo que permite introducir la muestra en la corriente de fase móvil. Es un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación. La manera ideal de inyectar o introducir la muestra, es en forma de paquete pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.
4. La columna: es la parte fundamental, ya que en ella se produce la separación. Se trata de un tubo construido en diversos materiales (metal, vidrio, sílice fundida, polímeros, etc.), de una longitud que puede oscilar entre varios centímetros y más de un centenar de metros, y cuyo diámetro interno varía entre varios micrómetros y varios centímetros.

5. Un recipiente termostatzado para controlar la temperatura de la columna. En cromatografía de líquidos es frecuente trabajar a temperatura ambiente, en cuyo caso se prescinde de este componente. En cualquier caso, para medidas precisas es imprescindible su uso.
6. Un sistema de detección: es un dispositivo que mide en continuo y transforma en una señal eléctrica una propiedad, generalmente física, de la fase móvil, que se ve ampliamente afectada por la presencia de pequeñas concentraciones de otras sustancias (componentes de la muestra). Los detectores más empleados son; detector de UV, detector de índice de refracción, detector electroquímico, detector de infrarrojo, detector de fluorescencia, detector de radioactividad.
7. Un sistema de amplificación y tratamiento de la señal eléctrica generada en el detector. El tratamiento puede incluir la adquisición y almacenamiento de datos y ciertos cálculos mediante un sistema informático.

3. CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos comprende todas las técnicas cromatográficas en las que la fase móvil es un líquido. Dentro de ellas se encuentran desde las más primitivas de cromatografía en papel, en capa fina o en columna abierta, hasta los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución. A estos últimos a los que se les denomina generalmente con las siglas CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución). La fase móvil tiene un papel primordial en el proceso de cromatografía de líquidos en los que respecta a las interacciones con el soluto. En CLAR la naturaleza de la fase móvil se puede cambiar prácticamente de manera casi ilimitada, de forma que su modificación permite variar ampliamente la selectividad y controlar la separación de los constituyentes de la muestra, aún con un número limitado de fases estacionarias. De acuerdo con la naturaleza de estas fases, los modos más utilizados de CLAR se pueden resumir en fase inversa, intercambio iónico, pares iónicos y exclusión molecular, sin olvidar la importancia que están adquiriendo otros modos entre los que hay que destacar la cromatografía de líquidos quiral y la de afinidad.

El éxito en la aplicación de este método depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, etc. La migración diferencial es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La cromatografía de líquidos en fase inversa es el modo de CLAR más empleado en la actualidad. Se estima que el 50% de las separaciones que se llevan a cabo en cromatografía de líquidos emplean este modo. Este hecho se debe a la comercialización de rellenos específicos para esta modalidad, que son estables, reproducibles, de pequeño tamaño de partícula y que permiten alcanzar una elevada velocidad de transferencia de materia, lo que da lugar a columnas con elevada eficacia. Las fases estacionarias más simples desde un punto de vista conceptual son las basadas en sílice con funcionalidad alquilo, que se obtienen uniendo mediante enlace covalente un *n*-alquilsilano a la superficie de una partícula de sílice. Otros tipos de fases de arquitectura más complicada, tales como las oligoméricas o las poliméricas, también se emplean en este modo de separación. La fase móvil generalmente es agua con un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano). Con el fin de optimizar la selectividad de la separación pueden emplearse mezclas ternarias o cuaternarias de estos disolventes.

3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las operaciones previas a la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico constituyen un aspecto de gran trascendencia. La importancia de la toma, conservación y preparación de la muestra es a menudo minimizada en las determinaciones cromatográficas, aunque las dificultades y los errores que se pueden originar en estas etapas previas son a veces mucho más trascendentales que los que se derivan del proceso cromatográfico propiamente dicho.

Por una parte es imprescindible que la muestra inyectada sea representativa del material y que esté en concordancia con los objetivos perseguidos en la definición del problema a resolver. Por otra parte, debe evitarse el deterioro (foto descomposición, pérdidas por adsorción, volatilización, descomposición térmica, reacciones químicas, acción microbiana, etc.) desde la toma de muestra hasta el momento de su preparación o introducción en el sistema cromatográfico.

En general, son escasas las muestras reales que pueden introducirse directamente; es preciso casi siempre algún tipo de operación previa de adecuación de la muestra para evitar las dificultades generales mencionadas. En la literatura al respecto se distinguen normalmente dos tipos de procesos:

a. Extracción

Comprende a un conjunto de operaciones orientadas a evitar las dificultades derivadas de la complejidad de la matriz y de la excesiva dilución de la muestra. Generalmente son procedimientos físicos y físico-químicos en los que es frecuente el empleo de dos fases para llevar a cabo una separación global con o sin preconcentración. Los procesos más frecuentes son de porción (cambio iónico, adsorción con carbón activo, sílice, alúmina, etc.), partición (con fases ligadas soportadas, etc.), extracción líquido-líquido, destilación o volatilización, ultracentrifugación, ósmosis inversa, liofilización, etc.

b. Derivatización

El término derivatización es amplio y generalmente se asigna a transformaciones químicas irreversibles de los analitos o aquellas que tienen una gran tendencia a completarse (alta constante de equilibrio). Fundamentalmente las nuevas especies deben ser compatibles con el sistema cromatográfico en sus diferentes módulos; con la fase móvil, con el sistema de inyección, con la columna cromatográfica y con el detector. Los objetivos más generales que se persiguen con las técnicas de derivatización son distintos según se trate, sin embargo, fundamentalmente esta orientada a posibilitar o mejorar la detección.

Los diferentes tipos de técnicas de derivatización, clasificadas según la forma experimental con que se llevan a cabo son:

Derivatización Discontinua: en la que la muestra es tratada previamente con el reactivo antes de su inyección en el cromatógrafo. Generalmente se lleva a cabo de manera manual y los derivados ya formados se separan en la columna.

Derivatización Continua: en la que la transformación química tiene lugar en el sistema cromatográfico en cualquiera de sus componentes modulares o entre los mismos. La reducción de la intervención humana es una característica casi general de estos sistemas. De acuerdo a donde tiene lugar la derivatización, se le llama derivatización pre-columna, en columna o post-columna.

4. Validación de Métodos

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas⁴⁵. La capacidad se expresa en este caso, en términos de parámetros analíticos; los parámetros fundamentales a valorar son:

Exactitud: un método es exacto cuando los valores que se obtienen coinciden con los reales; la exactitud puede medirse mediante el cociente entre el valor obtenido y el valor real, expresado en porcentaje.

Precisión: la precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad.

- **Repetibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).
- **Reproducibilidad:** es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones diferentes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferente equipo, etc.).

Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Límite de Detección: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de Cuantificación: Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad: Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Estabilidad de la Muestra: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La problemática del cáncer cérvico uterino ocupa un lugar importante en las áreas de investigación actuales tendientes a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas; al respecto, se conoce que la quimioterapia coadyuvante es el método que complementa sistemáticamente el tratamiento local de este padecimiento, produciendo una remisión temporal de los síntomas y signos del cáncer. Como ya se sabe el cisplatino es uno de los fármacos mas importantes en el tratamiento del CaCu que al ofrecer grandes ventajas clínicas lo hacen un fármaco de elección en la quimioterapia; sin embargo, su uso clínico en muchas ocasiones es restringido por sus serios efectos colaterales como la nefrotoxicidad y neurotoxicidad, aunado a esto se ha observado que con el uso único de este fármaco se presenta un rápido desarrollo de resistencia. Por tal motivo, resulta valido enfocarse a la búsqueda de agentes capaces de potenciar el efecto antiproliferativo de cisplatino sin incrementar sus efectos tóxicos y en el mejor de los casos contrarrestar la resistencia, recientemente se han realizado estudios que promueven las combinaciones con fármacos no antineoplásicos, capaces de inducir o restaurar el proceso de apoptosis, en lugar de interrumpir el ciclo celular en las células cancerosas. Tal es el caso del empleo de mifepristona (RU-486) en combinación con cisplatino, para tratar células de cáncer cérvico uterino (HeLa), produciendo un efecto antiproliferativo sinérgico, en donde se propone que dicho efecto puede estar mediado al menos parcialmente por un incremento en la concentración intracelular de cisplatino, así como por la disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2; sin embargo, dichos resultados provienen de mediciones efectuados *in vitro*, modalidad que no permite predecir su eficacia o toxicidad, aunado a esto resulta factible recordar que los datos de concentración plasmática del fármaco antineoplásico son más útiles en el diseño de múltiples regímenes de dosificación. Dado que el cisplatino es un agente que no actúa sobre el ciclo celular, no es dependiente del

esquema de administración, de tal manera que tanto los efectos antitumorales como su toxicidad guardan relación con la dosis administrada y acumulada, sobre la base de estos principios y para su uso inocuo y eficaz resulta esencial conocer las características farmacocinéticas y farmacodinámicas; lo cual puede ser evaluado in vivo sobre un modelo tumoral de cáncer cervico uterino en ratones atímicos, con la finalidad de demostrar que el sinergismo presentado al emplear la combinación se reproduce a nivel farmacológico.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad antitumoral, del cisplatino (CDDP) en combinación con mifepristona (RU486); sobre un modelo tumoral *in-vivo* de cáncer cérvico uterino (CaCu).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar y validar un método analítico, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), que permita cuantificar cisplatino en micromuestras plasmáticas.
- Evaluar el efecto que produce la combinación de cisplatino y mifepristona; sobre el crecimiento de tumores, originados a partir de la línea celular de CaCu (HeLa) en ratones atímicos.
- Establecer la influencia del antiprogestágeno mifepristona, sobre la biodisponibilidad sistémica de cisplatino, en ratones atímicos.

V. HIPÓTESIS

El cisplatino es un agente efectivo en el tratamiento del cáncer cervico uterino, recientemente se han realizado estudios que promueven su combinación con fármacos no antineoplásicos, tal es el caso de la mifepristona quién ha demostrado tener capacidad para potenciar su efecto citotóxico mediante acciones proapoptóticas; a su vez, esta reportado que los efectos antitumorales del cisplatino así como su toxicidad guardan relación con las concentraciones plasmáticas del fármaco, lo que implica su análisis a través de métodos analíticos confiables. Semejantes características sugieren, que al emplear la combinación de los fármacos cisplatino y mifepristona en un modelo tumoral *in vivo* de cáncer cérvico uterino, se presentará una mejora en la actividad antitumoral del cisplatino al provocar una mayor reducción en el tamaño de los tumores formados; así como, una posible disminución de sus efectos tóxico, al provocar cambios en las concentraciones plasmáticas del cisplatino, detectadas mediante un método por CLAR, que por consecuencia producirá una alteración en sus parámetros farmacocinéticos.

VI. METODOLOGÍA

A. Materiales y métodos

1. MÉTODO ANALÍTICO.

Se implemento y valido un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, para la cuantificación de cis-diaminodicloroplatino en muestras plasmáticas.

- **Reactivos:** Para el desarrollo e implementación del método cromatográfico, se utilizó el cis-diaminodicloroplatino (CDDP) de Sigma, con una alta pureza; al igual que el estándar interno cloruro de níquel. Los solventes acetonitrilo al 99.93% grado cromatográfico de Aldrich, el metanol grado cromatográfico de Merck, el agua destilada y desionizada, se emplearon como la fase móvil del método cromatográfico; dicha fase es desgasificada con nitrógeno gaseoso Aga Uno 1066. El dietilditiocarbamato de sodio (DDTC) de Sigma, el hidróxido de sodio para análisis de Merck, son los principales reactivos del proceso de derivatización. Así también se utiliza cloroformo al 99% de Sigma, para la extracción líquido-líquido.
- **Equipo:** Para el análisis cuantitativo, se utiliza un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, Waters 650E; equipado con: una Bomba Waters, un Controlador Waters 600S, un Inyector manual RC-11, un Detector de Absorbancia (UV-VIS) Waters 486, y con Software Millenium; además de utilizar una Columna Symmetry C18 5µm (3.9 x 150mm). Así también se empleo un sistema de purificación de agua Simplicity 185 de Millipore Corporation, un Agitador vortex Genie 2, Balanza analítica Scientech SA-210, una Centrifuga Spinchron DLX de Beckman, Bomba de Vacío GAST mod. DOA-P104-AA, Potenciómetro Corning pH meter430, Refrigerador Revco mod. ref. 1617414 (a -20°C); y un Espectrofotómetro UV-VIS.

- **Material:** Se emplearon tubos Eppendorf de 1.5 mL, para coleccionar el plasma y tubos de ultrafiltración Vivaspín 500 µl (membrana 30K RC), de productos Vivascience. Las alícuotas se midieron con micropipetas de 10, 200 y 1000 µL; a su vez cada solvente para fase móvil fue filtrado a través de filtros de nylon, de Sigma-Aldrich, con un tamaño de poro de 0.45 µm.

2. MATERIAL BIOLÓGICO.

- **Ratones:** Se emplearon ratones atímicos (Harlan Sprague-Dawley), hembras de 8-10 semanas de edad, con un peso de 23-30 g, adquiridos en el Instituto de Nutrición-México. Se mantuvieron a una temperatura de 24 °C, y fueron alimentados y alojados en condiciones estériles. El alimento y aserrín proporcionado fue Sani-Chips de Harlan Tekland, las jaulas utilizadas fueron de acrílico cristal transparente ULTEM, de Nalgene, con filtros protectores. Se mantuvieron de cuatro hasta ocho ratones por caja; realizando el cambio de cama de aserrín cada tercer día, además de lavar y esterilizar los bebederos y cajas cada mes.
- **Línea celular:** La línea celular epitelial de carcinoma de cérvix, HeLa, fue obtenida de ATCC (American Type Culture Collection), se empleo para el desarrollo de tumores en ratones, ésta se cultivo en medio RPMI 1640, de Gibco con suero fetal bovino al 10% e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Una vez confluentes se despegaron con PBS-EDTA 1mM; y finalmente se contaron con la ayuda de un hemocitómetro.

3. PREPARACIÓN DE LOS FÁRMACOS Y SU ADMINISTRACIÓN.

- **Cisplatino:** Se preparó una solución stock del cis-diaminodicloroplatino (CDPP), de Sigma, a una concentración de 1 mg/mL, en solución salina, y se mantuvo almacenada a -70 °C hasta su empleo.

A partir de esta solución se prepararon las curvas de calibración para dicho fármaco, realizando diluciones sucesivas con solución salina para obtener las concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$, empleadas en la validación del método analítico y en la cuantificación del cisplatino en muestras plasmáticas.

La solución stock fue administrada intraperitonealmente a cada ratón, a una dosis de 3 mg/Kg/día durante cuatro días para la evaluación del crecimiento tumoral, y a una dosis de 6 mg/Kg/día para el estudio de las concentraciones plasmáticas.

- **Mifepristona:** RU486, de sigma, fue empleada para preparar una solución stock, a una concentración de 0.5 mg/mL; la mifepristona exactamente pesada fue disuelta en la menor cantidad de alcohol absoluto y posteriormente se llevo a volumen final con aceite vegetal, dicha solución se mantuvo en refrigeración a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser utilizada. Fue administrada intraperitonealmente a cada ratón a una dosis de 2 mg/Kg de peso.

4. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL.

Los tumores de cáncer cérvico uterino empleados en este experimento, se obtuvieron a partir de la inoculación de 8×10^6 células HeLa suspendidas en 0.1 mL de medio RPMI sin suero, en ratones atímicos. Los tumores aparecieron a partir de la dos semanas después de ser inoculadas las células. Cuando se alcanzó un diámetro de 5 x 5 mm por tumor, se procedió a identificar individualmente a los ratones y se formaron al azar el grupo control y los tres grupos tratados (8 animales por grupo), posteriormente se peso a cada ratón y se dio inicio al tratamiento, tomándolo como día uno. Al grupo control se le administró intraperitonealmente 0.1 mL de aceite vegetal/día, durante cuatro días. Al primer grupo tratado se le administró cisplatino a una dosis de 3 mg/Kg/día, durante cuatro días; el segundo grupo fue tratado con mifepristona a una dosis de 2 mg/Kg/día, durante cuatro días, finalmente al tercer grupo se le administró intraperitonealmente una dosis de 2 mg/Kg/día de mifepristona durante los primeros cuatro días y posteriormente con cisplatino a una dosis de 3 mg/Kg/día, durante los siguientes cuatro días.

Medida del Tumor: El largo y ancho del tumor se midieron al inicio del tratamiento y subsecuentemente cada tercer día, con ayuda de un vernier, estos datos fueron transformados a peso, área y volumen de acuerdo a las siguientes fórmulas. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor alcanza un peso superior a los 2 g.

- **PESO TUMORAL**

$$\text{PESO (g)} = \frac{\text{Ancho (mm)}^2 \times \text{Largo (mm)}}{1000}$$

- **AREA TUMORAL**

$$\text{AREA (mm}^2\text{)} = \frac{\text{Ancho (mm)}^2 \times \text{Largo (mm)}}{4} \times \pi$$

- **VOLUMEN TUMORAL**

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \text{Ancho (mm)}^2 \times \text{Largo (mm)}$$

Por otra parte con estos datos también se obtiene el volumen relativo de tumor (VRT) de acuerdo a la siguiente fórmula:

- **VOLUMEN RELATIVO DE TUMOR**

$$\text{VRT (mm}^3\text{)} = (V_x / V_1)$$

En donde V_x es el volumen del tumor en un día x , mientras que V_1 es el volumen del tumor al inicio de la terapia (día 1). Las curvas de crecimiento fueron obtenidas con el promedio de peso, área y VRT de cada grupo en el eje de las Y, contra el tiempo (expresado en días después de iniciado el tratamiento). Por otra parte la actividad

antitumoral se evaluó de acuerdo a la comparación de los valores de área tumoral, alcanzada tanto por los ratones del grupo tratado como por los valores presentados por el grupo control, ambas a un mismo tiempo de tratamiento.

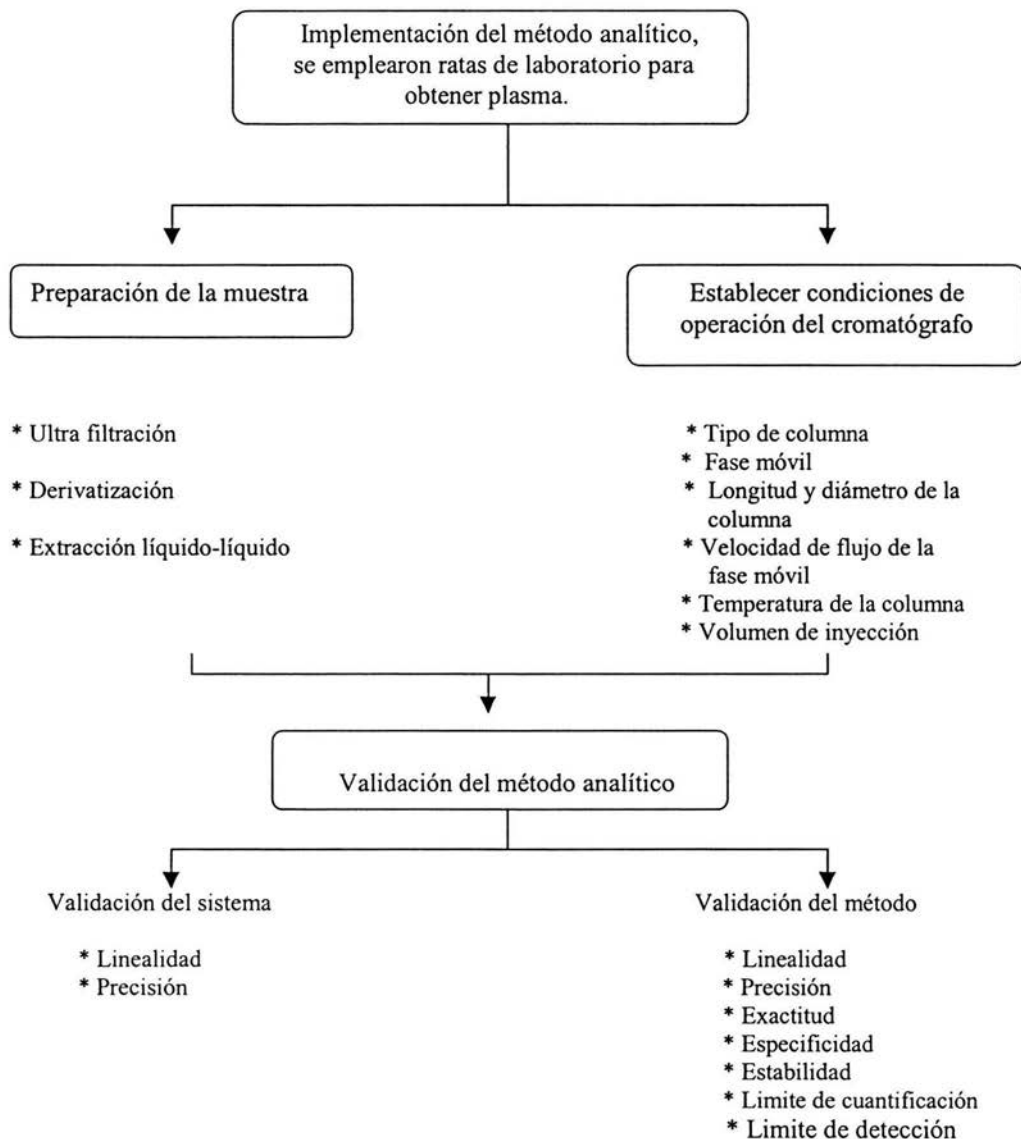
5. EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA.

Se formaron dos grupos de 10 ratones con un peso de 25-30 g, cada ratón fue pesado e identificado de tal forma que no existiera confusión en el estudio, debido a que se utilizó un ratón por cada tiempo de muestreo. El primer grupo fue tratado con cisplatino administrándole intraperitonealmente una dosis de 6 mg/Kg de peso, al segundo grupo se le administró intraperitonealmente mifepristona durante cuatro días a una dosis de 2 mg/Kg de peso y al quinto día se le administró cisplatino a la dosis de 6 mg/Kg de peso. El estudio farmacocinético se inició en el momento de administrar el cisplatino, tomando muestras plasmáticas a los tiempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 240 y 360 min (tiempo en el cual se detectó cisplatino en plasma en previos ensayos realizados en ratas); tomando en cuenta que se emplea a un ratón por cada tiempo de muestreo, fue necesario administrar el cisplatino a cada animal con 15 min de diferencia. La toma de muestra se realizó mediante punción cardiaca, obteniendo la mayor cantidad posible aproximadamente 1.0 mL, la muestra se colocó en tubos con 30 μ L de heparina se agitó suavemente y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, para separar el plasma del paquete globular; este plasma se transfirió a tubos de ultrafiltración Vivaspin y se sometió a centrifugación a 13500 rpm durante 15 min, el plasma ultrafiltrado se almacenó a -20°C hasta su análisis.

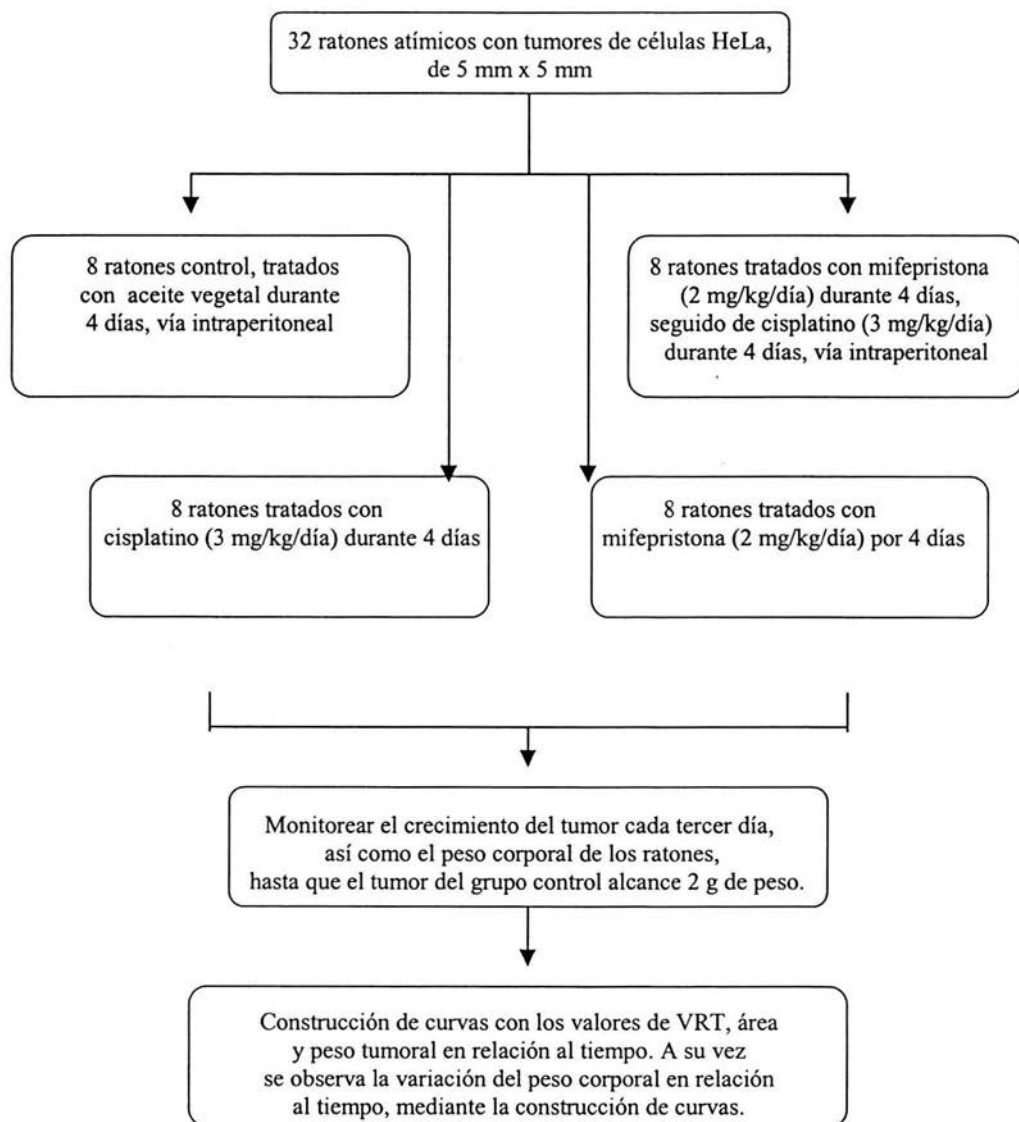
A partir de las curvas individuales de concentración de cisplatino contra tiempo en minutos, se determinó la concentración al tiempo cero ($C_{t=0}$), el área bajo la curva (ABC), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), el volumen de distribución (Vd) y la depuración (Cl), utilizando el programa WinNonlin Profesional versión 2.1.

B. Diagrama de flujo

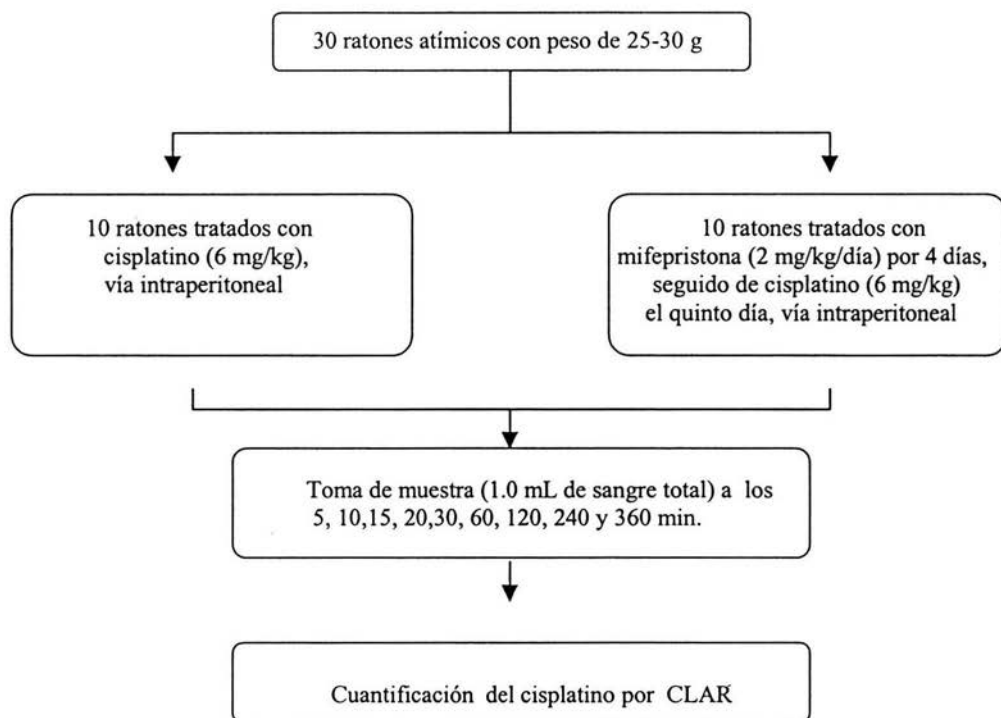
1. IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DEL METODO ANALITICO



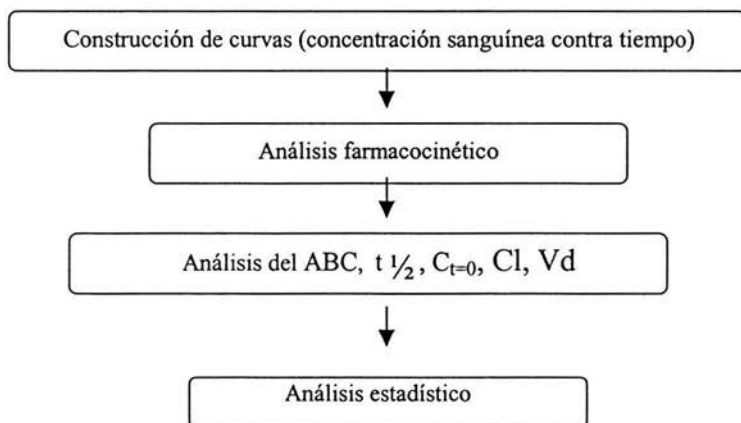
2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA COMBINACIÓN DE CISPLATINO CON MIFEPRISTONA



3. INFLUENCIA DE LA MIFEPRISTONA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD SISTEMICA DE CISPLATINO



A. ANÁLISIS DE RESULTADOS



VII. RESULTADOS

A. Método analítico para determinar cisplatino por CLAR

1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN:

En un tubo eppendorf previamente heparinizado (con 30 μL de heparina al 0.2% en solución salina), se colocaron 300 μL de sangre total, se mezcló perfectamente e inmediatamente se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm, para separar el plasma se utilizó una pipeta pasteur cuidando de no resuspender el paquete celular. Posteriormente el plasma colectado, se colocó en un tubo para ultrafiltrar de Vivaspín 500 μL , centrifugando a 13500 rpm durante 15 min y manteniendo una temperatura de 4 °C. Al plasma empleado en la validación se le adicionaron cantidades conocidas de cisplatino (0.1 – 10 $\mu\text{g/mL}$ de plasma).

2. PROCESO DE DERIVATIZACIÓN:

Al plasma ultrafiltrado se le adicionaron 10 μL del estándar interno cloruro de níquel con una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ en solución, se agitó por treinta segundos en un agitador vortex. Posteriormente se colocaron 10 μL de dietilditiocarbamato de sodio al 10% en NaOH 0.1 M, preparado recientemente, y se agitó durante un minuto en un agitador vortex. La reacción de derivatización se sometió durante 15 min a una temperatura de 37 °C en un baño de agua; para después extraer el aducto formado, utilizando 80 μL de cloroformo y agitándolo durante un minuto, seguido de la centrifugación a 10000 rpm durante 5 min; finalmente se llevo a cabo la separación la fase acuosa para inyectar 20 μL de la fase cloroformica al equipo cromatográfico.

3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

El análisis se realizó utilizando una columna Cromatográfica de fase reversa (Columna Symmetry C₁₈ 5 μm (3.9 x 150 mm)); la fase móvil empleada para el análisis esta constituido por los solventes acetonitrilo: metanol: agua en una proporción de 29:49:31 respectivamente, a un flujo de 1.6 mL/min., manteniéndolo a temperatura ambiente. Una longitud de onda de 254 se empleo para el análisis espectrofotométrico.

B. Validación del método analítico

1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Una vez establecidas las condiciones analíticas mediante las cuales fue posible cuantificar el cisplatino, se llevo acabo la validación del método analítico empleando el mismo tipo de matriz biológica que aquella de las muestras problema (plasma). Se tomaron como referencia los criterios, lineamientos y parámetros de aceptación descritos tanto en la NOM-177-ssa1-1998, así como los presentados por la FDA Guidance for Industry^{46,47}, los cuales se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de aceptación para la validación del método analítico.

PARAMETROS DE VALIDACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Linealidad del sistema	r^2 0.98
	m 1
	b 0
Precisión del sistema	C.V < 15%
Linealidad del método	r^2 0.98
	m 1
	b 0
Repetibilidad	C.V < 15%
Reproducibilidad	C.V < 15%
Exactitud	85 al 115 %
Especificidad	No deben existir interferencias, en la cuantificación de cisplatino y estándar interno
Estabilidad	C.V < 15%
	85 al 115 %
Limite de cuantificación	C.V < 20%

2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Procedimiento: Se prepararon cuatro curvas, en solución, conteniendo cisplatino en el rango de concentraciones de 0.2-10 $\mu\text{g/mL}$ de solución, las cuales se analizaron con el método previamente establecido. Se graficó la relación de alturas cisplatino/ cloruro de níquel, con respecto a la concentración de cisplatino a fin de determinar si la respuesta es lineal.

Resultados: La cuantificación de cisplatino, por el método cromatográfico establecido, se obtuvo con éxito al presentar un tiempo de retención de 5.8 min, mientras que el estándar interno se detectó a los 7.79 min. En la figura 8, se presentan los cromatogramas típicos obtenidos al inyectar cisplatino (A) y cloruro de níquel (B), como estándar interno.

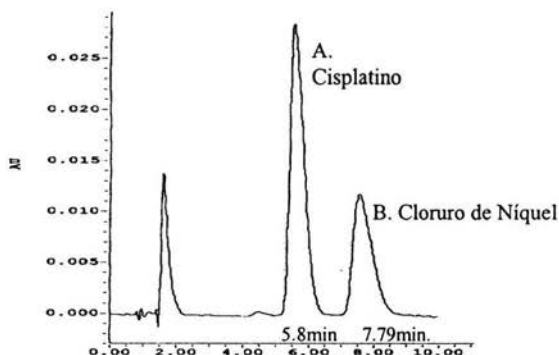


Figura 8. Cromatogramas de los aductos de cisplatino y cloruro de níquel obtenidos a partir de la derivatización. (A) Cisplatino y (B) Estándar interno cloruro de níquel, en solución.

Para la linealidad del sistema se graficó; la relación de alturas, del pico de cisplatino entre el pico del estándar interno, cloruro de níquel; contra la concentración de cisplatino en el rango de 0.2-10 $\mu\text{g/mL}$, cada punto representa el promedio de cuatro determinaciones, $\pm$ el error estándar (e.e), los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Relación de alturas de Cisplatino y Cloruro de Níquel en solución.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	R. ALTURAS	
	CDDP/E.I	e.e
0.2	0.023331	0.000016
0.5	0.083034	0.000248
1.0	0.165943	0.000613
2.0	0.335377	0.001542
4.0	0.696851	0.000878
10.0	1.793974	0.002145

La linealidad del sistema se muestra en la gráfica obtenida con los datos de la tabla anterior y se observa en la figura 9. Mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados; se obtuvo la ecuación de la recta la cual presenta los valores experimentales del coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b); donde claramente se observa que la curva es lineal dentro de este rango de concentraciones.

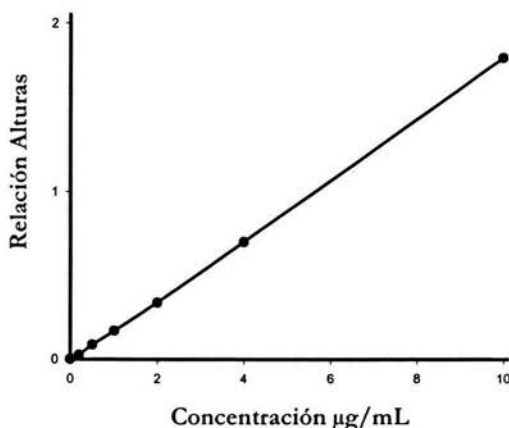


Figura 9. Curva de calibración para el sistema donde se evalúa al método cromatográfico, que se estableció para la cuantificación de cisplatino. Presenta la pendiente $m = 0.180520$, la ordenada al origen $b = 0.016116$, y el coeficiente de correlación $r^2 = 0.999871$.

3. PRECISIÓN DEL SISTEMA

Procedimiento: Se realizaron cuatro determinaciones independientes, según el método analítico propuesto, a muestras en solución que contenían cisplatino en concentraciones de 0.2-10 $\mu\text{g/mL}$ de solución; y se determina el coeficiente de variación de los cuatro datos obtenidos, para cada nivel de concentración.

Resultados: En la tabla 4, se muestran los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración, de la determinación individual de cisplatino, la respuesta se maneja en relación de alturas, altura del pico de cisplatino sobre la altura del pico del cloruro de níquel.

Tabla 4. Coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	C.V (%)
0.2	0.1386074
0.5	0.5964913
1	0.7382248
2	0.9196651
4	0.2519430
10	0.2391324

4. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Procedimiento: Se prepararon seis curvas, en plasma ultrafiltrado, conteniendo cisplatino en el rango de concentraciones de 0.2-10 $\mu\text{g/mL}$ de plasma, las cuales se analizaron con el método previamente establecido. Se gráfica la relación de alturas cisplatino/ cloruro de níquel, con respecto a la concentración de cisplatino a fin de determinar si la respuesta es lineal.

Resultados: La separación de cisplatino, de la matriz biológica, se obtuvo con éxito al presentar un tiempo de retención de 5.7min, mientras que el estándar interno se detectó a los 7.8min; al igual que los resultados presentados por las curvas en solución. En la tabla 5, se muestra la relación de alturas entre cisplatino y cloruro de níquel para cada concentración de cisplatino analizada, cada punto representa el promedio de seis determinaciones $\pm$ el error estándar (e.e); al mismo tiempo cuando se graficaron los datos de relación de alturas contra la concentración de fármaco, se obtuvo la curva que nos muestra el comportamiento lineal de este método, como se observa en la figura 10.

Tabla 5. Relación de alturas de Cisplatino y Cloruro de Níquel en muestras plasmáticas.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	R. ALTURAS CDDP/E.I	e.e
0.2	0.023231	0.000044
0.5	0.083613	0.000194
1.0	0.164704	0.000518
2.0	0.339039	0.000670
4.0	0.694422	0.001148
10.0	1.792756	0.000071

Se obtuvo la ecuación de la recta mediante un análisis de regresión lineal, el cual nos presenta los valores experimentales del coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b); donde claramente se observa que la curva es lineal dentro de este rango de concentraciones.

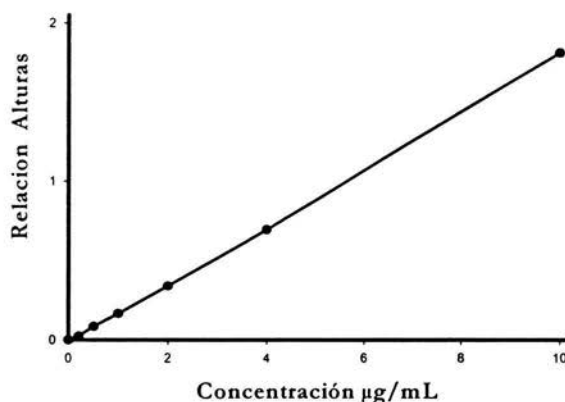


Figura 10. Linealidad del método analítico para la cuantificación de cisplatino en muestras plasmáticas. Presenta una pendiente $m = 0.1825383$, ordenada al origen $b = 0.0185823$ y coeficiente de correlación $r^2 = 0.99975856$.

5. PRECISIÓN DEL MÉTODO

a) Repetibilidad

Procedimiento: Para determinar la variabilidad en un mismo día se analizaron cuatro curvas en plasma conteniendo cisplatino en concentraciones de 0.2-10 µg/mL y se determina el coeficiente de variación, por cada nivel de concentración, esto se realiza bajo las mismas condiciones de operación y con el mismo analista.

Resultados: En la tabla 6, se muestran los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración, de la determinación individual de cisplatino, la respuesta se maneja en relación de alturas, altura del pico de cisplatino sobre la altura del pico del cloruro de níquel.

Tabla 6. Variabilidad interensayo, del método analítico.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	C.V (%)
0.2	0.2985663
0.5	0.5802692
1	0.9835217
2	0.5793022
4	0.3151189
10	0.0114931

a) Reproducibilidad

Procedimiento: Para determinar la variabilidad en diferentes días, se analizaron curvas que contenían cisplatino en concentraciones de 0.2-10 $\mu\text{g/mL}$ de plasma, realizando el análisis por duplicado en dos días diferentes; se determina el coeficiente de variación para cada nivel de concentración, esto se realiza bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Resultados: Se determinaron los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración, de la determinación individual de cisplatino, en dos días diferentes y de ensayos por duplicado, la respuesta se maneja en relación de alturas, altura del pico de cisplatino sobre la altura del pico del cloruro de níquel. Estos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Variabilidad intraensayo, del método analítico.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	C.V (%)
0.2	0.5111888
0.5	0.0495239
1	0.1481225
2	0.0133581
4	0.4348370
10	0.0007585

6. ESPECIFICIDAD

Procedimiento: Se analizaron tanto muestras de plasma libre de fármaco y estándar interno (blanco), como muestras plasmáticas conteniendo cisplatino a una concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ de plasma; cada ensayo se realizó por triplicado, comparando finalmente los cromatogramas obtenidos en cada caso.

Resultados: No se detectaron picos que interfieran con la lectura del cisplatino en plasma; en la figura 11, se muestra el cromatograma que se obtuvo para la mezcla de cisplatino y cloruro de níquel después de la derivatización, presentando tiempos de retención de 5.81 y 7.76 min. respectivamente; así también se observa el cromatograma que presentó el blanco, de tal manera que al compararlos se puede apreciar que el método analítico presenta especificidad para la cuantificación del cisplatino al no detectar picos en el mismo tiempo de corrida que puedan interferir en la detección.

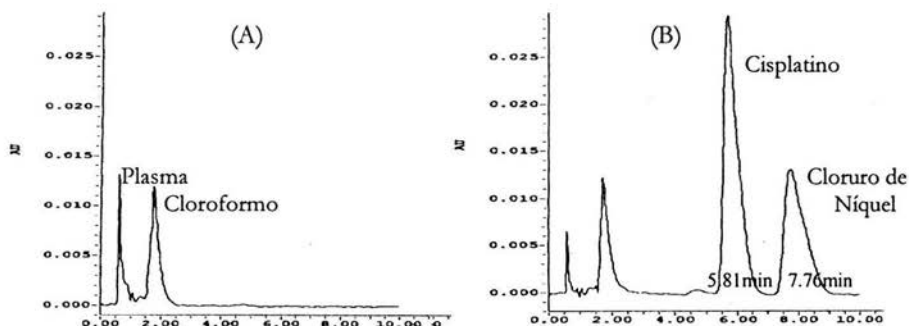


Figura 11. Cromatogramas obtenidos al inyectar una muestra de plasma sin adición de sustancias de interés (A), y una mezcla en plasma de cisplatino (10 $\mu\text{g/mL}$) y cloruro de níquel (30 $\mu\text{g/mL}$) (B).

7. EXACTITUD

Procedimiento: Se prepararon curvas en solución y en plasma conteniendo diferentes concentraciones de cisplatino (0.2-10 $\mu\text{g/mL}$ de plasma), y cloruro de níquel (3 $\mu\text{g/mL}$); se trataron mediante el procedimiento ya descrito y se inyectaron al cromatógrafo.

Resultados: Con los datos de relación de alturas de los cromatogramas obtenidos tanto en solución como en plasma, y con las ecuaciones de regresión lineal que describen cada modelo, se calcularon las concentraciones reales detectadas para cada muestra; posteriormente el promedio de las concentraciones detectadas en solución se tomaron como el 100% y se determinó el intervalo de exactitud en % de recobro para cada concentración de cisplatino en plasma, con el promedio de los resultados de las muestras en solución. En la tabla 8, se muestran los datos promedio de % de recobro, los cuales nos representan la exactitud del método analítico para la cuantificación de cisplatino en plasma, en diferentes niveles de concentración.

Tabla 8. Porcentaje de recobro para cisplatino en plasma.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/mL}$)	% DE RECOBRO	CV (%)
0.2	114.53	0.262776
0.5	111.97	0.464260
1	100.40	0.692717
2	97.95	0.459095
4	97.65	0.394508
10	99.23	0.009706

8. ESTABILIDAD

Procedimiento: A fin de establecer la estabilidad de cisplatino en plasma se prepararon muestras por triplicado a cinco niveles de concentración, entre 0.2-10 µg/mL; se mantuvieron en refrigeración a -20 °C, hasta el momento de su análisis. Un mes después las muestras se sometieron al proceso de derivatización como se describe en el método, y 20 µL de la fase cloroformica se inyectaron al cromatógrafo. Para evaluar la estabilidad del cisplatino en estas condiciones, se compararon las respuestas obtenidas contra puntos control de preparación reciente, estas fueron muestras por triplicado preparadas a cinco niveles de concentración (0.2-10 µg/mL)

Resultados: En la tabla 9, se muestra el coeficiente de variación (CV) que se presenta al comparar el valor promedio de la relación de alturas, obtenido por cada nivel de concentración, de las muestras sometidas a condición de almacenamiento con aquellas analizadas el mismo día de su preparación (inicial); los CV calculados no exceden el 15% establecido en los criterios de aceptación. Así también, se determinó el porcentaje de la cantidad de cisplatino recuperado en las muestras de estabilidad, encontrándose que estos no superan el $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

Tabla 9. Estabilidad de Cisplatino en plasma, congelada a -20°C durante un mes.

CONCENTRACIÓN (µg/ML)	*R. ALTURAS Inicial	CDDP/E.I. -20 °C/1 mes	% RECOBRO	CV (%)
0.2	0.0232 $\pm$ 0.0001	0.0214 $\pm$ 0.0003	92.40	5.5874
0.5	0.0834 $\pm$ 0.0002	0.0847 $\pm$ 0.0002	101.54	1.0777
1	0.1644 $\pm$ 0.0001	0.1581 $\pm$ 0.0017	96.19	2.7455
2	0.3399 $\pm$ 0.0004	0.3159 $\pm$ 0.0016	92.93	5.1799
4	0.6946 $\pm$ 0.0025	0.6839 $\pm$ 0.0005	98.47	1.0903
10	1.7928 $\pm$ 0.0001	1.7838 $\pm$ 0.0019	99.56	0.3523

* Los datos de relación de alturas para cada nivel de concentración, representan el promedio $\pm$ e.e de tres determinaciones.

9. CANTIDAD MÍNIMA DETECTABLE

Procedimiento: Se preparó una solución de cisplatino con una concentración de 0.5 µg/mL, a partir de esta se realizaron diluciones conteniendo hasta 0.05 µg/mL, y de esta manera evaluar la cantidad mínima que se registra en el cromatograma.

Resultados: El método analítico, para cuantificar cisplatino, detecta una cantidad mínima de 0.1 µg/mL.

10. CANTIDAD MÍNIMA CUANTIFICABLE

Procedimiento: En base a la cantidad mínima detectable se prepararon muestras plasmáticas que contenían esta concentración y se evaluó que fueran cuantificables con precisión y exactitud. En caso contrario se duplica la concentración, hasta obtener aquella que sea cuantificable con exactitud y precisión.

Resultados: En la tabla 10, se muestran los resultados de precisión (CV) y exactitud (% de recobro) para la cantidad mínima cuantificable la cual es de 0.2 µg/mL.

Tabla 10. Precisión y Exactitud para la Cantidad Mínima Cuantificable.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	PRECISIÓN	EXACTITUD
0.2	0.0232828	114.53% (CV=0.2627)

C. Evaluación del crecimiento tumoral

Para evidenciar la acción del cisplatino y la mifepristona, tanto en administración individual como en combinación, sobre los tumores formados con células de cáncer cérvico uterino (HeLa) se graficó la variación del peso tumoral con respecto al tiempo, como se puede apreciar en la figura 12.

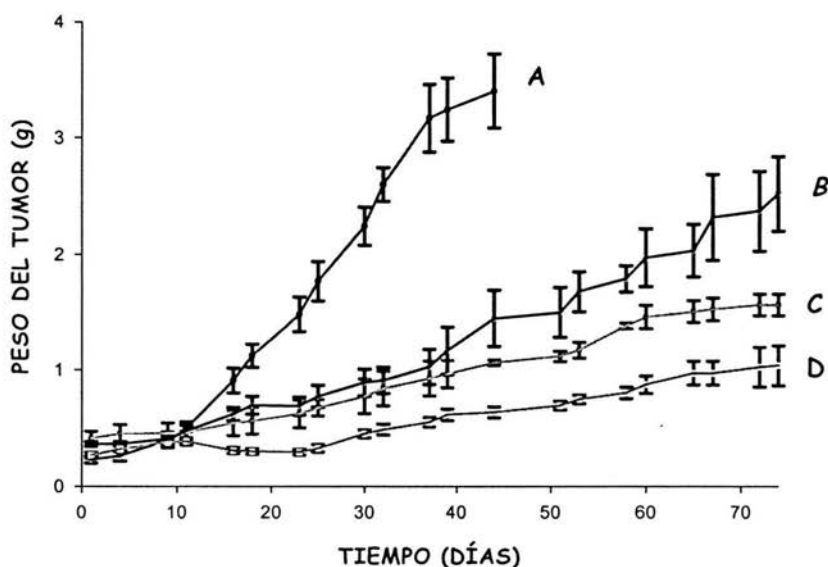


Figura 12. Crecimiento tumoral de CaCu en ratones atímicos ($n=8 \pm e.e$) tratados con: (A) aceite vegetal, (B) mifepristona, (C) cisplatino, y (D) la combinación de mifepristona con cisplatino.

En dicha figura se refleja el rápido crecimiento de los tumores del grupo control quienes alcanzaron el máximo peso tumoral establecido (2 g) a los 30 días después de la administración del vehículo (aceite vegetal); esos datos nos sirven como referencia para evaluar el efecto de los fármacos administrados mediante la comparación de los resultados obtenidos por cada grupo. De esta manera se tiene que el grupo tratado con cisplatino (3 mg/Kg/día durante 4 días) presenta un lento incremento de los tumores formados, al

igual que los tumores expuestos a mifepristona (2 mg/Kg/día durante 4 días). Por otra parte cuando se administro cisplatino en combinación con mifepristona (2 mg/Kg/día de mifepristona durante 4 días, seguido de 3 mg/Kg/día de cisplatino durante los siguientes 4 días) se presento una disminución del peso tumoral ligeramente mayor a la observada en el grupo tratado con cisplatino, lo que nos sugiere una mejor efectividad al emplear la combinación de fármacos.

Sin embargo dichos resultados son mejor apreciados en la figura 13, al tomar en cuenta el volumen relativo del tumor; ya que este valor representa el incremento tumoral, en base al volumen que presentaron al inicio del tratamiento, lo que implica que solo se observe el incremento real del tumor.

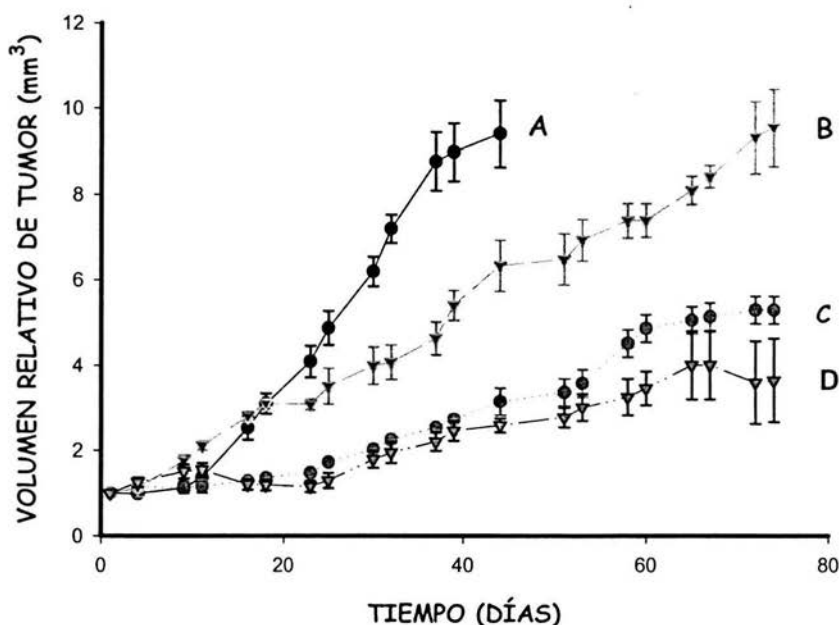


Figura 13. Variación del crecimiento tumoral, en ratones atímicos con tumores de CaCu ($n=8 \pm e.e$) tratados con: (A) aceite vegetal, (B) mifepristona, (C) cisplatino, y (D) la combinación de mifepristona con cisplatino.

Por otra parte la actividad antitumoral del cisplatino se refleja de una manera indirecta en la figura 14; en donde se registra el crecimiento tumoral expresado en área a los 74 días después de administrar los tratamientos. Al tomar como referencia el área alcanzada por el grupo control se advierte el efecto presentado por la mifepristona el cual se destaca por ser parecido al presentado por el cisplatino; a su vez es posible observar que se incrementa la efectividad del cisplatino al administrarlo junto con la mifepristona.

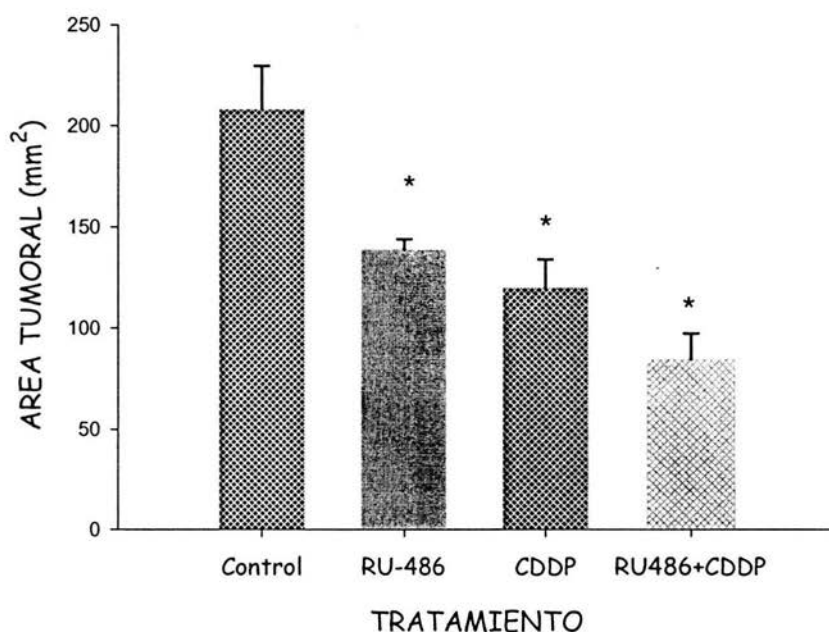


Figura 14. Efecto del cisplatino y mifepristona en el crecimiento de tumores de HeLa, a los 74 días después de administrar cisplatino (CDDP), mifepristona (RU-486), la combinación de cisplatino con mifepristona, y la administración de vehículo en el grupo control ($n=8 \pm e.e$).

* Diferencia estadísticamente significativa con relación al grupo control, utilizando un ANDEVA.

A su vez se registro el peso de cada ratón, durante los 74 días en que se mantuvo a los ratones después del tratamiento con cisplatino (3 mg/Kg/día), mifepristona (2 mg/Kg/día), la combinación de cisplatino y mifepristona (a las dosis antes mencionadas) y el vehículo (0. 15mL de aceite vegetal) durante cuatro días; con la finalidad de determinar comparativamente la toxicidad que presentaran la administración de cada uno de estos fármacos de acuerdo a la variación del peso corporal, figura 15.

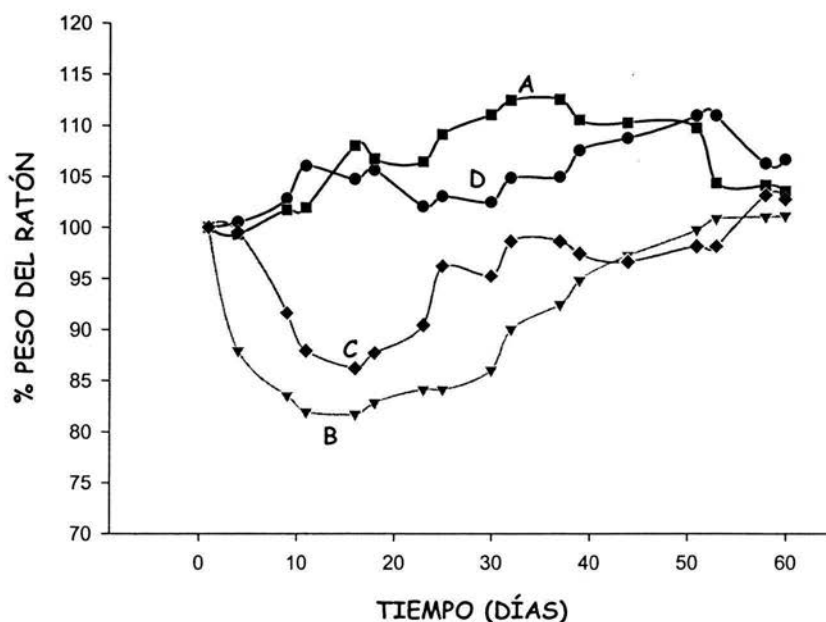


Figura 15. Variación en el peso corporal que presentaron los ratones (n=6), durante 74 días después de la administración de: (A)Vehículo como grupo control, (B) cisplatino, (C) mifepristona, (D) cisplatino en combinación con mifepristona

D. Influencia del antiprogéstgeno mifepristona, sobre la biodisponibilidad sistémica de cisplatino.

Los datos de concentraciones plasmáticas de cisplatino, obtenidas en los diferentes intervalos de tiempo en los que se llevó a cabo el estudio farmacocinético, se graficaron para obtener las curvas de concentración plasmática de cisplatino contra tiempo, figura 16. Cabe mencionar que solo se cuantificó cisplatino durante los primeros 30 min del muestreo, en las tomas siguientes la sensibilidad del método no permitió la detección del antineoplásico; motivo por el cual en la curva solo se presenta el comportamiento farmacocinético durante este tiempo. Observando que las concentraciones plasmáticas circulantes del cisplatino, en el grupo tratado con la combinación de fármacos (mifepristona + cisplatino) presentan una ligera disminución con respecto a las concentraciones plasmáticas del grupo tratado únicamente con cisplatino.

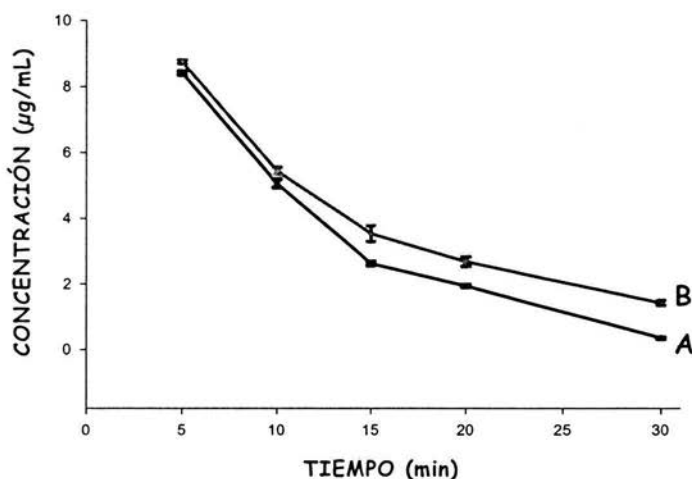


Figura 16. Representación gráfica del curso temporal del cisplatino aplicado por vía intraperitoneal en ratones atímicos; (A) una dosis única de 6mg/Kg de cisplatino, (B) mifepristona 2mg/Kg/día durante cuatro días seguido de una dosis única de 6mg/Kg de cisplatino. Cada punto representa la media de tres animales $\pm$ e.e.

A partir de la figura 16, y con ayuda del paquete WinNonlin versión 2.1, se realizó el análisis farmacocinético de los datos, obteniendo los parámetros de área bajo la curva (ABC), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), concentración al tiempo cero ($C_{t=0}$), la depuración (Cl) y el volumen de distribución (Vd). Los valores de los diferentes parámetros para este modelo analizado se presentan en la tabla 11;

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos de cisplatino, en ratones sometidos a un tratamiento con el antineoplásico solo y en combinación con mifepristona. Los datos representan el promedio $\pm$ e.e de tres animales.

PARÁMETRO	VALOR ESTIMADO	
	CDDP	CDDP + RU486
ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	134.102 $\pm$ 0.488	156.764 $\pm$ 0.992 *
$t_{1/2}$ (min)	6.409 $\pm$ 0.022	8.345 $\pm$ 0.231 *
$C_{t=0}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	14.506 $\pm$ 0.080	13.042 $\pm$ 0.294 *
Cl (mL/min)	44.744 $\pm$ 0.163	38.284 $\pm$ 0.245 *
Vd (mL)	413.674 $\pm$ 2.259	460.579 $\pm$ 10.164 *

* Diferencia estadísticamente significativa $P \leq 0.05$, utilizando una prueba de t-student.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La quimioterapia a base de cisplatino empleada en el tratamiento del cáncer cérvico uterino es altamente efectiva; sin embargo, la progresión que se presenta es debido al empleo de regímenes agresivos, aunado a esto es bien conocido que la posibilidad de presentar resistencia farmacológica se incrementa en terapias que lo emplean como único fármaco. Al mismo tiempo el empleo de este antineoplásico tiene como principal desventaja en el aspecto clínico, los efectos secundarios que se presentan a nivel sistémico, tanto a nivel gastrointestinal, renal como a nivel de sistema nerviosos central, de esto se desprende el interés en la búsqueda de nuevas combinaciones farmacológicas, por lo que en este estudio se observó el resultado de la interacción que hay cuando se aplica un tratamiento previo con mifepristona, un fármaco no antineoplásico.

A. Desarrollo y validación del método analítico por CLAR.

IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO. Para la evaluación del comportamiento sistémico del cisplatino, fue importante contar con un método analítico que nos proporcionara datos confiables, y tomando en consideración que actualmente la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica importante en el análisis de numerosos fármacos antineoplásicos, se desarrollo un método cromatográfico para su análisis.

La conservación y preparación de la muestra plasmática es un paso importante en la determinación cromatográfica de cisplatino; debido a las dificultades y errores que puede causar en el análisis la perdida de CDDP en soluciones acuosas, estó al presentarse el desplazamiento nucleofílico del ion cloro por el agua, formando Cis-dicloro-monoacuodiamino-platino (II); de acuerdo a esto fue prescindible la búsqueda de un proceso de extracción del cisplatino de la matriz biológica.

Primeramente se realizó el proceso de derivatización utilizando a los ditiocarbamatos, estos son altamente empleados en el análisis de trazas de metales, se evaluó exitosamente la aplicabilidad del dietilditiocarbamato de sodio (DDTC) para el análisis del cisplatino presente en muestras plasmáticas, gracias a que este compuesto reacciona cuantitativamente con el Pt(II), al adicionar dos moles de DDTC por un mol de CDDP como se observa en la figura 17; generando un complejo hidrofóbico que absorbe fuertemente en el ultravioleta a una longitud de onda de 254nm.

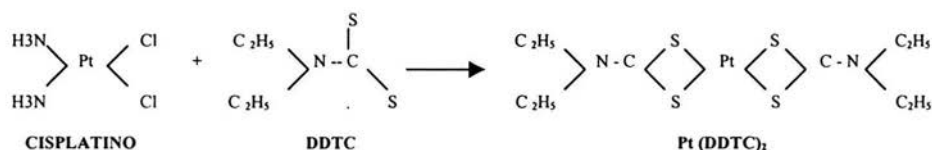


Figura 17. Reacción del Cisplatino con el Dietilditiocarbamato de Sodio.

El rendimiento del aducto formado decrece conforme disminuye el pH, de tal manera que fue necesario preparar el DDTC al 10% en una solución de NaOH 0.1 M para proporcionarle un pH ligeramente básico al medio de reacción, así también se observó que al someterlo durante 15min a una temperatura de 37°C es suficiente para completar la reacción de derivatización y que cualquier incremento en el tiempo de exposición no mejora el rendimiento. El producto de Pt(DDTC)₂ es un precipitado amarillo, lo que nos indica su insolubilidad en agua, por lo cual fue preciso utilizar un solvente para el proceso de extracción, encontrándose que es fuertemente soluble en cloroformo, de esta manera se determinó que 80µL de cloroformo son suficientes para extraer el aducto formado, en la muestra plasmática.

El análisis del Pt(DDTC)₂ localizado en el extracto de cloroformo, se realizó por cromatografía de líquidos fase reversa debido a la naturaleza del aducto, empleando una columna C₁₈ 0.5µm (3.9 x 150mm), la fase móvil utilizada fue una combinación de acetonitrilo, metanol y agua en una proporción de 29:40:31 respectivamente y en donde se

encontró que al realizar cambios en la proporción de los solventes que constituyen la fase móvil, principalmente en la cantidad de acetonitrilo los tiempos de retención y la altura de los picos cambian notablemente, de tal manera que al disminuir la proporción de acetonitrilo aumenta el tiempo de retención y los picos se ensanchan y en general la resolución disminuye; por otra parte si aumentamos dicha proporción los picos se parten, o bien, la separación de cisplatino y cloruro de níquel no se presenta. En cuanto a la cantidad de metanol utilizada para el análisis, cabe resaltar que un cambio en la proporción planteada no altera significativamente el tiempo de retención y solamente se presenta una leve asimetría de los picos tanto para cisplatino como para cloruro de níquel. Se determinó que la velocidad de flujo óptima es de 1.6 mL/min. y de esta forma mantener un tiempo de corrida aceptable en caso de realizar diversos ensayos en un mismo día; así mismo se trabajó a temperatura ambiente; sin embargo, la variación en el tiempo de retención con respecto al cambio de temperatura es notable por lo que se sugiere que dicho parámetro sea controlado alrededor de los 23°C.

Para elegir la longitud de onda se realizó un barrido de la solución que contenía el complejo de Pt(DDTC)_2 , el cual absorbió fuertemente a 254 nm, longitud de onda con la cual se trabajó durante todos los ensayos. La determinación de cisplatino, utilizando un detector de UV-VIS se llevó a cabo con éxito, no obstante presente poca sensibilidad al compararlo con otros métodos de detección ya reportados, como por ejemplo el de absorción atómica, o bien, el fluorométrico. Para estos últimos se ha reportado que si bien detectan cantidades hasta de ng; son altamente inespecífico principalmente el de absorción atómica ya que detecta todo el platino presente en la muestra sin distinguir entre el cisplatino y los productos de degradación, lo cual es un factor importante al realizar estudios de farmacocinética donde el platino activo presente en el plasma es el analito de interés. En cuanto al detector de fluorescencia la detección óptima depende en gran medida de una buena separación del complejo formado y en base a esto de las condiciones de separación como son temperatura, polaridad y viscosidad del solvente, pH, entre otros, lo que en general dificulta el análisis.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO. Finalmente la cuantificación del cisplatino se realizó exitosamente, utilizando el método analítico propuesto; por lo que fue conveniente antes de ser empleado para la detección del antineoplásico en muestras plasmáticas obtenidas durante este estudio, validar el método analítico para hacer confiables y de calidad los datos que resulten del análisis de muestras.

En las figuras 8 y 11, se observa que hay una buena resolución de los picos tanto en solución como en la muestra de cisplatino en plasma, así también, no se presentan interferencias propias de la matriz biológica, ni de productos de degradación. En cuanto a la linealidad del sistema, los valores de coeficiente de correlación $r^2 = 0.999871$, pendiente de $m = 0.180520$, ordenada al origen $b = 0.016116$, y comparando la curva obtenida experimentalmente como aquella calculada por regresión lineal (figura 9), nos demuestran que el método analítico es lineal en el intervalo de concentración de $0.2\text{-}10\mu\text{g/mL}$, resaltando que el coeficiente de correlación para muestras en solución se encuentra dentro de los criterios de aceptación planteados; por otra parte el coeficiente de variación para estos datos nos revela que se presenta una buena precisión para cada nivel de concentraciones (tabla 4).

Para la linealidad del método se obtuvo un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.99975856$, el cual es una buena referencia, tomando en cuenta que se trabajó con un fluido biológico; así también, se demostró que es lineal en el intervalo de $0.2\text{-}10\mu\text{g/mL}$, lo que se observa en la figura 10. A su vez el método analítico propuesto, cumple con las condiciones de especificidad como se muestra en la figura 11, donde no se detectan picos que interfieran con la lectura de los registros para cisplatino y NiCl_2 en plasma, esto al compararlo con un blanco donde se evalúa principalmente la matriz biológica, la cual no contienen componentes que se detecten al mismo tiempo para la longitud de onda empleada durante el análisis; así también es exacto ya que al comparar las concentraciones detectadas en plasma, con los resultados obtenidos para muestras en solución el porcentaje de recobro de cisplatino localizado en plasma es hasta de un 103.62%, con lo cual se puede confiar en los resultados de cada ensayo (tabla 8).

Los resultados obtenidos en los análisis de muestras que contenían cisplatino, efectuados el mismo día, como aquellos realizados en días diferentes, no muestran diferencia significativa al determinar el coeficiente de variación entre cada resultado al encontrarse por debajo del 15% (tabla 6 y 7), nos demuestran que el método es repetible al no presentar variabilidad interensayo; y a su vez es reproducible debido a su baja variabilidad intraensayo. Por otra parte ya que en estudios farmacocinéticos no es posible efectuar el análisis cromatográfico el mismo día de la toma de muestras y teniendo en cuenta la inestabilidad del cisplatino en solución, fue necesario evaluar su estabilidad en las condiciones de almacenamiento utilizadas comúnmente en el laboratorio, de tal forma que después de mantenerlas a -20°C durante un mes y haber realizado el análisis del producto de derivatización, se compararon los resultados de relación de alturas de cisplatino/E.I, con los obtenidos en muestras preparadas recientemente, encontrándose que el coeficiente de variación para cada nivel de concentraciones es menor al 15% establecido como criterio de aceptación asegurando que los resultados presentan repetibilidad; a su vez se determinó la cantidad de cisplatino (expresada en porcentaje) recuperada en las muestras de estabilidad con relación a las muestras analizadas el mismo día de su preparación, reportando que se obtiene un % de recobro para cada nivel de concentraciones entre el 85-115% valores que concuerdan con el parámetro establecido (tabla 9), reflejándose que bajo estas condiciones de almacenamiento las muestras son estables al demostrar que se conserva la concentración de cisplatino inicial. Finalmente la cantidad mínima cuantificable es de $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ al presentar una precisión y exactitud con un coeficiente de variación de 0.2328 y 0.2627 respectivamente, lo cual nos permite realizar el análisis farmacocinético de este compuesto, con la seguridad de poder detectar hasta los puntos mas bajos del estudio. En resumen consideramos que el método es confiable para cuantificar cisplatino en muestras plasmáticas.

B. Comportamiento farmacocinético del cisplatino y evaluación del crecimiento tumoral.

Con lo que respecta a la interacción sistémica entre cisplatino y mifepristona, los resultados farmacocinéticos en base a la concentración plasmática de cisplatino, muestran de manera general el comportamiento de la combinación de estos fármacos. Por una parte en la figura 16, se observa que el grupo tratado previamente con mifepristona presenta un ligero incremento de la concentración de cisplatino circulante, lo cual se refleja en los parámetros farmacocinéticos presentados para esta curva (tabla 11); por ejemplo, se observa una disminución significativa en los valores de depuración del fármaco, al mismo tiempo presenta un ligero incremento en el valor de tiempo de vida media. El principal efecto de estos resultados se refleja en el valor de ABC obtenido, tanto para la curva de cisplatino solo como para aquella representada por la combinación con mifepristona, dichos valores son de 134.1 y 156.7 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ respectivamente. El leve incremento que se presenta en este parámetro es de gran relevancia si tomamos en cuenta que la citotoxicidad de este antineoplásico es proporcional a la exposición total (ABC); de tal manera que al existir una mayor concentración de cisplatino disponible, reflejo de la disminución en la eliminación de cisplatino, podemos considerar que la cantidad de fármaco en el organismo en general se incrementa.

Esta mayor concentración de fármaco circulante al parecer repercute positivamente en la eficacia antitumoral presentada por el antineoplásico al considerar que la respuesta o efecto de un fármaco está estrechamente relacionada a las concentraciones plasmáticas del mismo, siendo posible predecir que cualquier alteración en la cantidad de cisplatino produce cambios en su actividad. En la figura 14, se observa claramente que si bien no se presenta una eliminación de los tumores de CaCu en los ratones tratados con mifepristona como único agente, sí se muestra una área tumoral de 138.84 mm^2 a los 74 días después de la aplicación del fármaco muy semejante a la alcanzada por la administración de cisplatino

siendo esta de 120.08 cm², esto nos indica que el antiprogéstágeno por sí solo es capaz de producir un efecto farmacológico, al provocar una disminución significativa del crecimiento tumoral al compararlo con el grupo control quien alcanzó un área de 208.2 mm². A su vez se advierte un leve incremento del efecto antitumoral del cisplatino al administrarlo en combinación con mifepristona, alcanzando un área tumoral de 84.53 mm² (crecimiento del 60 % comparando con el grupo control), valor que está por debajo del expresado por el antineoplásico solo. Comportamiento similar se presentó al evaluar el efecto de la combinación de estos fármacos sobre un modelo *in vivo* de cáncer de ovario; en dicho ensayo el grupo tratado previamente con mifepristona presentó un incremento en la sensibilidad de las células tumorales al cisplatino, lo cual se reflejó en la inhibición de los tumores alcanzando hasta 21.55% de tamaño tumoral en relación al grupo control⁴⁸. Por otra parte, estos resultados concuerdan con los efectos producidos al emplear otros antineoplásicos para mejorar la sensibilidad al cisplatino; por ejemplo, en diversos estudios fase II se ha observado que al administrar gemcitabina, doxorrubicina e ifosfamida el cisplatino presenta una evidente actividad sobre cáncer cervicouterino^{49, 50, 51}; de la misma manera al evaluar el comportamiento de estas combinaciones sobre modelos tumorales *in vivo* se advierte que cuando se combina cisplatino (6.6 mg/kg) con ifosfamida (350 mg/kg) se presenta una respuesta del 67 al 86 % en relación al tamaño tumoral⁵², semejante resultado se observó al administrar doxorrubicina intraperitonealmente a ratones desnudos con tumores de 8-10 mm de diámetro obteniendo un crecimiento tumoral del 56 % en cuanto al tamaño de los controles⁵³. A su vez cuando se empleó junto con gemcitabina los tumores formados presentaron un tamaño del 40 % en relación al grupo control, posiblemente debido al incremento de Pt unido al ADN⁵⁴.

El cambio en la actividad antitumoral que presentó el cisplatino, al emplearlo en combinación con mifepristona, se puede explicar si consideramos que el equilibrio de distribución del fármaco entre el tejido sanguíneo y otros fluidos corporales es instantáneo además de mantenerse durante todo tiempo; de tal manera, que la concentración plasmática de cisplatino al representar la cantidad del antineoplásico en otros tejidos, nos sugiere un aumento del fármaco disponible para penetrar en las células tumorales. Aunado a esto en

previos estudios a nivel *in-vitro* realizados en el laboratorio¹⁷ utilizando la línea celular de cáncer cérvico uterino (HeLa), se advirtió que al emplear la combinación de mifepristona con cisplatino se produce un incremento de la concentración intracelular del antineoplásico; además se ha demostrado que se requiere una gran cantidad de moléculas de cisplatino para unirse a una macromolécula de ADN y así provocar la inhibición de la replicación⁵⁵. En base a estas características es comprensible suponer que al existir más cisplatino en las células tumorales, la cantidad de aductos formados con el ADN se incrementa promoviendo la muerte celular y por ende la disminución del tamaño tumoral.

Por otra parte en la figura 12 y 13, se aprecia de una manera más clara la potencial eficacia de la combinación de estos fármacos, al visualizar el lento incremento de los tumores. Los resultados revelan que la mifepristona es capaz de potenciar la actividad antitumoral del cisplatino, posiblemente al incrementar su actividad citotóxica mediante acciones proapoptóticas como se describe en ensayos realizados sobre células (HeLa)¹⁷ en donde se presentó una disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo que produjo a nivel celular un efecto antiproliferativo sinérgico. Similar efecto se observó en un ensayo realizado con líneas celulares de cáncer de ovario fármaco resistentes, en donde la mifepristona aumentó la quimiosensibilidad de líneas celulares fármaco resistentes a cisplatino a través de la regulación de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax.^{13, 14}. Por lo tanto es posible que al promover la disminución del crecimiento en las células tumorales posiblemente por acción de estos mecanismos se presente el incremento observado en la actividad antitumoral del cisplatino en los ratones tratados con la combinación de fármacos.

El peso de los ratones tratados con mifepristona presentan, una variación con respecto al tiempo similar al comportamiento observado en el grupo control. Mientras que aquellos ratones que recibieron una dosis de cisplatino de 3µg/Kg/día durante cuatro días, así como los que se trataron previamente con 2µg/Kg/día de mifepristona durante cuatro días; presentaron una disminución del peso corporal del 20% y 14% respectivamente, alrededor del día 15 después de la administración. Los pesos corporales exhibidos al inicio

del tratamiento fueron recuperados por cada ratón cerca del día 35 posterior a la aplicación de la dosis. Estos resultados muestran indirectamente que la toxicidad del cisplatino se ve disminuida al emplearlo junto con el antiprogestageno; sin embargo cabe resaltar que el por ciento de disminución de peso en ambos casos es elevado, lo que sugiere que la dosis de cisplatino empleada en el estudio fue alta, dando como resultado la muerte de dos animales del grupo tratado con cisplatino; tal vez debido a la toxicidad nefrotóxica característica de este fármaco y que se acentuó al exponerse a una mayor concentración de cisplatino. Cabe resaltar que no obstante al administrar misfepristona se provocó un aumento en la concentración del fármaco a nivel sistémico, no se presentó una elevación en cuanto a la toxicidad del cisplatino, medida por la variación del peso presentada; dicha toxicidad se esperaba debido a que el daño nefrotóxico se considera dependiente de la dosis y por ende de la cantidad de fármaco disponible; sin embargo, existen reportes de estudios clínicos donde indican que la misfepristona reduce náuseas, hiperémesis y diversas toxicidades de agentes antitumorales³³ y tal vez debido a estas características no se acentuó la toxicidad del antineoplásico. A pesar de la considerable disminución del peso corporal de los ratones tratados con los diferentes tratamientos, al final del estudio todos los animales alcanzaron un peso similar al del grupo control.

Finalmente estos datos proponen la continuación de los estudios, con la finalidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas que incorporen a la mifepristona en combinación con cisplatino, y lograr incrementar su efecto farmacológico así como disminuir sus efectos secundarios en pacientes tratados con dicho antineoplásico.

IX. CONCLUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos se concluye que el método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), propuesto para cuantificar cisplatino en micromuestras de plasma ultrafiltrado, demostró ser rápido, sensible, lineal, reproducible y exacto en el rango de 0.2-10µg/mL; así también, no se reportaron interferencias debido a la matriz de la muestra ni de algún producto de degradación. Por otra parte es conveniente que la muestra a estudiar sea rápidamente ultrafiltrada para remover las proteínas e inmediatamente analizada o refrigerada a -20°C para asegurar que el método cumpla con las características antes mencionadas.

Por otra parte el antiprogestageno mifepristona demostró capacidad para incrementar el efecto antitumoral del cisplatino, al provocar un incremento en la concentración plasmática de antineoplásico, efecto que causó una disminución en el tamaño de los tumores de cáncer cérvico uterino implantados en ratones atímicos. Al mismo tiempo, que se presentó una buena tolerancia a la combinación de fármacos al grado de influir positivamente en la regulación de la toxicidad en base a la disminución del peso corporal.

Tomando en cuenta lo anterior, se sugiere continuar con los estudios para demostrar que el empleo de una terapia a base de cisplatino en combinación con mifepristona, podría ser considerada una útil alternativa terapéutica contra el cáncer cérvico uterino.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cisneros MT, Espinosa R, Pineda BE. Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. *Salud Pública Mex* 1987; 29: 299-312.
2. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud México. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compendio Mortalidad y Morbilidad 1998
3. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al.: Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1999; 17 (5): 1339-1348
4. Morris M, Eifel PJ, Lu J y col. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340 (15): 1137-1143
5. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB y col. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340 (15): 1144-1153
6. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, et al.: Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340 (15): 1154-1161
7. Peters WA, Liu PY, Barrett RJ y col. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18 (8): 1606-1613
8. Thompson SW, Davis LE, Kornfeld M, Hilgers RD, Standerfer C. Cisplatin neuropathy clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. *Cancer* 1984; 54:1269
9. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; 23(5): 460-464.
10. Pieter P, Lippard SJ. Cisplatin and related drugs. New York: Academic press, 1997: 392-409

11. Kartabu M, Essigmann J. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478(2): 23-43
12. Donaldson MS, Dorflinger L, Brown SS y col. Clinical applications of mifepristone (RU486) and other antiprogesterin. Washington: Natl. Academy Press, 1993: 36-41
13. Moodlea M, Moodley J, Chetty R, Herrington C. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: review. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13(2): 103-110
14. Rose FV, Barnea ER. Response of human ovarian carcinoma cell lines to antiprogesterin Mifepristone. *Oncogen* 1996; 12: 999-1003
15. Qin TN, Wang LL. Enhanced sensitivity of ovarian cell line to cisplatin induced by mifepristone and its mechanism. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2002; 22(4): 344-346
16. Rose FV. BCL-2 family protein expresión and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2000; 82(2): 436-446
17. Álvarez A. Efecto del antiprogesterino, mifepristona, sobre la citotoxicidad de cisplatino en células HeLa. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. México D.F. FES-Zaragoza, UNAM 2003
18. Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ, Hoffman BB. Farmacología integrada. Madrid: Harcourt Brace, 1997: 501-502
19. Gonzáles BM, Castro J. Concepto de oncología médica. Oncología Clínica. 2a. ed. España: Editorial Interamericana, 1998: 8,9
20. Alberts B, et. al. Molecular Biology of the cell. Third edition. New York: Garland, 1992: 1345-1387
21. Berrocal A, Noguerón E, Campos C. Principios de la carcinogénesis. Oncología Clínica. 2a. ed. España: Editorial Interamericana, 1998: 11
22. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N y col. Prevalence of human papiloma virus in cervical cancer: A world wide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802
23. Cramer DW. Uterine cervix. Cancer by tissue of origin. En: Schottenfeld D, Fraumeni JF, ed. Cancer epidemiology and prevention. Philadelphia: Saunders WB, 1982; 51: 881-897

-
24. Flórez J, Armijo JA. Quimioterapia Antineoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos. En: Flórez J. Farmacología humana. 2a. ed. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas, 1992: 921
 25. Walker J, Sartorelli C, Howard M. Uterine Cervical Carcinoma: comparison of standard and pharmacokinetic analysis. *Cancer Research* 1998; 58: 3598-3602
 26. Velasco MA, Lorenzo FP, Serrano MJ. Farmacología. 16a. ed. España: Editorial Interamericana Mac-Graw Hill, 1993: 3-45
 27. Calabresi P, Chabner B. Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Goodman y Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Ninth edition. New York: International Edition Mac-Graw Hill, 1996: 1225-1279
 28. Sydney E, Salmon M, Sartorelli A. Quimioterapia del cáncer. En: Katzung AG. Farmacología básica y clínica. México: El manual moderno, 1991: 685
 29. Bertino JR. Fármacos antineoplásicos. En: Smith CM, Reynara AM. Farmacología. Bogotá: Editorial Panamericana, 1993: 887
 30. Bertino JR, Ting-Chao C. Chemotherapy. New York: Academic press, 1997: 368-379
 31. Bauliau EE. RU-486-A decade on today and tomorrow. In: Donaldson MS, Dorflinger L, Brown SS, Benet LZ. Clinical Applications of Mifepristone (RU-486) and other Antiprogestins. Washington: Natl. Academy Press, 1993: 71-119
 32. Calabresi P, Chabner B. Hormones and hormone antagonist. In: Goodman y Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Ninth edition. New York: International Edition Mac-Graw Hill, 1996: 1411-1437
 33. Herr I, Ucor E, Herzer K, Okovoyo S, Ridder R, Krammer PH. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas: *Cancer Res* 2003; 63(12): 3112-3120
 34. Donaldson MS, Dorflinger L, Brown SS, Benet LZ. Clinical Applications of Mifepristone (RU486) and other Antiprogestins. Washington, DC: Natl. Academy Press, 1993: 36-41
 35. Rose FV, Barnea ER. Response of human ovarian carcinoma cell lines to antiprogesterin Mifepristone. *Oncogen* 1996; 12: 999-1003

-
36. Jihan A Youssef, Mostafa Z. Hepatocarcinogenic potencial of the glucocorticoid antagonist RU486 in B6C3F1 mice: effect on apoptosis expression of oncogenes and the tumor suppressor gene p53. *Molecular Cancer* 2003; 2(3): 294-301
 37. Herrl, UcorE, Herzer K, Okovoyo s; Ridder R, Krammer PH. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas: *Cancer Res.* 2003; 63(12): 3112-3120
 38. Rocereto T, Saul H, Aikins J, Paulson J. Phase II study of mifepristona (RU486) in refractory ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 77(3): 429-32
 39. Thomas FR, Howard MS, James AA, James P. Phase II Study of Mifepristone (RU486) in Refractory Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology* 2000; 77: 429-432
 40. Howell SB. Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. New York: Plenum Press, 1991: 335-540
 41. Long DF, Repta AJ, Sternsons LA. The Reactivity of Cisplatin in Plasma. Implications for Sample Handling in Pharmacokinetic Studies. *International Journal of Pharmaceutics* 1980; 6: 167-173.
 42. Sundauist WI, Lippard SJ. The coordination chemistry of platinum anticancer drugs and related compounds with DNA. *Coord. Chem. Rev* 1990; 100: 293-322
 43. Zahid H, Siddik . Cisplatin: mode of citotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279
 44. Lloyd, S.; Kurkland, J. Practical HPLC Method Development. Second Edition. A Willey-Interscience Publication John Wiley and Sons, INC. United Estates of America, 1997: 233-266
 45. Karnes T, Shiu G. Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutical Research* 1991; 4: 421-426
 46. Secretaria de Salud (SSA) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSAI-1998
 47. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validations, 1998.
 48. Liu y, Wang ll, Deng Y. Enhanced of antitumor effect of cisplatin against human ovarian carcinoma cell by mifepristone in vivo. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2003; 23(3): 242-242

-
49. Mutch DG, Bloss JD. Gemcitabine in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 8-15
 50. Trope C, Horvath G, Haadem K, Gudmundsson T, Simonsen E. Doxorubicin-cisplatin combination chemotherapy for recurrent carcinoma of the cervix. *Cancer Treat Rep* 1986; 70(11): 1325-1331
 51. Buda A, Dell'Anna T, Signorelli M, Mangioni C. Role of ifosfamide in cervical cancer: an review. *Oncology* 2003; 65: 63-66
 52. Thigpen T, Lambuth B, Vancw R. Ifosfamide in the management of gynecologic cancers. *Semin Oncol* 1990; 17: 91-98
 53. Kawabata M, Hosokawa H, Katoh K, Izumi R. Sensitivity of antineoplastic agents in squamous cell carcinoma of the uterine cervix xenografted into nude mice. *Gan To Kagaku Ryoho* 1997; 14(11): 3058-3063
 54. Moufarij MA, Phillips DR, Cullinane C. Gemcitabine potentiates cisplatin cytotoxicity and inhibits repair of cisplatin-DNA damage in ovarian cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 2003; 63(4): 862-9.
 55. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life* 2000; 57: 1229-11237