



“Farmacocinética pre-clínica del nuatigenósido y otras biomoléculas radiomarcadas obtenidas del extracto semipurificado de raíces de *Solanum sisymbriifolium* Lam ”

Q.F. Jorge Iliou

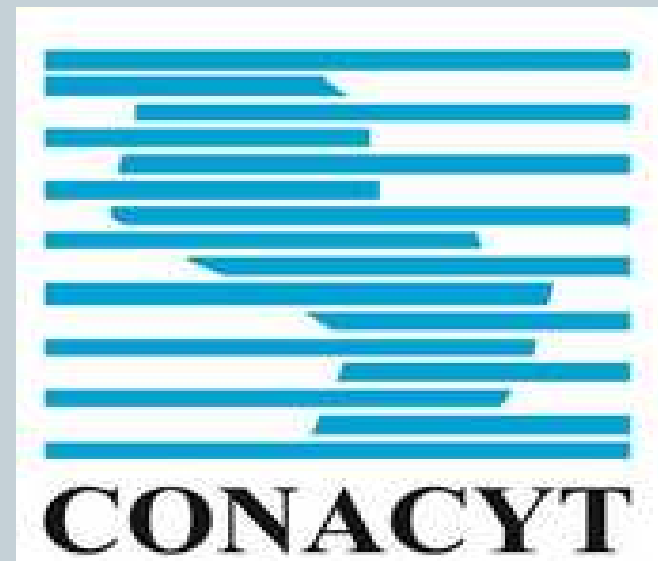
CENTIS, Cuba – 12/2015

PROGRAMA DE VINCULACIÓN DE CIENTÍFICOS
Y TECNÓLOGOS 2015



Agradecimientos al

CONACYT



Investigadores colaboradores



- Ignacio Hernández González, Jefe del Departamento de Desarrollo , CENTIS
- Mariela León Pérez, Especialista, Dpto. de Desarrollo, CENTIS
- Yusniel Castro Alfonso, Especialista, Dpto. de Desarrollo, CENTIS
- René Leyva Montana, Director de Producción, CENTIS

Objetivos



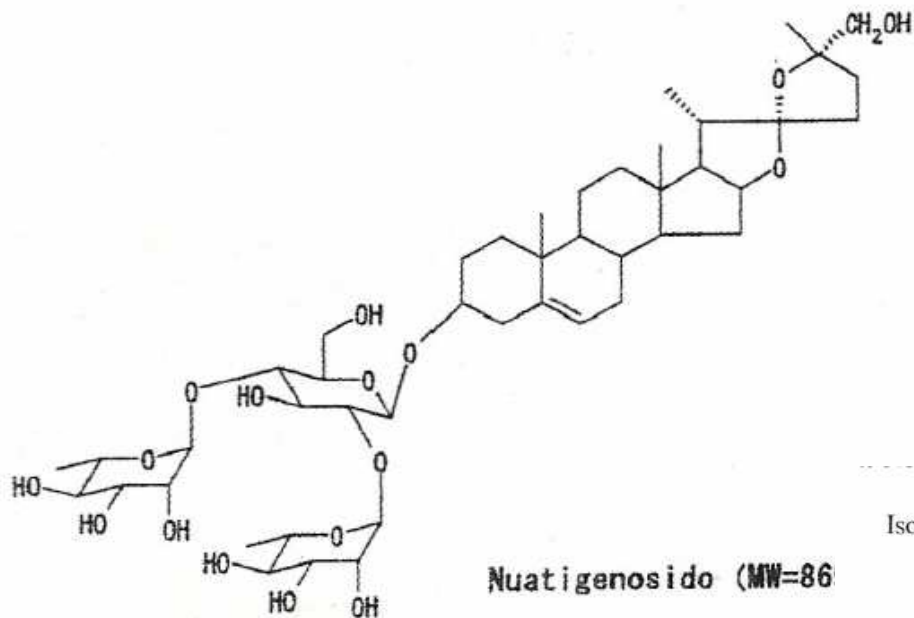
General:

- **Determinación de la farmacocinética pre-clínica del nuatigenósido y otras biomoléculas radiomarcadas obtenidas del extracto semipurificado de raíces de *Solanum sisymbriifolium* Lam.**

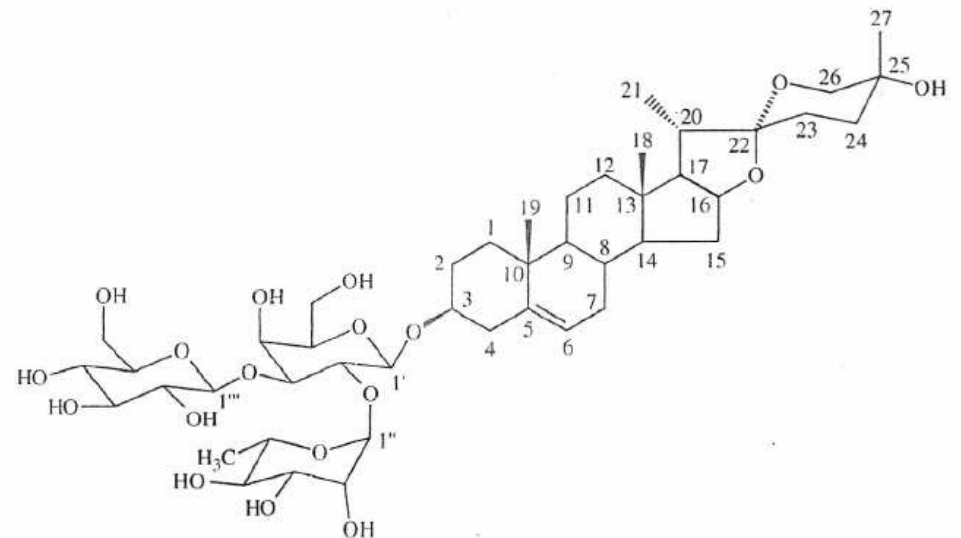
Específicos:

- Validación de la metodología de marcaje radioisotópico de biomoléculas.
- Determinación de parámetros (k_a , k_e , $t_{1/2}$, B_{di} , V , Cl) farmacocinéticos del extracto conteniendo la biomolécula radiomarcada nuatigenósido y otras biomoléculas.

Nuatigenin-3-O-beta-chacotriose



Isonuatigenin-3-O-β-solatriose (1) (0.01% from powdered air-dried roots).



Nuatigenin-3-O-b-chacotriose

Algunas publicaciones en Revistas Científicas Internacionales Arbitradas

- **Ibarrola, DA; M.C. HELLION-IBARROLA; FERRO, E.A** *The hypotensive effect of the crude root extract of Solanum sisymbriifolium Lam. in normo and hypertensive rats.. Journal of Ethnopharmacology, v. 54 , p. 7-12, 1996.*
- **E.A. FERRO; ALVARENGA, N; Ibarrola, DA; HELLIÓN-IBARROLA, M.C.; A.G RAVELO** *A new steroidal saponin from Solanum sisymbriifolium roots. Fitoterapia.. Fitoterapia, v. 76 , p. 577-579, 2005.*
- **Ibarrola, DA; HELLIÓN-IBARROLA, M.C.; ALVARENGA, N; FERRO, E.A; HATAKEYAMA, N; SHIBUYA, N; YAMAZAKI, M.; MOMOSE, Y; YAMAMURA, S; TSUCHIDA, K** *Cardiovascular action of Nuatigenosido from Solanum sisymbriifolium.. Pharmaceutical Biology, v. 44 5 , p. 378-381, 2006.*
- **Ibarrola, DA; M.C. HELLION-IBARROLA; Y. MONTALBETTI; O. HEINICHEN; M. CAMPUZANO; M. L. KENNEDY; N. ALVARENGA; E.A. FERRO; DÖLZVARGAS, JH.; MOMOSE, Y** *Antihypertensive effect of nuatigenin- 3-O-b-chacotriose from Solanum sisymbriifolium Lam. (Solanaceae) (nuatî pytâ) in experimentally hypertensive (ARH+DOCA) rats under chronic administration.. Phytomedicine, v. , p. -, 2011.*
- **Ibarrola, DA; M.C. HELLION-IBARROLA; O. HEINICHEN; Y. MONTALBETTI; M. CAMPUZANO; M. L. KENNEDY; MOMOSE, Y** *Evaluación de mecanismo antihipertensivo del nuatigenósido aislado de Solanum sisymbriifolium Lam (ñuati pytâ) en preparaciones aisladas.. In: VII Congreso de Ciencias Químicas, 2011 Asunción Revista de la Federación de Químicos del Paraguay. 2011. Palabras Clave: Nuatigenosido; órganos aislados; Vasodilatador*

Estudios previos de la biomolécula



- TLC con solventes para control de calidad del marcaje (**metanol 10%, metanol 50%**)
- Curva de calibración UV del NTG sin marcar
- Barrido de HPLC con detector UV

Características de los isótopos



^{125}I

- $t_{1/2}$: 59 días

Muy baja energía:

- Significant high-energy emissions: Gamma-rays at 35.5 keV (7% emitted)
- 93% internally converted to:
 - 3.643 keV (86% as K-conversion)
 - 30.5-31.1 keV (11% as L-conversion)
 - 34.5-35.3 keV (3% as M- or N-conversion)
- 1.4 X-rays per decay (average) from K_{α} (27 keV) and K_{β} (31keV)
- 1.25 LMM Auger electrons (average) at 3.021 keV

Características de los isótopos



^{99m}Tc

- $t_{1/2}$: 6 horas
- Emite de rápida detección 140 keV gamma rays y X 18,4 keV
- Alta energía permite la generación de imágenes

Marcaje



^{125}I

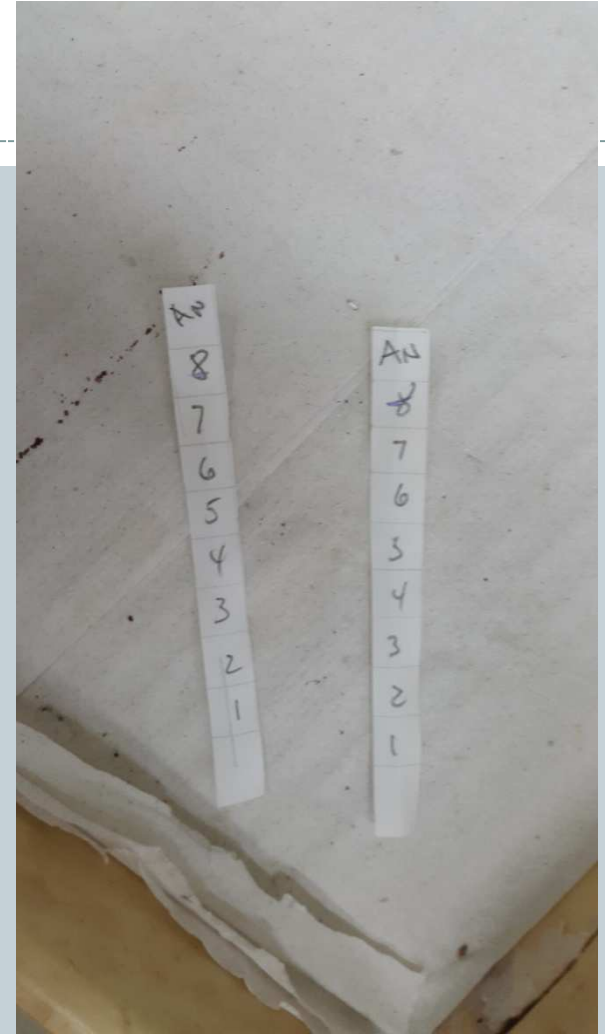
- 150 μL buffer + 100 μL NTG (**dosis 1mg/kg**)
- 150 μL buffer + 50 μL ^{125}I (dilución) Secado en atm de N_2
- 150 μL buffer + 100 μL NTG + 20 μL dilución ^{125}I
- 20 minutos de reacción (agitación c/ 5 min)
- Purificación del producto marcado
(eliminación de residuos de yoduro) SepPak
- Obtención fracciones $\text{H}_2\text{O}:\text{TFA}$ y **MetOH:TFA**
- Medición de actividad **832 μCi** fracción MetOH:TFA



Control de calidad del marcaje

Rendimiento del marcaje: 81,3 %





Marcaje con ^{99m}Tc



- Sistema reductor **glucoheptonato/Sn**
- Sistema reductor pirofosfato/Sn

Preparación de la formulación a administrar



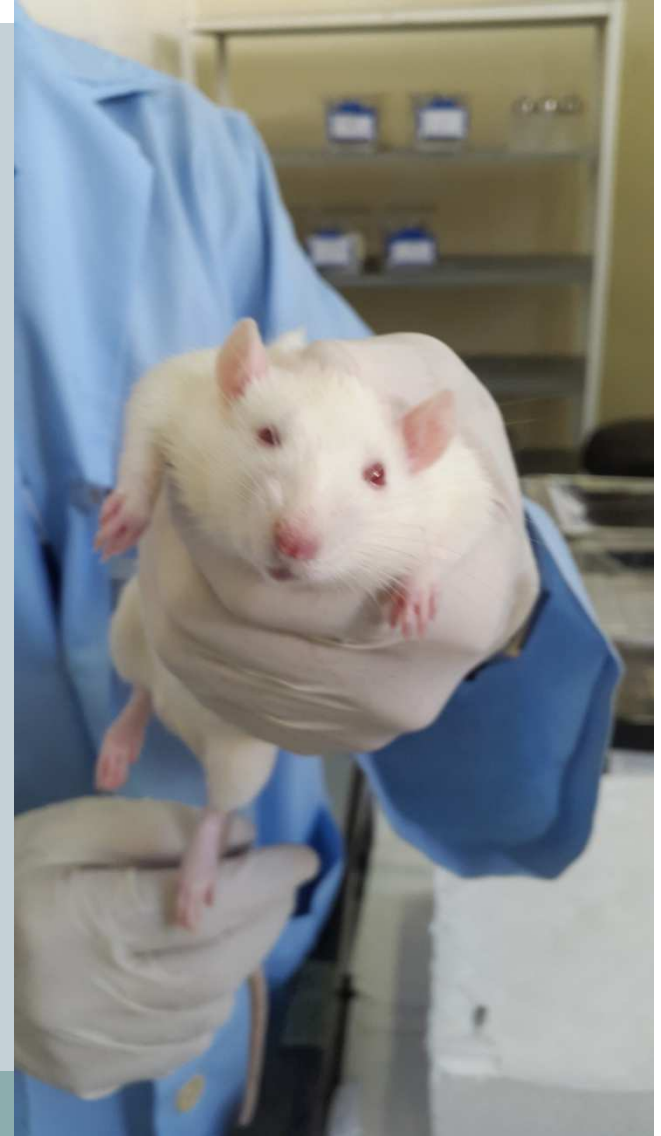
- El producto del marcaje purificado se incorpora a una formulación apropiada conteniendo la molécula hasta lograr la concentración y actividad específica requerida.

Reactivo biológico



Ratas machos sanos del CENPALAB con un rango de masa corporal de **230-250 g**.

Antes de la realización de los ensayos se mantuvieron en condiciones convencionales de alojamiento en jaulas de policarbonato (Tecniplast, Italia) con encamado de bagazo, agua y alimento peletizado *ad libitum*.



Diseño experimental



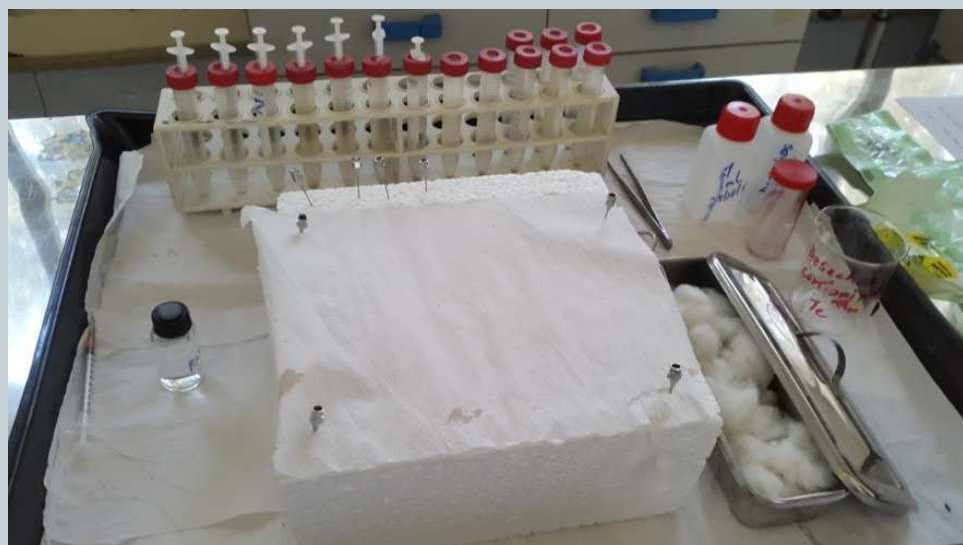
Grupo	Animal	Tiempo de muestreo de sangre						
		1*	30 min	1h	3h	6h	12 h	24 h
1	1	X		X				
	2	X		X				
	3	X		X				
	4	X		X				
2	5	X	X			X		
	6	X	X			X		
	7	X	X			X		
	8	X	X			X		
3	9	X			X		X	X
	10	X			X		X	X
	11	X			X		X	X
	12	X			X		X	X

X

Muestreo de sangre.

Muestreo de órganos y tejidos.

Preparación de jeringuillas y recipientes de muestreo

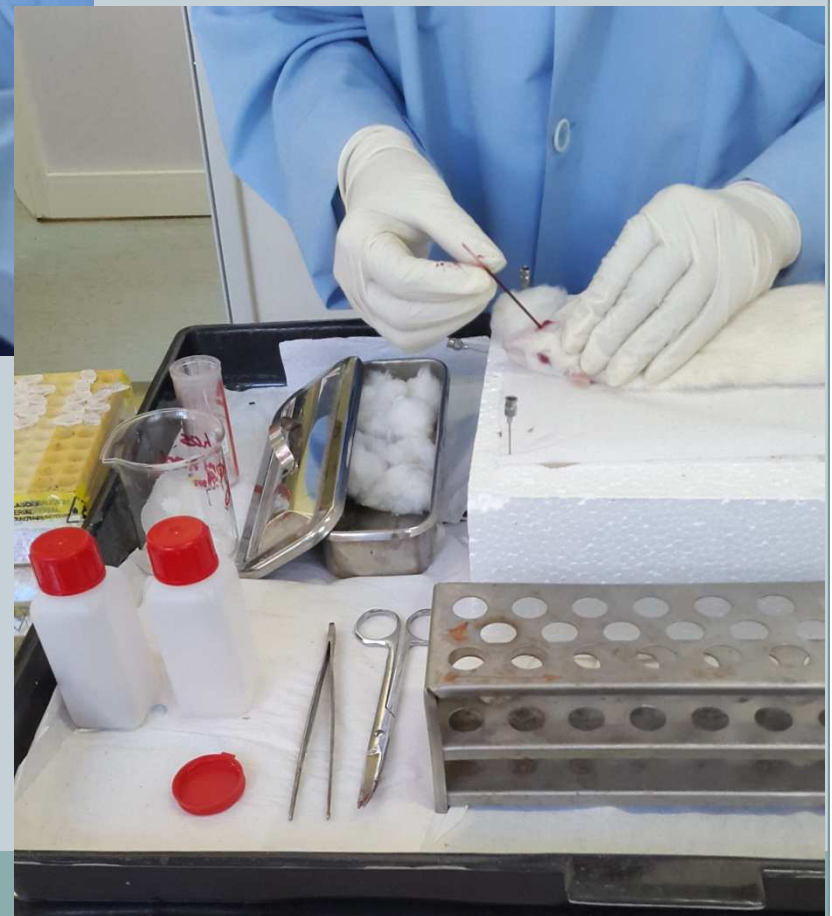


DOSIS: 2,41 μg NTG/animal

Concentración: 1,24 mg/mL

Volumen a administrar:
0,24 mL/animal

Administración y toma de muestra







Posterior a la eutanasia se realizó la disección para la colecta de los siguientes órganos y tejidos:

- Hígado
- Bazo
- Riñones
- Corazón
- Pulmones
- Tiroides
- Cerebro

Cálculos y análisis estadísticos



Planilla de recogida de datos en estudios de biodistribución y farmacocinética

INC.R.IT.003-2

MUESTRAS DE DISECCIÓN

Fecha:

16-12-15

Grupo experimental:	2	No. de animal:	4	No. De jeringuilla	4	Peso:	238.2	Hematocrito:	
ADMINISTRACIÓN				EUTANASIA					
Fecha y hora	16-12-15 13:27			Fecha y hora	17-12-15 13:27				
Muestra de órgano o tejido	Código muestra	Masa			Medición:		Unidad:		
		Vial vacío	Vial lleno	Diferencia	Valor	Tiempo	Fecha y Hora		
Higado	Hi-2-4	2.7609	3.7344	0.9735	17896	0.2	17-12-15 13:55		
Bazo	Ba-2-4	2.7988	3.1915	0.3927	5709	0.2	17-12-15 13:55		
Riñones	Ri-2-4	2.7942	4.5759	1.7817	37487	0.2	17-12-15 13:55		
Corazón	Co-2-4	2.8279	3.6903	0.8624	10528	0.2	17-12-15 13:55		
Pulmones	Pu-2-4	2.7742	3.9604	1.1862	19887	0.2	17-12-15 13:55		
Tiroides	Tr-2-4	2.8217	2.8941	0.0724	1612	0.2	17-12-15 13:55		
Cerebro	Cer-2-4	2.7927	4.4221	1.6294	1676	0.2	17-12-15 13:55		



- Se calculó el por ciento de dosis acumulada y el por ciento de dosis por mililitro en cada muestra de plasma. A partir de estos datos se determinó la concentración en unidades de masa equivalente de la molécula en las muestras. Para ello se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel especialmente programada para esos fines.

Otras mediciones						Promedio	Unidad	Fecha y Hora	
Estándar:	59856	59849	60449			60051		17-12-15 14:05	
Fondo:	11	4	12	13		10		17-12-15 14:05	

RESULTADOS	Animal 4		Animal 5		Animal 6		Animal 4		Animal 5							
	Jeringuilla 4		Jeringuilla 5		Jeringuilla 6		Jeringuilla 4		Jeringuilla 5							
	Factor	1.02	Factor	1.00	Factor	1.05	Factor	1.02	Factor	1.00						
Muestra	%D	%D/g	%D	%D/g	%D	%D/g	%D	%D/g	%D	%D/g	%D		%D/g			
	promedio	D.E.	C.V.	promedio	D.E.	C.V.										
Hígado	0.30	0.31	0.25	0.41	0.20	0.25					0.25	0.05	20.60	0.32	0.08	24.52
Bazo	0.10	0.25	0.12	0.35	0.08	0.21					0.10	0.02	20.47	0.27	0.07	26.38
Riñones	0.64	0.36	0.97	0.49	0.45	0.24					0.69	0.26	38.01	0.37	0.12	34.12
Corazón	0.18	0.21	0.34	0.27	0.09	0.09					0.20	0.13	62.94	0.19	0.09	48.70
Pulmones	0.34	0.29	0.22	0.21	0.18	0.13					0.25	0.08	32.96	0.21	0.08	37.74
Tiroides	0.03	0.38	2.05	22.13	15.48	79.95					5.85	8.40	143.49	34.15	41.13	120.42
Cerebro	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02					0.03	0.00	12.20	0.02	0.00	5.95

Monolix, versión 4.3.2, Lixoft, Paris, Francia



- Utilizando el sistema MONOLIX se determinó el modelo estructural de mejor ajuste de los perfiles de concentración en plasma con relación al tiempo y se realizaron los cálculos de los parámetros farmacocinéticos.

DESCRIPTION:

Ensayo preclínico, OCC, dos absorciones simultáneas, dos picos de absorción

INPUT:

parameter = {ka1, ka2, Tlag, V, k}

PK:

compartment(cmt=1, concentration=Cc, volume=V)

absorption(cmt=1, ka=ka1)

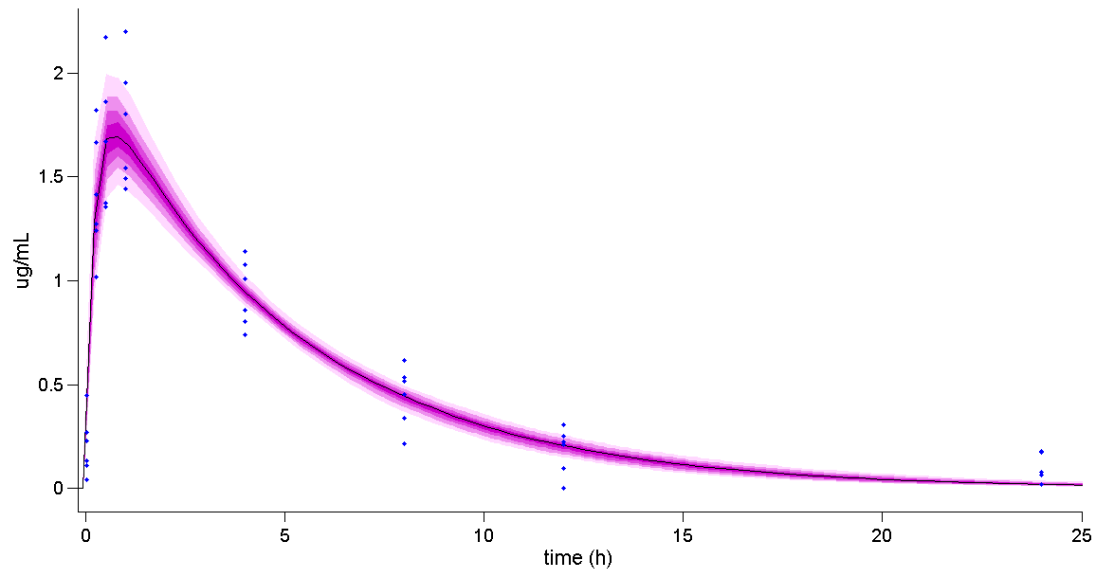
absorption(cmt=1, ka=ka2, Tlag)

elimination(cmt=1, k)

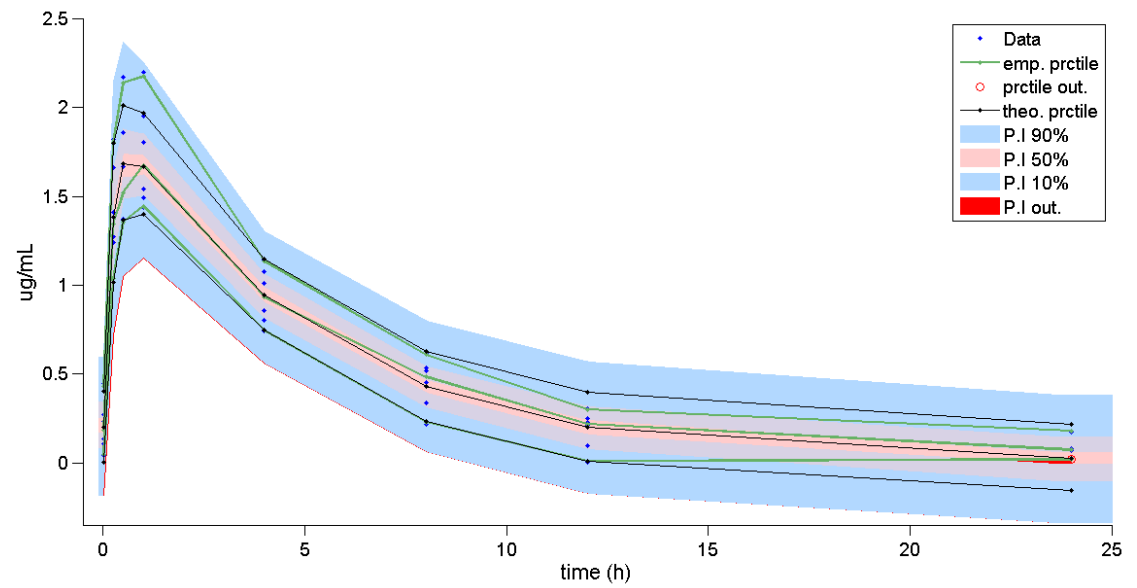
OUTPUT:

output = {Cc}

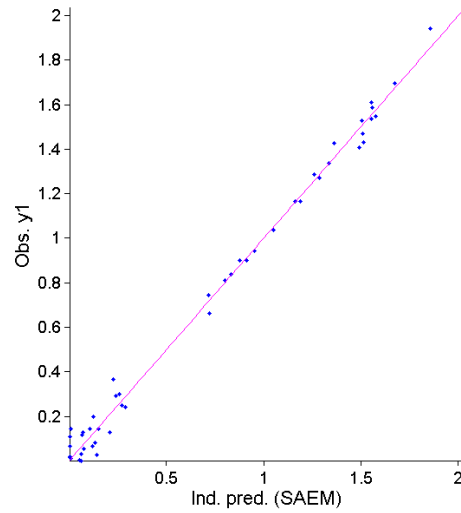
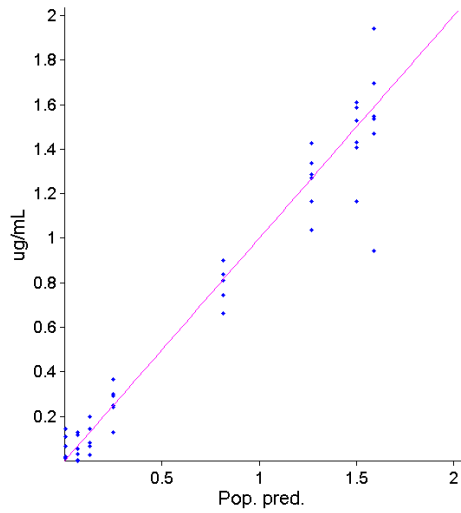
Resultados



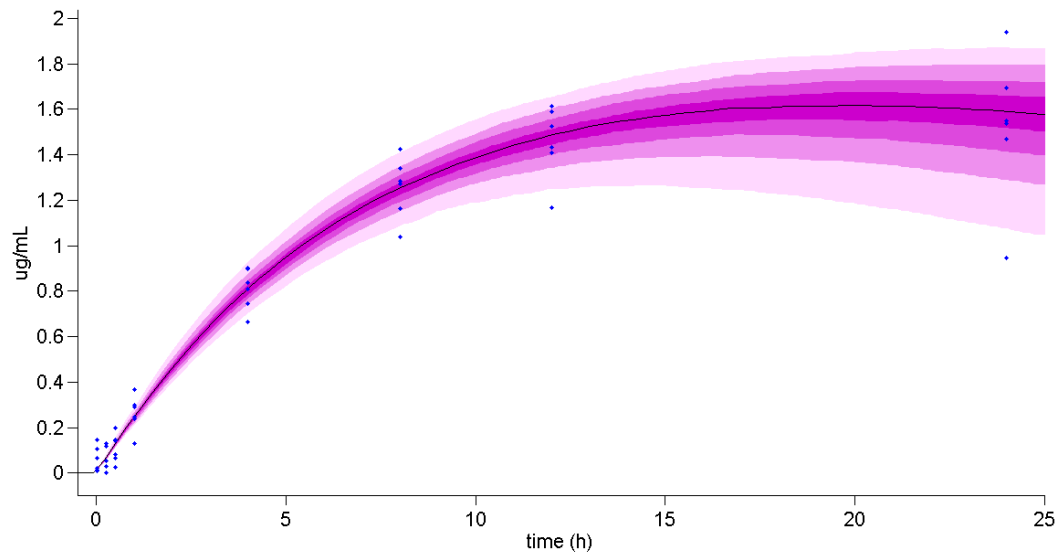
Pico N° 1



Resultados



Pico N° 2



Discusión y conclusión



- Marcaje óptimo con ^{125}I de la biomolécula de interés, se requieren de métodos de purificación más selectivos antes del marcaje.
- Con relación al primer pico máximo de absorción, éste se logra a las 1,2 h; se observa un volumen de distribución elevado y bajo porcentaje de captación en órganos, lo que permite concluir en primera instancia, que la sustancia posee un $t_{1/2}$ de eliminación muy pequeño (rápida distribución) y rápida eliminación (clearance elevado).

Discusión y conclusión



- Con relación al segundo pico máximo de absorción se concluye que se debe definir si corresponde a una cinética de Michaelis-Menten de saturación o de 2do orden, para lo cual se debería repetir el ensayo con tiempo de muestreo mínimo de 72 horas, considerando el patrón de excreción.
- Se requiere cambio de condiciones de reacción con ^{99m}Tc para mejorar la eficiencia del marcaje del nuatigenósido.
- Se debe adicionar perfil de excreción para seguimiento del radiofármaco en orina y heces.



Gracias por su atención