

FARMACOCINETICA DE LA CIANAMIDA EN EL PERRO

**Memoria, que para optar al grado de
Licenciatura en Farmacia, presenta:**

HELENA COLOM CODINA

Barcelona, Junio 1987

La presente Memoria ha sido realizada en la "Subunitat de Biofarmacia i Farmacocinetica" de la "Divisió de Ciències de la Salut" de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección del Profesor Dr. Rosendo Obach Vidal.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Obach', written in a cursive style.

Dr. Rosendo Obach

El trabajo de la presente Memoria ha sido subvencionado por la beca nº 19248, otorgada por la CIRIT.

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Finalizada la presente Memoria, deseo expresar en primer lugar, mi más sincera gratitud al Profesor Dr. Rosendo Obach Vidal, director de la misma, por su constante apoyo y desinteresado esfuerzo sin los cuales no hubiera sido posible la realización de la misma, así como por brindarme la posibilidad de trabajar bajo su valiosa dirección.

Al Profesor Dr. Joaquín Moreno Dalmau le agradezco su revisión crítica y sugerencias prestadas durante toda la Memoria.

Agradezco enormemente al Prof.Dr. José Domenech Berrozpe, su entrañable amistad, apoyo personal y estímulo a lo largo del trabajo.

Deseo agradecer de manera especial a la Dra. Concepción Peraire, amiga y compañera, su valiosa colaboración y apoyo moral prestados.

También agradezco a Juan Pruñonosa, Miguel Nomen, Ignacio Diez y Angel Menargues su constante ayuda y asesoramientos ofrecidos, así como por sus orientaciones y consejos.

Deseo resaltar el apoyo recibido por Laboratorios LASA S.A. y las facilidades de todo orden prestadas que han permitido la realización de esta Memoria. En este sentido, deseo expresar mi gratitud al Dr. José M^a Vallés Plana y a D. José Arso Plasencia por su ayuda en iniciarme en las técnicas utilizadas en el presente trabajo.

Finalmente agradezco a Marta Casadas su ayuda en la parte experimental.

INDICE

INTRODUCCION	1
Objetivos y plan general de trabajo	13
Bibliografía	15
CAPITULO 1: MATERIALES Y METODOS	20
1.1. MEDICAMENTO SELECCIONADO	21
1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION	23
1.3. TECNICAS BIOLOGICAS	24
1.3.1. MATERIALES	24
1.3.1.1. Material	24
1.3.1.2. Aparatos auxiliares	25
1.3.1.3. Reactivos	26
1.3.1.4. Soluciones para el ensayo	27
1.3.2. METODOS	28
1.3.2.1. Administración del fármaco	28
1.3.2.1.1. Preparación del animal	28
1.3.2.1.2. Administración de las soluciones	28
1.3.2.2. Toma de muestras	29
1.4. TECNICAS ANALITICAS	30
1.4.1. Preparación de las muestras	30
1.4.2. Soluciones patrón	30
1.4.3. Soluciones para el ensayo	31
1.4.4. Descripción del método analítico	32
1.4.5. Precisión y exactitud del método de valoración	36
1.5. TRATAMIENTO FARMACOCINETICO DE LOS DATOS EXPERI- MENTALES	38
1.5.1. Administración intravenosa	38
1.5.1.1. Elección del modelo farmacocinético óptimo	38
1.5.1.2. Determinación de los principales parámetros farma- cocinéticos	40
1.5.2. Administración oral	44

1.5.2.1. Elección del modelo farmacocinético óptimo	44
1.5.2.2. Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos	45
1.5.3. Estimación de los momentos estadísticos	46
1.5.4. Estudio de linealidad cinética	48
Bibliografía	49
CAPITULO 2: RESULTADOS	51
2.1. Estudio farmacocinético tras la administración intravenosa	52
2.1.1. Niveles plasmáticos de fármaco	52
2.1.2. Elección del modelo farmacocinético óptimo	69
2.1.3. Parámetros farmacocinéticos	71
2.1.4. Estudio de la linealidad cinética	76
2.2. Estudio farmacocinético tras la administración oral	80
2.2.1. Niveles plasmáticos de fármaco	80
2.2.2. Elección del modelo farmacocinético óptimo	86
2.2.3. Parámetros farmacocinéticos	87
CAPITULO 3: DISCUSION	90
3.1. Discusión de los resultados	91
3.1.1. Administración intravenosa	91
3.1.2. Administración oral	95
3.2. Conclusiones	97
Bibliografía	99

INTRODUCCION

El alcoholismo, desde el punto de vista más amplio, puede ser considerado como una enfermedad ocasionada por la ingesta reiterada de alcohol etílico (1) que presenta un desarrollo multifactorial, al afectar al organismo humano tanto en su funcionalismo psíquico como orgánico.

En el ámbito sanitario pueden, pues, considerarse dos vertientes distintas en cuanto a los efectos ocasionados por el alcohol. En primer lugar su capacidad de producir una toxicomanía caracterizada clínicamente por dependencia psíquica, aumento de la tolerancia y dependencia física expresada por un síndrome de abstinencia y por otra parte su evidente acción tóxica a través de alteraciones metabólicas que conducen a una serie de trastornos somáticos y psíquicos característicos del alcoholismo crónico, como hepatopatías, pancreatitis, miocardiopatías, gastritis, disminución de la resistencia a la infección, retraso del desarrollo del feto en madres gestantes, polineuropatías, encefalopatías, delirium tremens, etc. A estos efectos se suman las consecuencias indirectas del consumo excesivo de alcohol que según datos recogidos por la OMS (2), se ponen de manifiesto por un aumento importante en la incidencia de la delincuencia, en el absentismo y baja productividad laborales y en los accidentes de etiología diversa (tráfico, domésticos o industriales). No resulta extraño, pues, que exista una constante preocupación por parte de la OMS en el establecimiento de programas de actuación frente al problema del alcoholismo, con objeto de encontrar las soluciones más adecuadas a los problemas que el consumo de alcohol plantea.

Desde el punto de vista clínico, el alcoholismo se instaura en el mismo momento en que existe una pauta de ingestión de bebidas alcohólicas anómala o peligrosa para la salud (1); sin embargo resulta difícil en una sociedad como la nuestra en que existe libre consumo de alcohol establecer los

límites a partir de los cuales debe considerarse la conducta del individuo como patológica.

Existen en la bibliografía especializada varias clasificaciones de los tipos de alcoholismo, que en general se basan en la forma de adquisición, manifestaciones clínicas y en el distinto papel que en cada caso juegan los diversos factores patogénicos. Quizás una de las más conocidas es la de Jellinek (3); este autor diferencia cinco tipos de alcoholismo basándose en el cuadro sindrómico presentado, cada uno de características propias, pero que en circunstancias determinadas se puede evolucionar de uno a otro. Alonso Fernández (4), sin embargo, hace referencia a la conducta alcohólica distinguiendo entre bebedor excesivo regular, bebedor alcoholómano y bebedor psicótico.

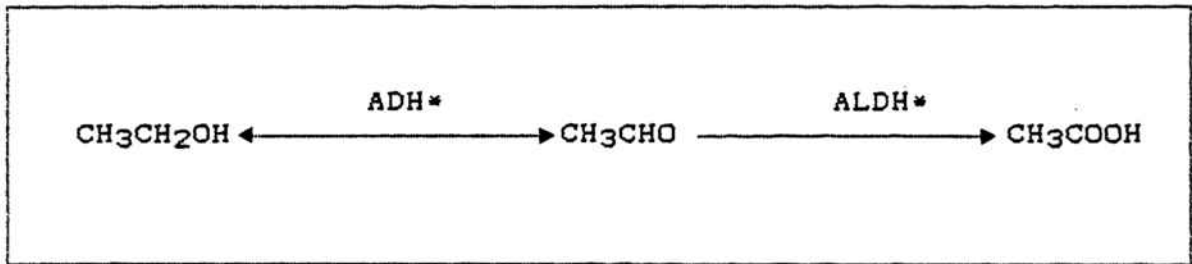
Actualmente existen varios criterios para valorar el abuso de alcohol que resultan de gran importancia clínica, puesto que proporcionan datos objetivos y permiten al clínico actuar con más conocimiento de causa.

Tal como se ha venido mencionando, el enfermo alcohólico sufre trastornos orgánicos y psíquicos. El alcohol ingerido no puede almacenarse en el organismo, constituyendo un aporte calórico que debe ser oxidado necesariamente. En el ESQUEMA 1 se muestran las etapas implicadas en el metabolismo del etanol, las cuales involucran a dos sistemas enzimáticos (5).

La velocidad de transformación de la primera etapa es más lenta que la subsiguiente, resultando ser el paso limitante de la velocidad del proceso de oxidación global del etanol a ácido acético.

Aunque el equilibrio de la reacción catalizada por la alcoholdehidrogenasa, se encuentra desplazado hacia la

izquierda, la oxidación etanólica ocurre debido a la rápida desaparición del acetaldehído, mediante un proceso irreversible catalizado por una aldehíodeshidrogenasa.



ESQUEMA 1. Etapas del metabolismo del alcohol etílico.

* ADH Alcoholdehidrogenasa. ALDH Aldehíodeshidrogenasa.

Se han realizado diversos estudios sobre las aldehíodeshidrogenasas de mamíferos con el fin de aislar, purificar y caracterizar dicho enzima. Así Feldman y Weiner (6) purificaron una aldehíodeshidrogenasa de hígado de caballo. Posteriormente Eckfeldt y col. (7) trabajando con la misma especie animal lograron purificar y caracterizar dos isoenzimas, uno de elevada afinidad (K_m 0.2 μM) y otro de baja afinidad (K_m 70 μM) frente al acetaldehído respectivamente.

Kraemer y Deitrich (8) aislaron y purificaron parcialmente un enzima hepático humano, pero no hallaron evidencias de la existencia de isoenzimas adicionales.

Greenfield y Pietruszko (9) hallaron dos isoenzimas de la aldehíodeshidrogenasa hepática humana, presentando analogías con los estudiados por Eckfeldt y col; así el primero de ellos se caracteriza por poseer un valor de K_m elevado frente al acetaldehído (0.1 mM a pH 9.5), mientras que el segundo presenta un valor de K_m bajo (2-3 μM a pH 9.5).

Parece estar bien establecido que la primera etapa de la oxidación del etanol ocurre en el citoplasma; sin embargo,

existen discrepancias entre diversos autores respecto a la localización intracelular de la segunda etapa de la oxidación del etanol.

En experiencias llevadas a cabo con hígado de cordero, se puso de manifiesto que la actividad enzimática de la aldehídodeshidrogenasa se localiza principalmente en el citoplasma y en las mitocondrias y en menor proporción en los microsomas, apreciándose diferencias entre los enzimas presentes en cada una de las fracciones subcelulares (10). Sin embargo, Marjanen (11) afirma que las mitocondrias de hígado de rata contienen la mayor parte de la actividad celular del enzima. En presencia de etanol la cantidad de NAD citoplasmática puede verse limitada y, como consecuencia la segunda etapa del metabolismo puede ocurrir en las mitocondrias. Lo que sí es cierto es que la oxidación del acetaldehído ocurre principalmente en el hígado, a pesar de la presencia de ALDH en otros órganos.

Ensayos "in vitro" efectuados con eritrocitos humanos pusieron de manifiesto la presencia de una aldehídodeshidrogenasa de K_m 0.7 mM a pH 7.4, similar al isoenzima hepático de elevada K_m frente al acetaldehído (12).

En eritrocitos de rata se aisló, aunque no se purificó, una aldehídodeshidrogenasa (K_m 170 μ M a pH 7.4) capaz de oxidar el acetaldehído; no obstante, la oxidación del acetaldehído en los eritrocitos representa menos de un 1% del metabolismo hepático de dicho compuesto (13).

Por otra parte, el etanol puede metabolizarse también por el sistema microsomal hepático, localizado en el retículo endoplásmico, precisando para ello NADPH y oxígeno.

Una alcoholemia elevada provoca la reducción del potencial redox celular, alterándose el metabolismo intermediario y dando lugar a un aumento del ácido úrico y del lactato sanguíneos. Los cambios más frecuentes se dan en la síntesis y oxidación de ácidos grasos (14). Así, la administración crónica de etanol en ratas produce esteatosis debido a una disminución de la oxidación lipídica, provocada, a su vez, por el aumento de la relación NADH/NAD hepáticos, después de la oxidación de alcohol vía aldehídoeshidrogenasa. Se observa también una mayor actividad del sistema de oxidación microsomal que justifica el aumento de colesterol y la síntesis lipoproteica.

La acumulación de grasa explica el frecuente hallazgo de hepatomegalia en los consumidores habituales de alcohol, pero ello no supone que deba progresar a una enfermedad hepática más grave. Por el contrario, existen efectos citopáticos provocados por la acumulación en mitocondria y citosol de acetaldehído, siendo éste más liposoluble, reactivo y tóxico que el propio etanol. Dicha sustancia lesiona las membranas y ocasiona necrosis celular que, a su vez, puede estimular una reacción inflamatoria con respuesta inmunológica y formación de colágeno (15).

El papel que juega el acetaldehído en el alcoholismo crónico puede ser notable. Raskin (16) se planteó, hace ya algunos años, la siguiente pregunta al tratar el tema del alcoholismo: ¿ Estamos ante un problema de alcoholismo o de acetaldehidismo ?

Los trastornos de tipo psíquico observados en el paciente alcohólico se caracterizan por disminución de la capacidad intelectual, alteraciones de carácter, ansiedad, celotipia y anorexia, terminando en delirium tremens.

En la terapéutica del etilismo crónico se requiere la supresión inmediata de la ingesta de alcohol, el restablecimiento del déficit nutricional y la corrección de las alteraciones metabólicas. Para conseguir estos objetivos, existen diversas estrategias de actuación, destacando entre ellas el tratamiento farmacológico, dentro del cual se incluye la terapia aversiva y la readaptación gracias a la psicoterapia, ya sea individual o de grupo.

La terapia aversiva se basa en provocar una reacción desagradable simultáneamente o posteriormente a la ingesta alcohólica (1). Naturalmente, este tipo de tratamiento no debe aplicarse de forma aislada, sino como coadyuvante de la psicoterapia (17). Aunque en principio se utilizaron fármacos emetizantes para inducir este tipo de reacciones, actualmente se acude principalmente a fármacos capaces de inhibir el metabolismo del alcohol (18). Concretamente, los inhibidores de la aldehídoeshidrogenasa hepática constituyen un grupo bastante heterogéneo de sustancias, desde el punto de vista químico, que se caracterizan todas ellas por inducir en presencia de etanol el denominado "síndrome tóxico del acetaldehído". Sin embargo, la toxicidad de muchas de estas sustancias o bien su acción farmacológica propia no permiten su utilización en el tratamiento del alcoholismo crónico, en el que interesan fármacos de cuya interacción con el metabolismo del etanol resulte un cuadro de intolerancia aguda marcada y con una toxicidad mínima.

El disulfiram (19) ha sido uno de los fármacos más ampliamente utilizados en este sentido. Su acción se debe a una inhibición competitiva de la ALDH de elevada afinidad frente al acetaldehído. En animales de experimentación se requieren dosis orales superiores a 150 mg/kg para conseguir esta acción. Dicha inhibición es prácticamente irreversible, siendo necesaria síntesis "de novo" para la recuperación de la

actividad enzimática. En consecuencia, los efectos de la interacción disulfiram-acetaldehído, cuya intensidad depende de la cantidad de etanol ingerido y de la dosis de fármaco administrado (20), pueden prolongarse hasta 3 o 4 días después del tratamiento. Por otra parte, este fármaco no es totalmente inócuo. Cabe destacar su inhibición, también de tipo competitivo, del enzima dopamina- β -hidroxilasa que lleva a una disminución de la síntesis de noradrenalina en las terminaciones adrenérgicas y que puede desencadenar un cuadro hipotensivo grave (21).

La severidad de la reacción disulfiram-etanol dió lugar a la búsqueda de nuevas sustancias de propiedades similares a este fármaco, pero capaces de dar una respuesta más moderada.

La cianamida, carbimida, cianogenamida o amidocianógeno (22) presenta ventajas respecto al disulfiram, ventajas que avalan su utilización en clínica. Los efectos de la reacción cianamida-etanol son similares a los del disulfiram (23) pero menos intensos, más controlables y es difícil que se presente un cuadro hipotensivo grave, puesto que dicho fármaco no inhibe el enzima dopamina- β -hidroxilasa (24). La inhibición máxima de la aldehído deshidrogenasa se alcanza entre la primera y segunda hora después de la dosificación recuperándose el 80 % de la actividad enzimática a las 24 horas.

La cianamida inhibe totalmente la ALDH hepática de K_m baja y en menor proporción el isoenzima de K_m elevada, siendo más específica que el disulfiram en esta acción (25). Aunque en un principio se conocía dicha inactivación, no se habían establecido sus bases moleculares.

Kitson y Crow (26) realizaron ensayos "in vitro" e "in vivo" con objeto de estudiar los mecanismos químicos que

participan en la interacción cianamida-etanol llegando a la conclusión de que no es el fármaco inalterado el responsable de la inactivación del enzima, sino probablemente uno de sus metabolitos. Resultados análogos obtuvieron Dieitrich y col. (27) trabajando con aldehídoeshidrogenasa hepática de buey.

Con objeto de identificar el metabolito activo de la cianamida y partiendo de la premisa de que se trataba de una carbodiimida, Shiota y col. (28) administraron dimetilcianamida en ratas. Se observó una inhibición retardada de la actividad ALDH de K_m baja con respecto a la cianamida y un aumento de los niveles de acetaldehído sanguíneo.

En un ensayo "in vitro" efectuado con mitocondrias de hígado de rata, la misma substancia apenas inhibió al enzima, mientras que el compuesto n-propilcianamida lo hizo en un 83 % frente a un 99 % debido a la cianamida.

Se supone que la actividad de la dimetilcianamida se debe probablemente a su correspondiente producto monodesmetilado, proceso que ocurre en el sistema microsomal hepático; sin embargo, dicho metabolito requiere todavía una posterior activación en la que quizás juegan un papel importante las mitocondrias.

Experiencias llevadas a cabo con n-acilderivados de la cianamida en ratas, demuestran que mecanísticamente dichos compuestos se comportan igual que la cianamida, puesto que se supone una liberación de la misma "in vivo"; no obstante la duración de la acción es más prolongada (29).

Según Demaster y col. (30) tanto las mitocondrias como el sistema microsomal hepático contribuyen a la activación de la cianamida.

Parece ser que existen unos requerimientos estructurales, de forma que únicamente las cianamidas no substituídas o bien monoalquílicas resultan ser activas. Por otra parte, el hecho de que tanto la cianamida como su metabolito urinario N-acetilcianamida sean inactivos frente a la aldehído-deshidrogenasa, sugiere la existencia de uno o más mecanismos de activación de la cianamida distintos a la acetilación o conjugación (31).

Ante estos resultados se propuso un segundo camino metabólico, aunque minoritario, que llevó al enzima catalasa. Este, podría estar implicado en el mecanismo de activación de la cianamida. A pesar de que el fármaco inhibe también a la propia catalasa, existe una buena correlación entre la actividad catalasa hepática y los niveles de acetaldehído sanguíneo. Se desconoce con seguridad si este enzima es el único implicado en la bioactivación de la cianamida.

Con respecto a la inhibición de la catalasa producida por el propio fármaco, cabe destacar que el etanol parece ejercer una acción protectora y permite la bioactivación (32).

Es preciso, por tanto, seguir investigando en esta línea con el fin de caracterizar mejor el papel de la catalasa, describir su inhibición por la propia cianamida e identificar definitivamente el metabolito activo de ésta.

Hasta el presente, los estudios sobre el comportamiento farmacocinético de la cianamida se han llevado a cabo mayoritariamente en animales de experimentación.

Ensayos realizados en ratas tratadas intraperitonealmente con cianamida marcada con ^{14}C , han puesto de manifiesto que la radiactividad se localiza principalmente en el hígado, una hora después de la administración (27). Los porcentajes de

excreción de dicha radiactividad determinados en orina y en el aliento 6 horas después del tratamiento son de un 94 % y un 1.4 %, respectivamente. Los agentes responsables de tales niveles de radiactividad son, por una parte, un pequeño porcentaje del propio fármaco, pero mayoritariamente su metabolito, identificado como N-acetilcianamida por Shirota y col. (31).

Según dichos autores, la conversión de cianamida en su producto acetilado está catalizada por una N-acetiltransferasa hepática dependiente del acetil-S-CoA. El citado metabolito carece de actividad frente a la aldehído deshidrogenasa de baja K_m , lo cual está de acuerdo con las afirmaciones de Deitrich y col. (28). Lo cierto es que la acetilación representa una vía de eliminación del fármaco.

La capacidad de acetilación del enzima N-acetiltransferasa varía en función de la especie; se sabe que en el perro presenta una baja actividad respecto a otras especies animales (31). Queda todavía por descubrir si existe polimorfismo genético en el hombre en lo que respecta a dicha acetilación, hecho de gran importancia de cara a optimizar la eficacia del fármaco y prevenir al máximo sus efectos tóxicos.

Los primeros resultados hallados, en lo que se refiere a disponibilidad del fármaco, indican una rápida absorción del mismo, a través del tracto gastrointestinal, después de su administración oral en ratas. La concentración plasmática máxima se alcanzó a los 60 minutos y se estimó una semivida aparente de eliminación de 92 minutos (33).

Obach y col. (34) en estudios farmacocinéticos de la cianamida en rata, han determinado las concentraciones de fármaco en sangre total mediante la técnica analítica descrita

por Buyske y col. (35), así como los niveles de excreción biliar tras la administración de dosis intravenosas de 17.5, 35 y 70 mg/kg. Los resultados obtenidos por dichos autores, ponen de manifiesto un carácter bicompartimental, así como una cinética dosis-dependiente, para la cianamida en el ámbito de dosis ensayadas con los parámetros farmacocinéticos no constantes para ninguna de ellas. La excreción biliar, por el contrario, ocurre a velocidad constante e independiente de la dosis, siendo las cantidades totales excretadas en bilis proporcionales a las dosis al tiempo que su magnitud es irrelevante. Luego se asume la existencia de una cinética de eliminación de primer orden que no es la responsable de la no linealidad cinética que presenta el fármaco.

La cianamida presenta una especial afinidad por los hematíes. En la rata, los niveles intraeritrocitarios de cianamida son elevados y su semivida de desaparición muy superior a la semivida plasmática (36). En el conejo, se obtuvieron resultados similares que apuntaban a que los niveles intraeritrocitarios de cianamida perduraban más que los niveles plasmáticos (37).

La localización intraeritrocitaria de la ALDH (13) y el hecho de que los niveles plasmáticos de cianamida no se correlacionan con el efecto farmacológico de la misma, permiten la hipótesis de que los eritrocitos puedan jugar un papel importante en el comportamiento farmacocinético y en la acción farmacológica de dicho fármaco (38).

OBJETIVOS Y PLAN GENERAL DE TRABAJO

El hecho de no disponer hasta hace relativamente poco tiempo, de una técnica analítica lo suficientemente sensible y específica, ha obligado a estudiar el comportamiento farmacocinético de la cianamida tras la administración de dosis superiores a las que normalmente se utilizan en terapéutica. Por dicho motivo, no se conocen todavía las características farmacocinéticas de este fármaco en las condiciones ya citadas.

Disponiendo de los datos farmacocinéticos previos y puesto que se ha establecido un método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) sensible y específico para la cianamida (39), nuestro interés se centró en la aplicación del mismo a la detección de los niveles plasmáticos del fármaco, utilizando el perro como animal de experimentación, tras su administración a las dosis normales en clínica.

La determinación de los distintos parámetros farmacocinéticos de la cianamida permitirá abordar con más seguridad posteriores estudios en el hombre, con la posibilidad de establecer los regímenes de dosificación más adecuados y evitar al máximo sus efectos tóxicos en el tratamiento aversivo del alcoholismo crónico.

El plan de trabajo a seguir es el que se resume a continuación:

1. Puesta a punto de la técnica analítica comprobando la precisión y exactitud del método en nuestras condiciones experimentales.

2. Estudio farmacocinético de la cianamida tras su administración intravenosa al perro a las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg:
 - Ajustado de los modelos farmacocinéticos a los datos experimentales y elección del modelo más probable.
 - Obtención de los principales parámetros farmacocinéticos en función del modelo seleccionado.
 - Cálculo de los parámetros farmacocinéticos mediante el método no compartimental de los momentos estadísticos.

3. Estudio farmacocinético de la cianamida tras su administración oral al perro a una dosis de 4 mg/kg:
 - Ajustado de los modelos farmacocinéticos a los datos experimentales y elección del modelo más probable.
 - Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos en función del modelo seleccionado.
 - Estimación de la biodisponibilidad en magnitud y en velocidad.
 - Cálculo de los parámetros farmacocinéticos que no dependen de un modelo determinado (momentos estadísticos).

4. Estudio de la linealidad cinética del fármaco en el ámbito de dosis ensayadas por vía intravenosa.

5. Discusión de los resultados y conclusiones.

BIBLIOGRAFIA INTRODUCCION

1. Morales Meseguer J M, Hernández Martínez J. Alcoholismo ¿ Qué hacer?. *Medicine* 1979: **24** (2), 1553-1566.
2. Problemas relacionados con el alcohol: Intensificación del programa de la OMS. *Crónica de la OMS* 1979: **33**, 413-418.
3. Jellinek E M. The disease concept of alcoholism. New Haven. Hill House, 1960.
4. Alonso-Fernández F. Fundamentos de la Psiquiatría actual. Ed. Paz Montalvo Madrid. 1972: Tomo II, cap.7.
5. Hawkins R P, Kalant H. The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacological Reviews* 1972: **24**, 67-157.
6. Feldman Rhoda I, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 1972: **247** (1), 260-266.
7. Ecfeldt J, Mope L, Takio K, Yonetani T. Horse liver aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of two isozymes. *The Journal of Biological Chemistry* 1976: **25** (1), 236-240.
8. Kraemer R J, Deitrich R A. Isolation and characterization of human liver aldehyde dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 1968: **243**, 6402-6408.

9. Greenfield N J, Pietruszko R. Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity Chromatography and characterization of the isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1977: 483, 35-45.
10. Crow K E, Kitson T M, Mac Gibbon A K H, Batt R D. Intracellular localization and properties of aldehyde dehydrogenases from sheep liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1974: 350, 121-128.
11. Marjanen L. Intracellular localization of aldehyde dehydrogenase in rat liver. *Biochemical Journal* 1972: 127, 633-639.
12. Inoue K, Ohbora Y, Yamasawa K. Metabolism of acetaldehyde by human erythrocytes. *Life Sciences* 1978: 23, 179-184.
13. Weiner H, Truesdale-Mahoney N, Pelletier A J. Oxidation of acetaldehyde and presence of aldehyde dehydrogenase in rat erythrocytes. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1983: 18 (1), 167-170.
14. Lieber C S. Effects of ethanol upon lipid metabolism. *Lipids* 1973: 9 (2), 103-113.
15. Lieber C S. Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury. *The New England Journal of Medicine* 1978: 298 (16), 888-893.
16. Raskin N H. Alcoholism or acetaldehydism ?. *The New England Journal of Medicine*. 1975: 292 , 422-423.
17. Peachey J E, Naranjo C A. The role of drugs in the treatment of alcoholism. *Drugs* 1984: 27, 171-182.

18. García-Sevilla J A. Mecanismo de acción de los fármacos inductores de intolerancia aguda al alcohol. Actas Luso-Españolas de Neurología, Psiquiatría y Ciencias afines 1978: 5 (2), 73-78.
19. Hald J, Jacobsen E. The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of antabuse (tetraethylthiuram-disulphide) and alcohol. Acta Pharmacologica et Toxicologica 1948: 4 , 305-309.
20. Peachey J E, Sellers E M. The disulfiram and calcium carbimide acetaldehyde-mediated ethanol reactions. Pharmacology and Therapeutics 1981: 15 ,89-97.
21. Goldstein M, Anagnoste M, Lauber E, Mc-Kereghan M R. Inhibition of dopamine- β -hydroxylase by disulfiram. Life Sciences 1964: 3, 763-766.
22. Ferguson J K W. A new drug for alcoholism treatment. Canadian Medical Association Journal 1956: 74, 793-795.
23. Ando, Fuwa. Effects of cyanamide on alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. The Journal of Biochemistry 1961: 50 (5), 416-418.
24. Marconi J, Solar G, Gaete S. Comparative clinical study of the effects of disulfiram and calcium carbimide. Quart J Stud Alcohol 1961: 22, 46-51.
25. Loomis C W, Brien J F. Specificity of hepatic ALDH inhibition by calcium cyanamide in the rat. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1983: 61, 431-435.

26. Kitson T M, Crow K E. Studies on possible mechanisms for the interaction between cyanamide and aldehyde dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology* 1979: **28**, 2551-2556.
27. Deitrich R A, Troxell P A, Worth W, Erwin G V. Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochemical Pharmacology* 1976: **25**, 2733-2737.
28. Shirota F N, DeMaster E G, Nagasawa H T. Studies on the cyanamide-ethanol interaction. Dimethylcyanamide as an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vivo. *Biochemical Pharmacology* 1982: **31** (11), 1999-2004.
29. Nagasawa H T, Kwon C-H, DeMaster E G, Shirota F N. Prodrugs of cyanamide as (long-acting) alcohol deterrent agents. *Biochemical Pharmacology* 1986: **35** (2), 129-132.
30. DeMaster E G, Shirota F N, Nagasawa H T. The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalysed by catalase. *Biochemical and Biophysical Research communications* 1984: **122** (1), 358-365.
31. Shirota F N, Nagasawa H T, Kwon C H, DeMaster E G. N-acetylcyanamide, the major urinary metabolite of cyanamide in rat, rabbit, dog and man. *Drug Metabolism and Disposition* 1984: **12** (3), 337-344.
32. Cederbaum A I, Dicker E. Inhibition of peroxidatic activity of catalase towards alcohols by the aldehyde dehydrogenase inhibitor cyanamide. *Toxicology Letters* 1985: **29**, 107-114.

33. Loomis C W, Brien J F. Inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenase in the rat by calcium carbimide (calcium cyanamide). Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1983: 61 (9), 1025-1034.
34. Obach Vidal R, Vallés Plana J M, Domenech Berrozpe J. Estudio cinético preliminar de la cianamida en rata. Annals de Medicina 1980: 66 (1), 45-57.
35. Buyske D A, Downing V. Spectrophotometric Determination of cyanamide. Analytical Chemistry 1960: 32 (13), 1798-1800.
36. Obach R, Domenech J, Moreno J, Pla-Delfina J M. Estudio preliminar de la farmacocinética de la cianamida en la rata. Actas del 1^{er} Congreso Hispano-Francés de Biofarmacia y Farmacocinética. Barcelona 1979: 3, 415-434.
37. Obach R, Moreno J, Domenech J, Pla-Delfina J M. Etude pharmacocinetique de la cyanamide chez le lapin. Actas del 1^{er} Congreso Europeo de Biofarmacia y Farmacocinética. Clermont Ferrand 1981: 2, 367-375.
38. Obach R, Vallés J, Pruñonosa J, Arso J, Vallés J M. Papel de los hematíes en la farmacocinética de la cianamida. Drogodependencias, un reto multidisciplinar 1984: 1, 29-35. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria.
39. Pruñonosa J, Obach R, Vallés J M. Determination of cyanamide in plasma by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography 1986: 377, 253-260.

CAPITULO 1
MATERIALES Y METODOS

1.1. MEDICAMENTO SELECCIONADO

El fármaco utilizado ha sido la cianamida, un inhibidor de la aldehído-deshidrogenasa, empleado como coadyuvante en el tratamiento aversivo del alcoholismo crónico y cuyas propiedades se exponen a continuación.

Estructura y propiedades físico-químicas

La cianamida también conocida químicamente como carbimida, carbodiimida, cianogenamida o amidocianógeno, es una sustancia sólida y delicuescente que se presenta en forma de cristales ortorrómbicos y alargados de color blanco.

Posee un peso molecular de 42.04 y una densidad de 1.282, siendo su fórmula empírica CH_2N_2 .

La estructura molecular de dicho compuesto, que pertenece al grupo de simetría C_s , ha podido ser elucidada mediante espectroscopía Infrarroja y Raman. Estas técnicas demuestran que la estructura del grupo $\text{N-C}\equiv\text{N}$ es lineal, hallándose fuera del plano el grupo NH_2 .

En la FIGURA 1.1 se detallan los principales parámetros estructurales de la cianamida, indicándose las distancias y los ángulos de enlace correspondientes.

Su espectro de absorción UV, presenta un pico de absorbancia débil por debajo de 230 nm, mientras que la aparición del máximo depende del pH de sus soluciones acuosas, o bien del disolvente utilizado.

Su hidrosolubilidad a temperatura ambiente es elevada, aunque dicha propiedad experimenta una considerable variación frente a la temperatura, tal como se muestra en la FIGURA 1.2.

Por otra parte, también es muy soluble en éteres, alcoholes, fenoles, aminas y ésteres; es ligeramente soluble en benceno, sulfuro de carbono e hidrocarburos halogenados de cadena corta y prácticamente insoluble en n-hexano y ciclohexano.

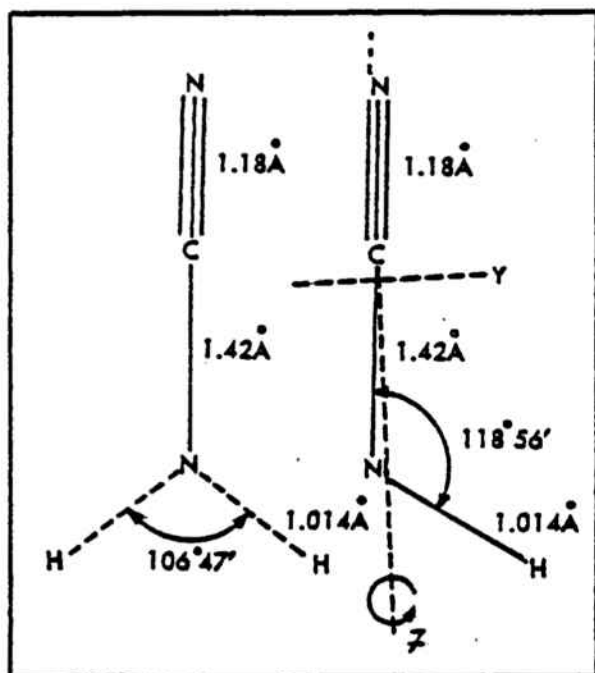


FIGURA 1.1. Principales parámetros estructurales de la cianamida.

Su punto de fusión oscila entre 45 y 46°C y posee un índice de refracción de 1.4418 (a 48°C).

Para su correcta conservación debe mantenerse en recipientes de cierre hermético, en lugar fresco y preservada de la luz y la humedad.

Es muy irritante y caústica y ataca a varios metales, entre ellos, al hierro, cobre, plomo y también al acero inoxidable; no afecta al vidrio, ni utensilios de hierro esmaltado.

En soluciones acuosas, la cianamida es relativamente estable a valores de pH comprendidos entre 4 y 6; sin embargo, se polimeriza, dando diciandiamida, en soluciones alcalinas,

mientras que a valores de pH inferiores a 2 se transforma en urea.

La cianamida utilizada ha sido cianamida Fluka lote 1-8777.

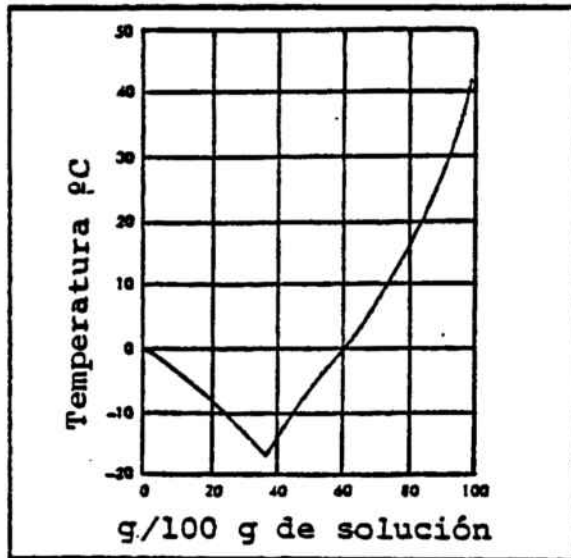


FIGURA 1.2. Solubilidad de la cianamida en agua en función de la temperatura.

1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El estudio farmacocinético de la cianamida se ha llevado a cabo en una especie animal no roedora, el perro.

Se han utilizado perros Beagle machos, de pesos comprendidos entre 9 y 16 kg, mantenidos en ayunas y con agua "ad libitum" durante las 12 horas anteriores al ensayo.

Se emplearon 5 animales por dosis, tanto en la administración intravenosa como en la oral, dejando transcurrir un tiempo prudencial de una semana entre ambos tratamientos, período superior a 10 veces la semivida biológica de este principio activo en esta especie animal.

La elección del perro como animal de experimentación en este trabajo se basa en la posibilidad de estimar cinéticas individuales completas y, por otra parte, permite que el mismo

animal pueda someterse al tratamiento por ambas vías de administración; esto es importante para estudios posteriores de biodisponibilidad del fármaco. Es conocido además que el perro es la especie animal más sensible a los efectos tóxicos de la cianamida (1).

1.3. TECNICAS BIOLÓGICAS

En este apartado se describen los materiales utilizados en los ensayos farmacocinéticos, así como la metódica seguida.

1.3.1. MATERIALES

1.3.1.1. Material

1. Jeringas desechables de 5 y 20 ml de capacidad con aguja 0.8x40 cono LUER (Ico-Steril), para la toma de muestras.
2. Jeringa hipodérmica de 10 ml de capacidad con aguja 0.7x30 cono RECORD (Ico-medical), para la administración del fármaco vía intravenosa.
3. Jeringuillas de insulina para la administración del fármaco vía oral (Ico-Steril).
4. Algodón hidrófilo enrollado.
5. Bolas de vidrio Trennmittel Merck (Art. 10 103), para la centrifugación de las muestras de sangre.
6. Cronómetro comprobado para el control del tiempo durante la toma de muestras (Scharlau).
7. Tubos de centrifuga de 10 ml de capacidad (VITROLAB).
8. Tubos de 10 ml de capacidad (PYREX) provistos de tapón de rosca y septum de teflón, para la extracción de las muestras con acetato de etilo.
9. Tubos de fondo cónico de 3 ml de capacidad (AFORA V-39955) provistos de tapón de rosca y septum de teflón, para la evaporación de las muestras y reacción de dansilación.

10. Tubos de 4 ml de capacidad (ref. 72710), provistos de tapón de rosca con septum de teflón.
11. Viales de 300 μ l de capacidad (ref. 72704).
12. Muelles para sostener los viales de 300 μ l de capacidad en el interior de los tubos de 4 ml de capacidad, hecho que permite la inyección de volúmenes de 50 a 10 μ l en el análisis cromatográfico de las muestras.
13. Matraces aforados de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml de capacidad, para la preparación de las distintas soluciones utilizadas.
14. Tubos de ensayo de 25 ml de capacidad, para la preparación de las soluciones patrón.
15. Probetas de 100, 500 y 1000 ml de capacidad.
16. Pipeta automática de 1-5 ml de capacidad (Finnpipette, JOVALSA).
17. Micropipeta automática de 25-100 μ l de capacidad (JUSTOR).
18. Micropipeta automática de 200-1000 μ l de capacidad (JUSTOR).
19. Puntas desechables de pipeta y micropipetas automáticas.
20. Filtros Millipore FH de 0.45 μ m de tamaño de poro.
21. Filtros Millipore MF de 0.50 μ m de tamaño de poro.
22. Hielo sintético para la conservación de las muestras de plasma a -78° C.

1.3.1.2. Aparatos auxiliares

Se han utilizado como aparatos auxiliares:

1. Báscula para pesar los animales y con ello conocer el volumen de solución de fármaco a administrar.
2. Máquina rasuradora OSTER Modelo A-500 para visualizar las venas cefálicas de las extremidades del animal.
3. Centrífuga HERAEUS LABOFUGE 6000 para la separación del plasma de las muestras de sangre extraídas.

4. Balanza de precisión monoplato METTLER Modelo H-54 para la pesada de las distintas cantidades de sustancias utilizadas tanto durante el ensayo farmacocinético como en el proceso analítico, previamente a su disolución.
5. Baño de ultrasonidos SELECTA, para la desgasificación de disolventes y disolución del residuo de los extractos plasmáticos.
6. Agitator HEIDOLPH.
7. Agitador HERON para la extracción de fármaco del plasma.
8. Placa de evaporación con termostato, provista de un dispositivo de aplicación de corriente de gas inerte de forma individual para cada muestra, para la evaporación a sequedad de los extractos plasmáticos.
9. pHmetro RADIOMETER M-27 para determinar y controlar el pH de las soluciones tampón requeridas.
10. Cromatógrafo líquido de alta resolución de la firma WATERS ASSOC. (Mildford, MA, U.S.A.) equipado con los siguientes elementos: a) dos bombas Modelo M-510 y M-45, b) una columna μ Bondapak C₁₈ Radial-Pak (10x0.8 cm I.D., diámetro de partícula 10 μ m), c) una precolumna Guard-Pak (ref. 85824), d) un inyector automático WISP 710B, e) un sistema controlador compuesto por un ordenador Digital Profesional 380 y un System Interface Module y f) un detector fluorimétrico Modelo M-420 AC, para la valoración de las muestras.

1.3.1.3. Reactivos

1. Carbonato sódico (Art. 6392 Merck).
2. Bicarbonato sódico (Art. 6329 Merck).
3. Fosfato bipotásico (Art. 5101 Merck).
4. Fosfato monopotásico (Art. 4871 Merck).
5. Citrato sódico dibásico 1.5-hidrato para análisis (PANREAC).
6. Acetato de etilo (Art. 868 Merck).

7. Acetonitrilo para HPLC (Scharlau).
8. Metanol para HPLC (Scharlau).
9. Acetona para análisis (Scharlau).
10. Cloruro de dansilo (Art. 3094 Merck).

1.3.1.4. Soluciones para el ensayo

Se utilizó una solución acuosa de citrato sódico al 20 % como anticoagulante, empleándose 50 µl de la misma por cada 4 ml de muestra de sangre extraída.

La elevada hidrosolubilidad de la cianamida permitió que el fármaco pudiera administrarse en forma de solución acuosa que se preparó el mismo día del ensayo.

El agua utilizada como vehículo en todas las disoluciones preparadas era bidestilada y purificada a través del sistema Milli-Q (Millipore Ibérica S.A.), con una resistividad de 18 MΩxcm.

a) Administración intravenosa

Se prepararon tres soluciones de fármaco de concentraciones 8, 4 y 2 mg/ml ; para ello se pesaron analíticamente 400, 200 y 100 mg de cianamida, respectivamente, que se disolvieron en agua enrasando hasta 50 ml en matraz aforado.

Las dosis de principio activo administradas por vía intravenosa fueron de 4, 2 y 1 mg/kg, lo que equivale a inyectar 0.5 ml/kg de cada una de las soluciones medicamentosas anteriormente descritas.

b) Administración oral

Se administró una dosis oral de 4 mg/kg. Los animales recibieron 0.5 ml de la solución medicamentosa preparada pesando analíticamente las correspondientes cantidades de cianamida, en función del peso del animal, para ser disueltas en 1 ml de agua.

1.3.2. METODOS

Seguidamente se expone la metódica empleada para la administración del fármaco, previa preparación del animal, y en la toma de muestras.

1.3.2.1. Administración del fármaco

1.3.2.1.1. Preparación del animal

El animal, una vez pesado, se coloca en una habitación aislada y con todo el material disponible para la administración y toma de muestras; luego se procede a rasurar sus extremidades anteriores con el fin de visualizar sendas venas cefálicas.

De una de ellas se toma una muestra de sangre de 20 ml que proporciona el plasma suficiente para tener un blanco, así como para la confección de los patrones de la recta de calibración.

1.3.2.1.2. Administración de las soluciones

a) Administración intravenosa

Una vez preparado cada animal se procede a la administra-

ción de la solución de medicamento por una de las venas cefálicas.

Para ello se presiona la vena en su parte proximal con el fin de que se dilate, luego se inyecta la solución dejando de presionar al mismo tiempo.

La inyección intravenosa se ejecuta con rapidez (bolus intravenoso) y hacia la mitad de la misma se pone en funcionamiento el cronómetro, considerando este instante como tiempo cero de la experiencia.

b) Administración oral

La administración oral se realiza mediante jeringuilla de insulina desprovista de aguja. Esta, conteniendo 0.5 ml de la solución de medicamento, se introduce en la cavidad bucal y hasta el fondo de la misma; inmediatamente después, se le cierra la boca para evitar cualquier posible expulsión del fármaco.

1.3.2.2. Toma de muestras

La toma de muestras se efectúa por la vena cefálica de la extremidad contralateral a la que se inyectó la solución del fármaco, siendo indiferente en el caso de la administración oral. Si se presentan dificultades con dicha extremidad es aconsejable no utilizar la correspondiente a la administración antes de los 60 minutos posteriores a la misma.

Las extracciones se realizan con jeringas de 5 ml de capacidad con aguja 0.8x40, previamente lavadas con solución anticoagulante. Se inician quince segundos antes del tiempo previsto y se prolongan hasta quince segundos después de dicho instante. Se anotan los tiempos exactos de toma de muestras.

Para facilitar la operación conviene antes conocer la dirección de la vena y presionar por la parte proximal de la misma, sujetando bien la extremidad, evitando así que se produzcan lesiones en las paredes vasculares internas, que pueden dificultar extracciones posteriores, ante cualquier posible movimiento del animal.

Inmediatamente después de sacar la aguja, se presiona la vena en el lugar de inyección durante unos instantes, para que no sangre ni se formen hematomas.

1.4. TECNICAS ANALITICAS

En este epígrafe se detalla el tratamiento de las muestras de plasma y el método de valoración de los niveles de cianamida en dicho fluido biológico.

1.4.1. Preparación de las muestras

A las muestras de sangre extraídas se adicionan 0.25 g de Trennmittel Merck (Art. 10 103), centrifugando luego a 4000 rpm durante 15 minutos. Se separan 0.5 ml de plasma de cada una de las muestras problema y se depositan en tubos de vidrio roscados adicionando seguidamente 0.1 ml de agua en cada uno. Finalmente se guardan en hielo seco hasta el día del análisis.

El plasma de la muestra blanco servirá para confeccionar los estándares de la recta de calibración tal como se indica en el apartado 1.4.2.

1.4.2. Soluciones patrón

Se preparan soluciones estándar de cianamida cuya adición al plasma obtenido de los animales antes de ser sometidos a tratamiento, permite confeccionar la recta de calibración.

Mediante interpolación en ésta, se podrán conocer los niveles de fármaco en las muestras extraídas a diferentes tiempos. Se procede del siguiente modo:

A partir de una solución madre de 100 mg/ml de cianamida y mediante sucesivas diluciones se preparan soluciones patrón de 2.5, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 µg/ml de cianamida.

Se adicionan 0.1 ml de cada una de ellas así como 0.1 ml de agua en 6 tubos de vidrio, debidamente rotulados, conteniendo 0.5 ml de plasma cada uno. De este modo se obtienen los estándares de la recta de calibración de concentraciones de 500, 200, 100, 50, 25 y 0 ng/ml, respectivamente.

Tanto las soluciones patrón como los estándares de la recta de calibración se preparan el mismo día del ensayo y se conservan, junto con las muestras de plasma a valorar, en hielo seco, hasta el día del análisis.

1.4.3. Soluciones para el ensayo

a) Solución reguladora de carbonato sódico-bicarbonato sódico
0.2 M (pH 9.0)

Se pesan analíticamente 2.12 g de carbonato sódico (A) y 1.68 g de bicarbonato sódico (B), anhidros. Se depositan ambas sustancias en sendos matraces aforados y se disuelven en agua enrasando hasta un volumen final de 100 ml. Se toman 10 ml de la solución correspondiente a A y el resto se completa con la solución correspondiente a B en un matraz aforado de 100 ml. Una vez finalizada la operación se comprueba el pH.

b) Solución reguladora de fosfato potásico 10 mM (pH 7.0)

Preparación de la solución stock de fosfato potásico 100 mM

En dos matraces aforados de 500 ml de capacidad se preparan sendas disoluciones de fosfato bipotásico (solución A) y fosfato monopotásico (solución B) anhidros, pesando 17.418 g y 13.609 g de cada una de las sustancias respectivamente. A continuación se toman exactamente medidos 305 ml de la solución A y 195 ml de la solución B que se depositan en un matraz aforado enrasando hasta el volumen final de 1 litro.

Preparación de la solución de fosfato potásico 10 mM

A partir de la solución stock de fosfato potásico 100 mM se hace una dilución 1/10. Finalmente se comprueba el pH.

c) Preparación de la solución de cloruro de dansilo

Se toman, exactamente pesados, alrededor de 10 mg de cloruro de dansilo y se depositan en un matraz aforado. Se disuelven en acetona hasta un volumen final de 10 ml. La solución así preparada se sonica en el baño de ultrasonidos, se filtra con filtro Millipore de 0.45 μm y se guarda en frasco de color topacio, preservado de la acción de la luz.

1.4.4. Descripción del método analítico

El procedimiento analítico empleado en este trabajo es el descrito por Prufionosa y col. (2), con alguna modificación en lo que respecta al tratamiento de las muestras y que a continuación se detalla.

a) Obtención de los extractos plasmáticos

A cada una de las muestras de plasma preparadas según el procedimiento descrito en los apartados 1.4.1. y 1.4.2. se

añaden 2.5 ml de acetato de etilo con el fin de extraer la cianamida plasmática.

Se someten a agitación oscilante durante 30 minutos y luego se centrifugan a 4000 rpm por un período de 10 minutos.

Se separa una alícuota de 1.5 ml del sobrenadante y se deposita en tubos de fondo cónico.

Se realiza una segunda extracción con 2 ml de acetato de etilo actuando del mismo modo que en la anterior. Después de la centrifugación, se separa una alícuota de 2 ml del sobrenadante, que se reúne con los extractos orgánicos anteriores y se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y a temperatura ambiente.

b) Derivatización con cloruro de dansilo

El residuo obtenido se disuelve con 0.1 ml de solución reguladora de carbonato sódico-bicarbonato sódico 0.2 M (pH 9.0) en el baño de ultrasonidos. Seguidamente, se añaden 0.1 ml de solución de cloruro de dansilo. Se agita el contenido de los tubos herméticamente cerrados durante unos segundos y luego se depositan en la placa termostaticada a 40 ° C para que transcurra la reacción de dansilación por un período de 1 hora.

c) Valoración

Finalizada la derivatización, se dejan enfriar las muestras hasta temperatura ambiente. Luego mediante micropipeta se introducen en viales de 300 μ l, contenidos a su vez en tubos roscados de 4 ml para su subsiguiente inyección en el cromatógrafo líquido de alta resolución descrito en el parágrafo 1.3.1.2.

El volumen de muestra inyectado es de 50 μ l salvo en aquellos casos en que las concentraciones de fármaco superan el valor de 500 ng/ml en los que se inyectan 10 μ l. En el caso de hallarnos todavía con concentraciones superiores a los 500 ng/ml se diluye la muestra con la misma solución reguladora de carbonato sódico-bicarbonato sódico 0.2 M (pH 9.0), hasta conseguir la interpolación de la misma.

Las condiciones cromatográficas empleadas son las siguientes:

- Flujo 4.0 ml/min
- Detección fluorimétrica (filtros 360-495 nm)
- Presión 900.0 psi
- Velocidad del papel 5 cm/min
- Anchura pico 10
- Ruido fondo 1000
- Fase móvil constituida por dos disolventes: una solución 10 mM de fosfato potásico (pH 7.0) (disolvente A) y una mezcla 55:45 de acetonitrilo y solución 10 mM de fosfato potásico (pH 7.0) (disolvente B), mediante un programa de gradientes que se especifica en la TABLA 1.1.

TABLA 1.1. Programa de gradientes utilizado en el análisis cromatográfico.

TIEMPO (min)	VELOCIDAD FLUJO (ml/min)	DISOLVENTE A (%)	DISOLVENTE B (%)	TIPO DE CURVA
0	4	70	30	-
7	4	40	60	6
10	4	0	100	1
12	4	70	30	1

El método de cuantificación utilizado fue el del estándar externo, puesto que no fue posible hallar un estándar interno que cumpliera con los requisitos de ausencia de solapamiento entre picos y suficiente sensibilidad al mismo tiempo. Las sustancias ensayadas por los autores con esta finalidad fueron las siguientes: glicinonitrilo, etilamina, propilamina, isopropilamina, butilamina, β -aminopropionitrilo, tiourea, tioacetamida, α -fenilglicina, anilina, etanolamina, 4-nitroanilina e hidroxilamina.

Los eluyentes que han de pasar por la columna se filtran a través de los filtros de membrana adecuados y se desgasifican en un baño de ultrasonidos:

- metanol, acetonitrilo: Filtro de membrana tipo FH de 0.5 μ m (Millipore).
- agua destilada, solución 10 mM fosfato potásico (pH 7.0): Filtro de membrana tipo MF de 0.45 μ m (Millipore).

En las FIGURAS 1.3 y 1.4 se reflejan los cromatogramas obtenidos para una muestra de plasma blanco y otra conteniendo 238 ng/ml de cianamida, extraída 120 minutos después de la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de fármaco, respectivamente.

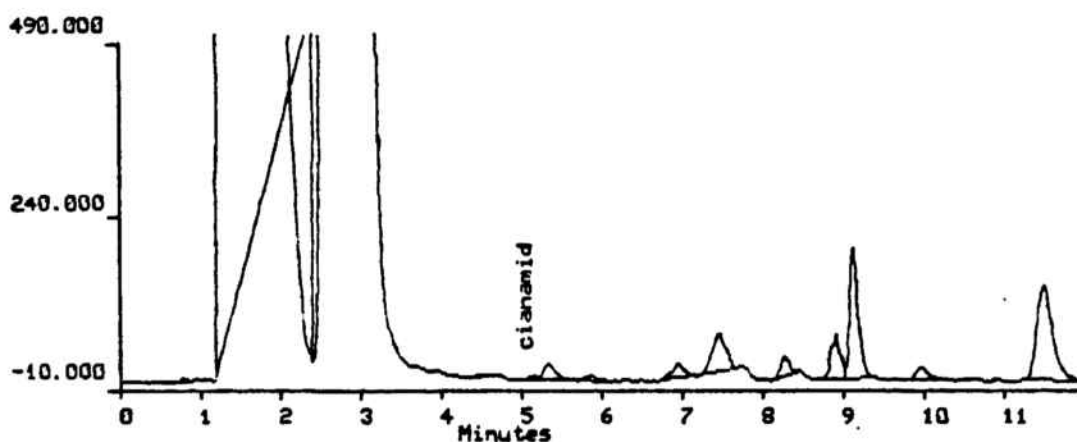


FIGURA 1.3: Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma blanco.

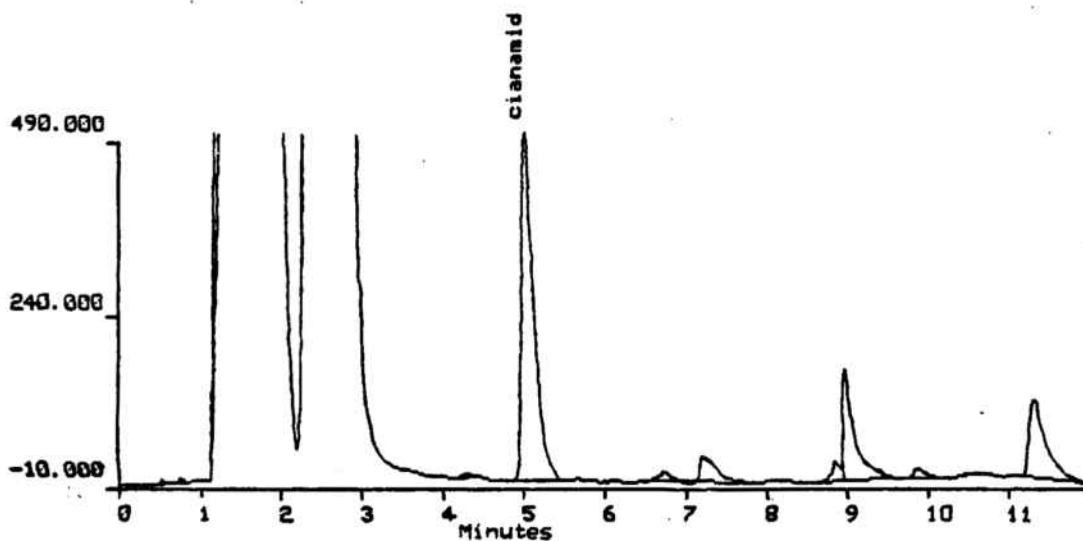


FIGURA 1.4. Cromatograma correspondiente a una muestra de plasma conteniendo 238 ng/ml de cianamida, obtenida 120 min después de la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de fármaco.

1.4.5. Precisión y exactitud del método de valoración

Con objeto de comprobar la precisión y exactitud del método analítico, en nuestras condiciones experimentales, se han realizado determinaciones cuantitativas en cinco rectas de calibración.

Estas se han confeccionado con estándares de concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 500 ng/ml, procediendo tal como se señala en los epígrafes 1.4.1 y 1.4.2.

Para cada una de las concentraciones se ha calculado el error relativo que pone en evidencia la exactitud de la técnica, y el coeficiente de variación porcentual que corrobora la precisión o reproducibilidad de los resultados obtenidos.

En la TABLA 1.2 se presentan los valores de concentración de cianamida determinados frente a los valores teóricos, así como los valores medios, las desviaciones estándar, los errores relativos y los coeficientes de variación porcentual resultantes.

TABLA 1.2. Concentraciones de cianamida halladas en plasma respecto a las concentraciones teóricas añadidas con sus correspondientes valores medios, errores relativos porcentuales, desviaciones estándar y coeficientes de variación porcentual.

CONCENTRACIONES HALLADAS RESPECTO A LAS TEORICAS AÑADIDAS					
	25	50	100	200	500
	34.15	44.42	80.12	220.39	495.92
	33.61	52.97	107.47	171.94	509.00
	18.71	40.25	111.06	209.83	495.15
	38.40	57.31	94.65	174.95	509.69
	19.89	54.82	105.28	201.88	498.22
X	28.95	49.95	99.72	195.80	501.60
Er %	15.80	0.10	0.28	2.10	0.32
DE	9.01	7.27	12.54	21.46	7.17
CV %	31.13	14.56	12.58	10.96	1.43

Los valores de error relativo obtenidos, permiten calificar la técnica analítica empleada en la determinación de cianamida en plasma, como suficientemente exacta en el ámbito de concentraciones ensayadas (de 50 a 500 ng/ml). Al mismo tiempo, el método de valoración resultó ser aceptablemente preciso puesto que se obtuvieron coeficientes de variación porcentual inferiores al 15 %. No obstante se observó una

cierta pérdida de precisión y de exactitud para el estándar de 25 ng/ml.

1.5. TRATAMIENTO FARMACOCINETICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

1.5.1. Administración intravenosa

1.5.1.1. Elección del modelo farmacocinético óptimo

Disponiendo de los datos experimentales convenientemente tabulados y de las correspondientes curvas semilogarítmicas de concentración plasmática-tiempo, la operación siguiente consistió en determinar el modelo farmacocinético óptimo que con mayor probabilidad se ajustase a ellos. Ello permitiría, en una segunda fase, conocer los principales parámetros farmacocinéticos tras la administración intravenosa y oral del fármaco.

Siguiendo el criterio clásico, dicho estudio comporta una simplificación del organismo en compartimientos o fracciones de material biológico en que el fármaco se encuentra uniformemente repartido y presenta las mismas propiedades cinéticas en todos sus puntos.

El análisis compartimental permite conocer los procesos cinéticos que sufre el fármaco en el organismo a partir de modelos compartimentales en los que se supone que los procesos de transferencia son de orden uno. Se trata pues de ajustar los distintos modelos cinéticos a los datos experimentales.

Las ecuaciones representativas de los modelos bicompartimental (Ec.3) y tricompartmental (Ec.14) tras administración intravenosa, que se especifican en el epígrafe 1.5.1.2, se han ajustado a los datos experimentales intravenosos de las tres dosis de cianamida ensayadas. Para ello se han utilizado

métodos iterativos de ajustado que tienden a aproximar al máximo los valores teóricos de la función a sus correspondientes puntos experimentales.

En la presente Memoria se ha utilizado el programa de regresión no lineal por mínimos cuadrados ELSMOS (3), para la determinación de las estimaciones definitivas. Este programa requiere unas estimaciones iniciales fiables de los parámetros a optimizar, puesto que de lo contrario convergerían a valores erróneos.

Las estimaciones iniciales de los distintos parámetros se han obtenido mediante el método de los residuales, utilizando el programa JANA (4). Con ello se pretende ajustar los datos experimentales a una función definida por la ecuación poliexponencial (Ec.1) a la que deben añadirse los errores (e) a que están sujetos dichos datos, dependientes ya sea de la técnica analítica o del propio operador.

$$C = \sum_{j=1}^m A_j \exp(-B_j) + e \quad (\text{Ec.1})$$

siendo:

C = concentración plasmática hallada del fármaco a tiempo t

m = número de términos exponenciales de la ecuación de ajustado.

El programa JANA no hace ninguna asunción respecto a las magnitudes relativas de los exponentes correspondientes a los distintos términos de la ecuación. Por otra parte, considera de igual importancia el valor mínimo de la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores de concentración teóricos y experimentales y la distribución aleatoria de los residuales.

Puesto que no disponíamos de un valor de varianza para cada punto experimental, hecho únicamente posible después de haber analizado replicados de cada punto, interesa conocer la distribución de los residuales asumiendo un determinado factor de ponderación en el ajustado. Entre los factores de ponderación ensayados ($1/c$, $1/c^2$ y $1/\sqrt{c}$), el segundo de ellos fue el que proporcionó estimaciones más fiables por comparación de las sumas ponderadas de los cuadrados de los residuales.

La selección del modelo farmacocinético óptimo se realizó en base a dos criterios; por un lado minimizar la suma ponderada de los cuadrados de los residuales, según el ensayo estadístico de MAICE o mínimo valor de AIC (Ec.2) (5-6), y por otro, evaluar la precisión con que se obtienen los distintos parámetros farmacocinéticos, mediante los coeficientes de variación porcentual de cada uno de ellos.

$$AIC = n \ln (SSQ) + 2 p \quad (Ec.2)$$

en la que:

n = número de pares de puntos experimentales

p = número de parámetros

SSQ = suma ponderada de los cuadrados de los residuales

1.5.1.2. Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos .

El ajustado por mínimos cuadrados llevado a cabo mediante el programa ELSMOS, suministró los coeficientes y exponentes de las ecuaciones correspondientes a los modelos de dos y tres compartimientos, así como los respectivos parámetros farmacocinéticos.

a) Modelo bicompartimental

La ecuación representativa del decurso de niveles plasmáticos de fármaco tras su administración intravenosa, según el modelo bicompartimental esquematizado en la FIGURA 1.5, es la siguiente:

$$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t} \quad (\text{Ec.3})$$

siendo:

A_0 = ordenada en el origen de la fase de disposición rápida

B_0 = ordenada en el origen de la fase de disposición lenta

α = constante de disposición rápida

β = constante de disposición lenta

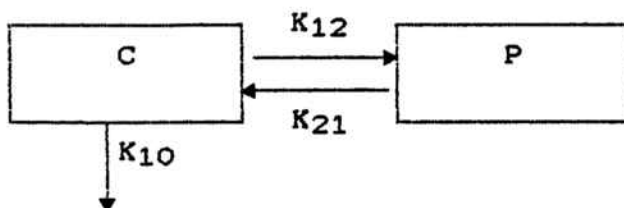


FIGURA 1.5. Esquema explicativo del comportamiento de un fármaco administrado por vía intravenosa, según un modelo bicompartimental, siendo C el compartimiento central y P el periférico.

Los principales parámetros farmacocinéticos de acuerdo con este modelo así como las ecuaciones que los representan se detallan a continuación:

- Concentración inicial:

$$C_0 = A_0 + B_0 \quad (\text{Ec.4})$$

- Constante de retorno:

$$K_{21} = (A_0 \alpha + B_0 \beta) / C_0 \quad (\text{Ec.5})$$

- Constante de distribución:

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10} \quad (\text{Ec.6})$$

- Constante de eliminación:

$$K_{10} = \alpha \beta / K_{21} \quad (\text{Ec.7})$$

- Semivida biológica:

$$t_{1/2} \beta = \ln 2 / \beta \quad (\text{Ec.8})$$

- Semivida de disposición de la fase α :

$$t_{1/2} \alpha = \ln 2 / \alpha \quad (\text{Ec.9})$$

- Volumen de distribución en compartimento central:

$$V_c = D / C_0 \quad (\text{Ec.10})$$

siendo D la dosis de fármaco administrada.

- Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario:

$$V_{dss} = V_c + (K_{12} V_c) / K_{21} \quad (\text{Ec.11})$$

- Area bajo la curva de niveles plasmáticos:

$$AUC_{0-\infty} = (A_0 / \alpha) + (B_0 / \beta) \quad (\text{Ec.12})$$

- Aclaramiento plasmático:

$$Cl_p = D / AUC_{0-\infty} \quad (\text{Ec.13})$$

b) Modelo tricompartmental

El curso de niveles plasmáticos de fármaco observado después de su administración intravenosa, obedeciendo el modelo tricompartmental esquematizado en la FIGURA 1.6 viene dado por la ecuación:

$$C = A_0 e^{-\alpha t} + P_0 e^{-\pi t} + B_0 e^{-\beta t} \quad (\text{Ec.14})$$

Conocidos los coeficientes A_0 , B_0 y P_0 u ordenadas en el origen de las fases de disposición rápida, intermedia y lenta,

respectivamente y las constantes cinéticas α , π y β que las representan, los principales parámetros farmacocinéticos se deducen a partir de las ecuaciones siguientes:

- Concentración plasmática inicial:

$$C_0 = P_0 + A_0 + B_0 \quad (\text{Ec.15})$$

- Semivida biológica:

$$t_{1/2} \beta = \ln 2 / \beta \quad (\text{Ec.16})$$

- Constantes de retorno de los compartimientos periféricos superficial (K_{21}) y profundo (K_{31}):

$$K_{21} = \alpha + [A_0(\beta - \alpha)(\alpha - \pi) / (P + A + B)(\alpha - K_{31})] \quad (\text{Ec.17})$$

$$K_{31} = \beta + [B_0(\beta - \pi)(\alpha - \pi) / (P + A + B)(K_{21} - \pi)] \quad (\text{Ec.18})$$

La resolución de este sistema de ecuaciones es una ecuación de segundo grado de cuyas soluciones se asume por definición que la inferior corresponde al valor K_{31} siendo el valor de K_{21} la superior.

- Constante de eliminación:

$$K_{10} = \alpha \beta \pi / K_{21} K_{31} \quad (\text{Ec.19})$$

- Constantes de distribución en los compartimientos periférico superficial (K_{12}) y profundo (K_{13}):

$$K_{12} = [(\alpha\beta + \alpha\pi + \beta\pi) - K_{21}(\alpha + \beta + \pi) - K_{10} K_{31} + K_{21}] / K_{31} - K_{21} \quad (\text{Ec.20})$$

$$K_{13} = \alpha + \beta + \pi - (K_{10} + K_{12} + K_{21} + K_{31}) \quad (\text{Ec.21})$$

- Area total bajo la curva de niveles plasmáticos:

$$AUC_{0-\infty} = P_0/\pi + A_0/\alpha + B_0/\beta \quad (\text{Ec.22})$$

- Aclaramiento plasmático:

$$Cl_p = D/AUC_{0-\infty} \quad (\text{Ec.23})$$

- Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario:

$$V_c = D/C_0 \quad (\text{Ec.24})$$

siendo D la dosis de fármaco administrada.

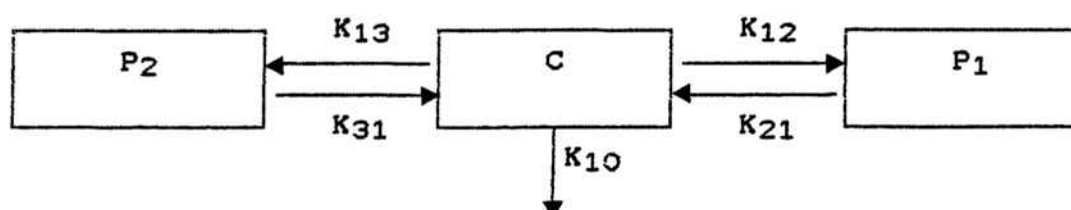


FIGURA 1.6. Esquema representativo del comportamiento de un fármaco administrado vía intravenosa, según un modelo tricompartmental, siendo C el compartimento central, P₁ el compartimento periférico superficial y P₂ el compartimento periférico profundo.

1.5.2. Administración oral

1.5.2.1. Elección del modelo farmacocinético óptimo

Análogamente a la administración intravenosa, se abordó el ajustado por regresión no lineal de las ecuaciones biexponencial (Ec.25) y triexponencial (Ec.26) correspondiente, a los modelos mono y bicompartimental, respectivamente, a los datos experimentales obtenidos después del tratamiento oral, con objeto de elegir la que con mayor probabilidad se ajustase a nuestros datos, basándonos de nuevo en el criterio de MAICE.

$$C = -A_0 e^{-K_1 t} + B_0 e^{-K_2 t} \quad (\text{Ec.25})$$

$$C = -P_0 e^{-K_0 t} + A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t} \quad (\text{Ec.26})$$

1.5.2.2. Determinación de los principales parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos a determinar en cada uno de los casos anteriormente mencionados son:

a) Ajustado de los datos experimentales de acuerdo con una ecuación biexponencial

- Tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima:

$$T_{max} = \frac{\ln (A_0 K_a / B_0 K)}{K_a - K} \quad (\text{Ec.27})$$

- Concentración plasmática máxima:

$$C_{max} = A_0 e^{-K_a T_{max}} + B_0 e^{-K T_{max}} \quad (\text{Ec.28})$$

- Periodo de latencia (en el caso de que exista):

$$T_0 = \frac{\ln (A_0 / B_0)}{K_a - K} \quad (\text{Ec.29})$$

- Area total bajo la curva de niveles plasmáticos:

$$AUC_{0-\infty} = \frac{B_0}{K} - \frac{A_0}{K_a} - \left[\frac{B_0}{K} (1 - e^{-K T_0}) - \frac{A_0}{K_a} (1 - e^{-K_a T_0}) \right] \quad (\text{Ec. 30})$$

b) Ajustado de los datos experimentales de acuerdo con una ecuación triexponencial

Una vez conocidos los coeficientes de la ecuación P_0 , A_0 y B_0 u ordenadas en el origen de los procesos de absorción, disposición rápida y disposición lenta respectivamente, así como las constantes cinéticas que los rigen K_{01} , α y β , y asumiendo que el proceso de absorción es el más rápido, los principales parámetros farmacocinéticos a determinar son:

- Concentración plasmática máxima:

$$C_{max} = - P_0 e^{-K_{01}t_{max}} + A_0 e^{-\alpha t_{max}} + B_0 e^{-\beta t_{max}} \quad (\text{Ec.31})$$

- Area total bajo la curva de niveles plasmáticos:

$$AUC_{0-\infty} = \frac{B_0}{\beta} + \frac{A_0}{\alpha} + \frac{P_0}{K_{01}} \left[\frac{B_0}{\beta} (1 - e^{-\beta T_0}) + \frac{A_0}{\alpha} (1 - e^{-\alpha T_0}) + \frac{P_0}{K_{01}} (1 - e^{-K_{01} T_0}) \right]$$

(Ec. 32)

c) Cálculo de la biodisponibilidad

La biodisponibilidad en magnitud se calculó a partir de la relación de áreas bajo las curvas de niveles plasmáticos normalizadas por las dosis tras la administración oral e intravenosa, según la ecuación que a continuación se detalla:

$$F = \frac{AUC_0 \text{ oral} / D \text{ oral}}{AUC_0 \text{ iv} / D \text{ iv}} \quad (\text{Ec.33})$$

La biodisponibilidad en velocidad se evaluó a partir de los parámetros C_{max} y T_{max} .

1.5.3. Estimación de los momentos estadísticos

El ajustado de las ecuaciones poliexponenciales a los valores de las concentraciones plasmáticas experimentales después de la administración del fármaco, se hace de acuerdo con un modelo compartimental predeterminado, suponiendo que los procesos de transferencia entre compartimientos siguen cinéticas de orden uno.

Sin embargo, el método de los momentos estadísticos (5) se basa en que el tránsito del medicamento en el organismo es un proceso estocástico, estando regido el movimiento de las moléculas de fármaco por una función de probabilidad. En

consecuencia puede considerarse el tiempo de residencia del fármaco en el organismo como el resultado de una distribución de frecuencias, con sus correspondientes media y varianza.

Los parámetros a estimar por este método son:

- Momento estadístico de orden cero o área bajo la curva de niveles plasmáticos:

$$AUC_{0-\infty} = \int_0^{\infty} C dt \quad (\text{Ec.34})$$

- Primer momento estadístico o tiempo medio de residencia, siendo éste el tiempo medio durante el cual las moléculas de fármaco permanecen inalteradas en el organismo:

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} t C dt}{\int_0^{\infty} C dt} \quad (\text{Ec.35})$$

- Segundo momento estadístico o varianza del tiempo medio de residencia:

$$VRT = \frac{\int_0^{\infty} (t - MRT)^2 C dt}{\int_0^{\infty} C dt} \quad (\text{Ec.36})$$

La estimación de los momentos estadísticos se efectuó para las tres dosis de fármaco ensayadas por vía intravenosa y para la única dosis oral.

1.5.4. Estudio de la linealidad cinética

El estudio de la linealidad cinética se abordó comparando los siguientes parámetros:

- Areas bajo las curvas de niveles plasmáticos normalizadas
- Semividas biológicas
- Aclaramientos plasmáticos
- Volúmenes de distribución

estimados mediante los dos métodos anteriormente descritos, compartimental y no compartimental, para las tres dosis de fármaco ensayadas.

La comparación estadística de dichos parámetros se efectuó en primer lugar mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), previa determinación de la homogeneidad de las varianzas mediante el ensayo de Barlett. La comparación entre grupos se efectuó por aplicación del ensayo de Scheffé.

En los casos en que las varianzas no fueron homogéneas, la comparación estadística se realizó mediante un análisis no paramétrico, concretamente con el ensayo de Kruskal-Wallis; en este caso la comparación entre grupos se efectuó mediante el ensayo de U de Mann-Whitney.

BIBLIOGRAFIA INTRODUCCION

1. Deitrich Richard A, Troxell Pequita A, Worth Williams, Erwin Gene V. Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. *Biochemical Pharmacology* 1976: 25, 2733-2737.
2. Prufonosa J, Obach R, Vallés J M. Determination of cyanamide in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1986: 377, 253-260.
3. Francis R J. ELSMOS-an extended least squares modelling system in FORTRAN IV for mini-or-micro-computer implementation. *Computer Methods Programs in Biomedicine* 1984: 18, 43-50.
4. Dunne A. JANA: A new iterative polyexponential curve stripping program. *Computer Methods and programs in Biomedicine* 1985: 20, 269-275.
5. Akaike H. An information criterion (AIC). *Mathematical Scientist*. 1976: 14 (156), 5-9.
6. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics & Biopharmaceutics* 1978: 6, 165-175.
7. Wagner J G. *Fundamentals of clinical pharmacokinetics*. Drug Intelligence Publications, Inc. Illinois, 1975.
8. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics & Biopharmaceutics* 1978: 6 (6), 547-558.

9. Cutler D J. Theory of the mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies. Journal of Pharmacy & Pharmacology 1978: 30, 476-478.

CAPITULO 2

RESULTADOS

2.1. Estudio farmacocinético tras la administración intravenosa

2.1.1. Niveles plasmáticos de fármaco

Los niveles plasmáticos de cianamida estimados en cada una de las cinéticas intravenosas individuales después de la administración de dosis de 1, 2 y 4 mg/kg, se especifican en las TABLAS 2.1, 2.2 y 2.3, respectivamente.

Las representaciones gráficas de las curvas ajustadas de niveles plasmáticos de cianamida y de las curvas de correlación entre las concentraciones experimentales y teóricas, así como la distribución de residuales obtenidos tras el ajustado, se muestran en las FIGURAS 2.1 a 2.5, 2.6 a 2.10 y 2.11 a 2.15 para las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg, respectivamente.

TABLA 2.1. Concentraciones plasmáticas en función del tiempo obtenidas tras la administración intravenosa de 1 mg/kg de fármaco.

PERRO Nº	CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CIANAMIDA											
	DOSIS 1 mg/kg i.v.											
1	t (min)	1	3	5	10	20	30	45	60	90	120	180
	C (ng/ml)	1932	1842	1118	924	660	449	367	366	238	143	53
2	t (min)	1	3	5	11	20	31	45	61	92	121	
	C (ng/ml)	3002	1425	1015	799	695	515	340	217	123	50	
3	t (min)	1	3	5	10	21	31	45	64	94	120	
	C (ng/ml)	1692	1711	980	979	588	400	357	332	132	76	
4	t (min)	1	3	5	10	20	31	46	62	91	120	
	C (ng/ml)	1532	1502	1079	1319	619	392	335	180	127	73	
5	t (min)	2	5	10	21	33	49	60	90	122	180	
	C (ng/ml)	1233	904	863	684	513	339	263	154	106	43	

TABLA 2.2. Concentraciones plasmáticas en función del tiempo obtenidas después de la administración intravenosa de 2 mg/kg de fármaco.

PERRO Nº		CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CIANAMIDA DOSIS 2 mg/kg i.v.											
1	t (min)	1	3	5	10	20	30	45	60	90	122	181	240
	C (ng/ml)	2973	2563	2222	1850	1525	1128	964	758	478	269	149	63
2	t (min)	1	3	11	20	30	44	59	90	120	180	239	
	C (ng/ml)	4209	2909	2166	2090	1840	1060	861	513	312	219	69	
3	t (min)	1	3	5	10	20	30	46	60	90	120	180	240
	C (ng/ml)	6646	4206	3101	2294	1846	1604	1037	753	458	306	133	56
4	t (min)	1	3	5	10	20	31	46	62	91	120	180	241
	C (ng/ml)	3985	3036	2842	2384	1499	1303	952	677	472	238	136	51
5	t (min)	2	4	6	10	21	32	46	61	92	121	181	240
	C (ng/ml)	4614	3517	2530	2424	1714	1638	1294	940	575	349	128	62

TABLA 2.3. Concentraciones plasmáticas en función del tiempo obtenidas después de la administración intravenosa de 4 mg/kg de fármaco.

PERRO Nº		CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CIANAMIDA DOSIS 4 mg/kg i.v.												
1	t (min)	1	3	5	10	20	30	45	60	90	120	180	240	360
	C (ng/ml)	4225	3275	1790	2581	1875	1504	1681	1318	687	437	247	204	50
2	t (min)	2	4	9	17	22	34	38	61	91	121	182	241	
	C (ng/ml)	7882	6346	5471	4030	3468	3329	2684	2167	1531	827	349	135	
3	t (min)	1	3	5	10	21	31	47	61	92	120	180	241	363
	C (ng/ml)	7594	6257	5515	4062	3126	2501	1995	1651	859	1240	400	199	63
4	t (min)	1	3	5	11	20	32	46	62	90	121	180	240	361
	C (ng/ml)	4989	4756	4348	4283	3006	2707	2323	1924	1410	973	460	239	81
5	t (min)	1	4	6	11	22	31	47	62	93	120	182	367	
	C (ng/ml)	8331	6028	5763	5279	3940	3563	2733	2240	1620	1196	334	77	

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 1 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

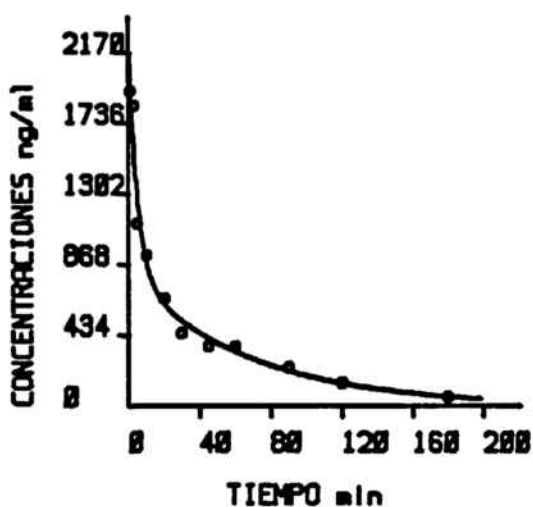
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

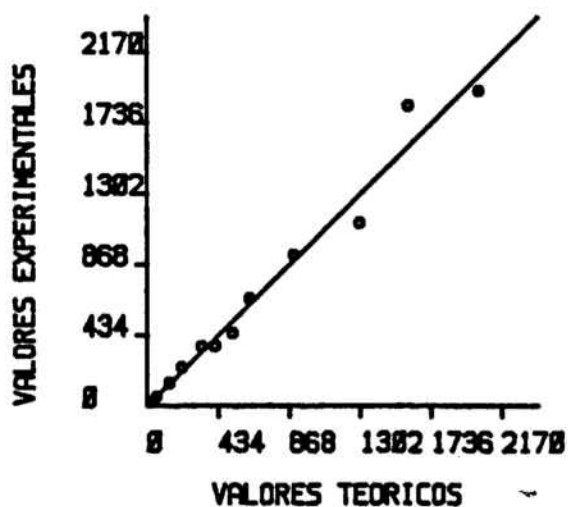
perro n.1

ESTUDIO FARMACOCINETICO

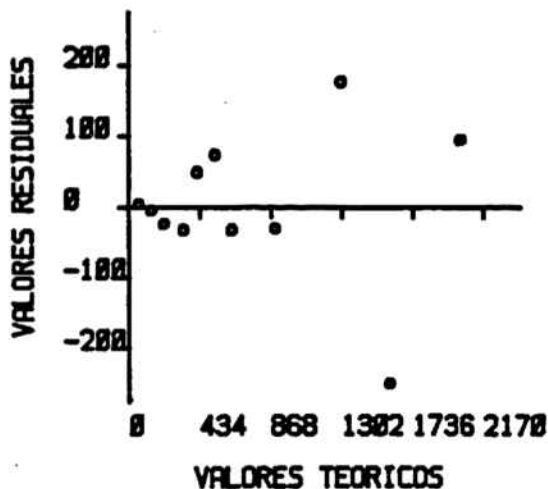
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

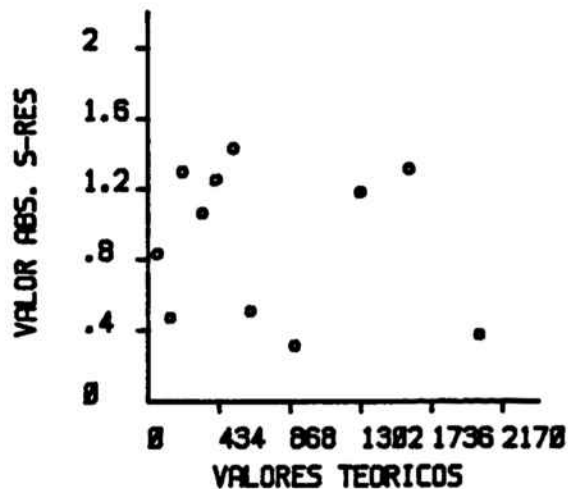


FIGURA 2.1. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlación entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 1 mg/kg de cianamida al perro no.1.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 1 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

perro n.2

ESTUDIO FARMACOCINETICO

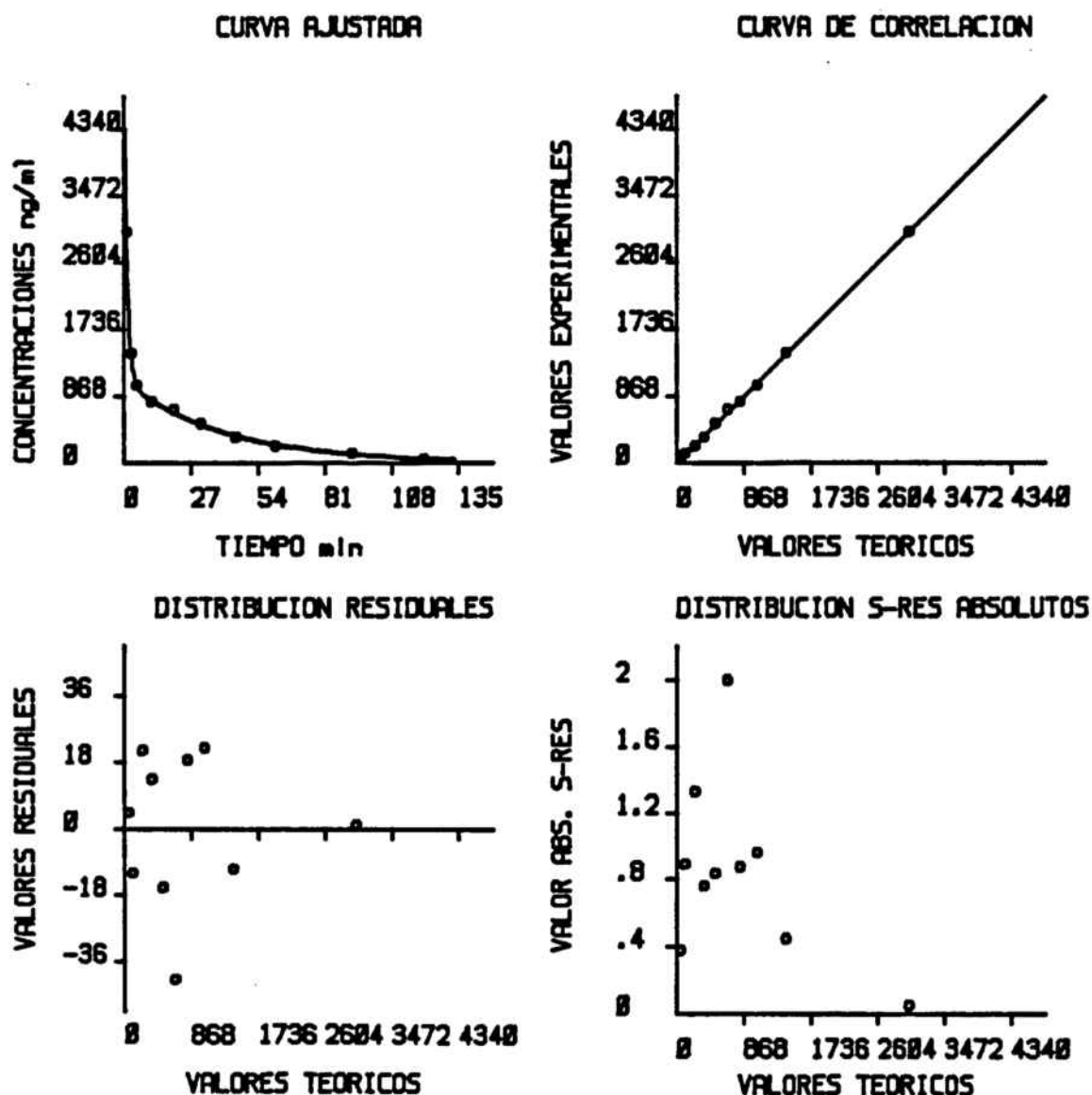


FIGURA 2.2. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 1 mg/kg de cianamida al perro no.2.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 1 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

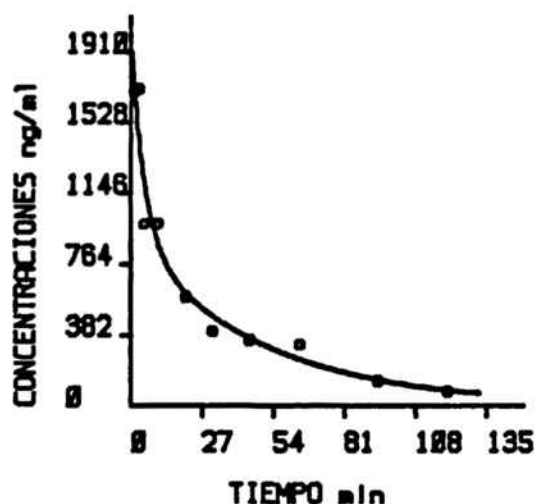
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

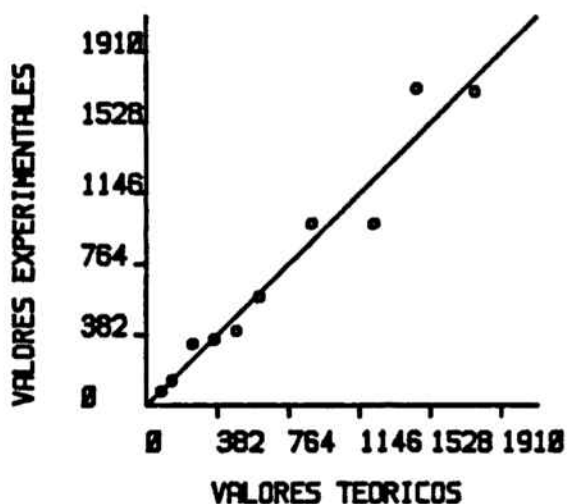
perro n.3

ESTUDIO FARMACOCINETICO

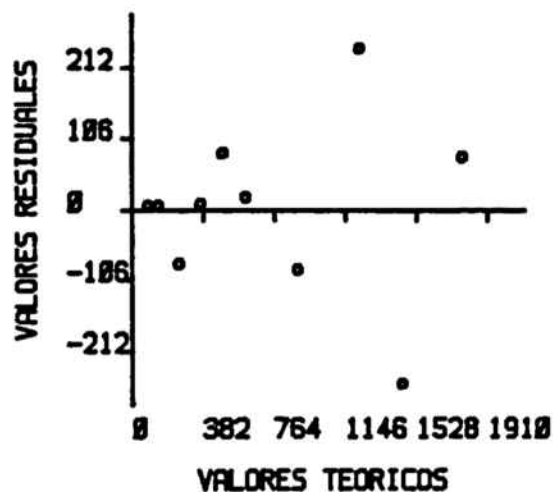
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

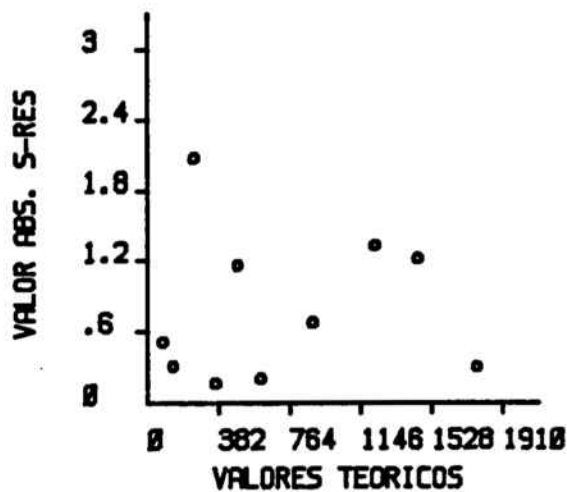


FIGURA 2.3. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales tras la administración intravenosa de 1 mg/kg de cianamida al perro no.3.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 1 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

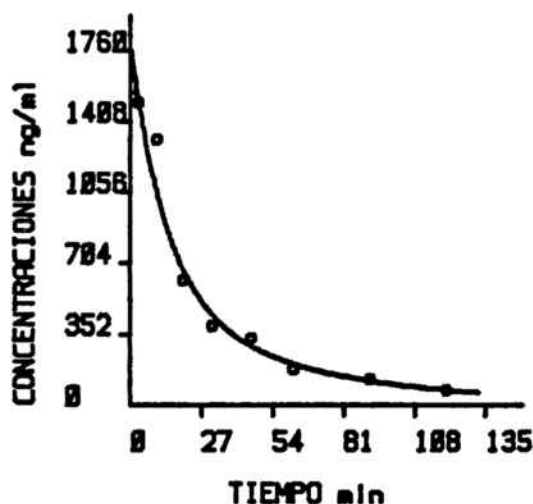
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

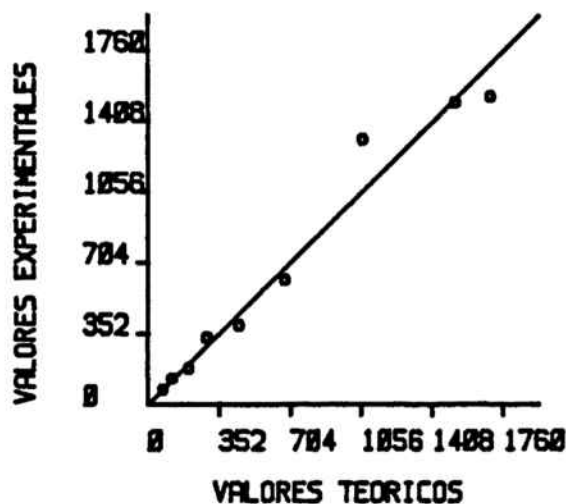
perro n.4

ESTUDIO FARMACOCINETICO

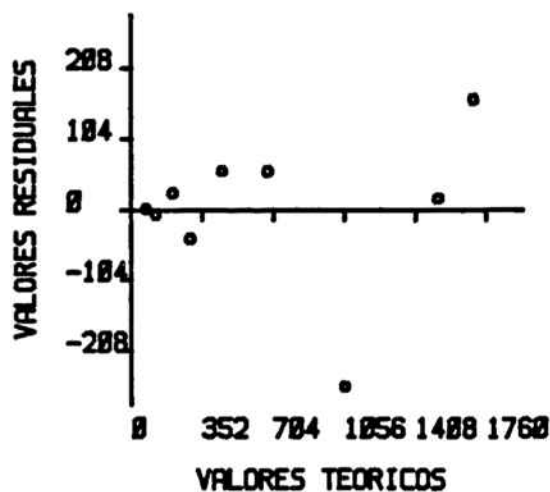
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

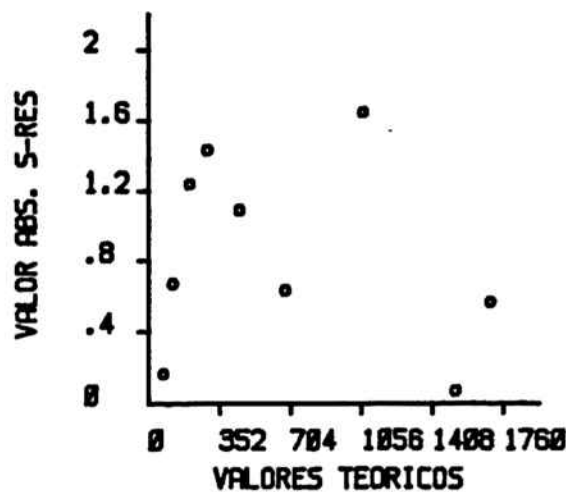


FIGURA 2.4. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 1 mg/kg de cianamida al perro no.4.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 1 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

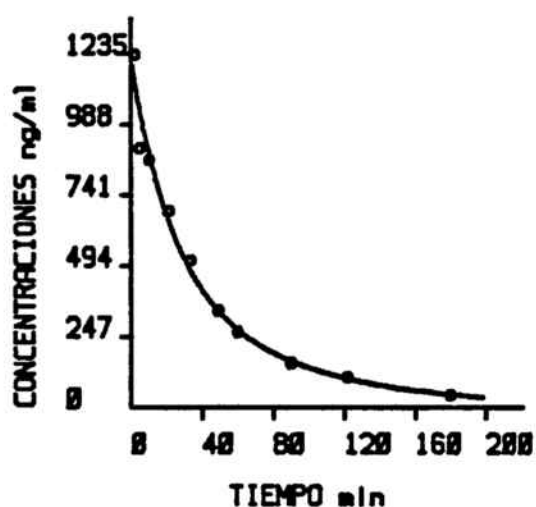
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

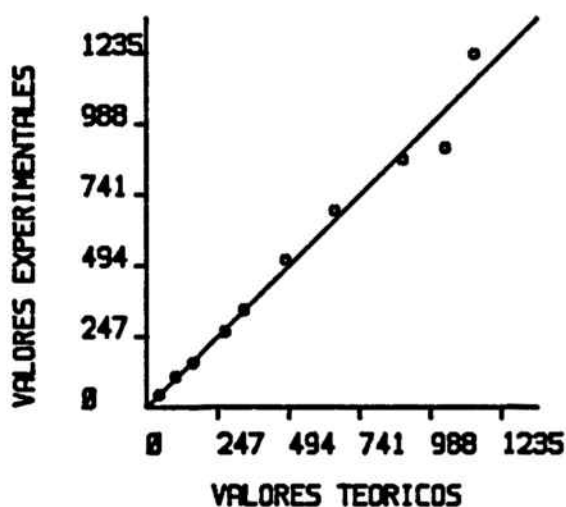
perro n.5

ESTUDIO FARMACOCINETICO

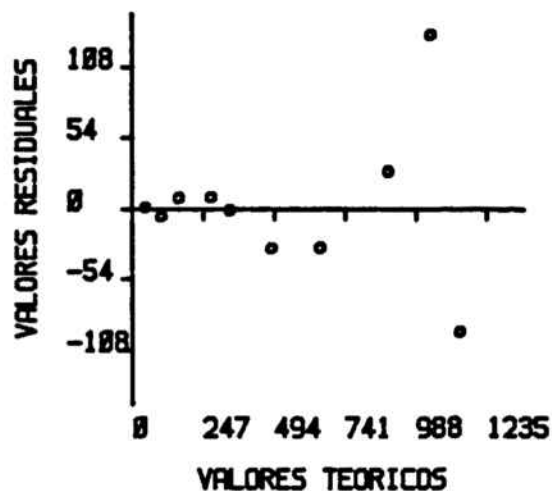
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

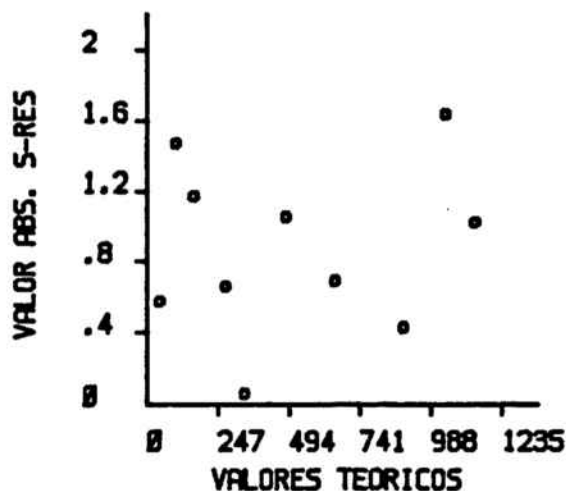


FIGURA 2.5. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración de 1 mg/kg de cianamida al perro no.5.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 2 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

MODELO ERROR: saf 1

perro n.1

ESTUDIO FARMACOCINETICO

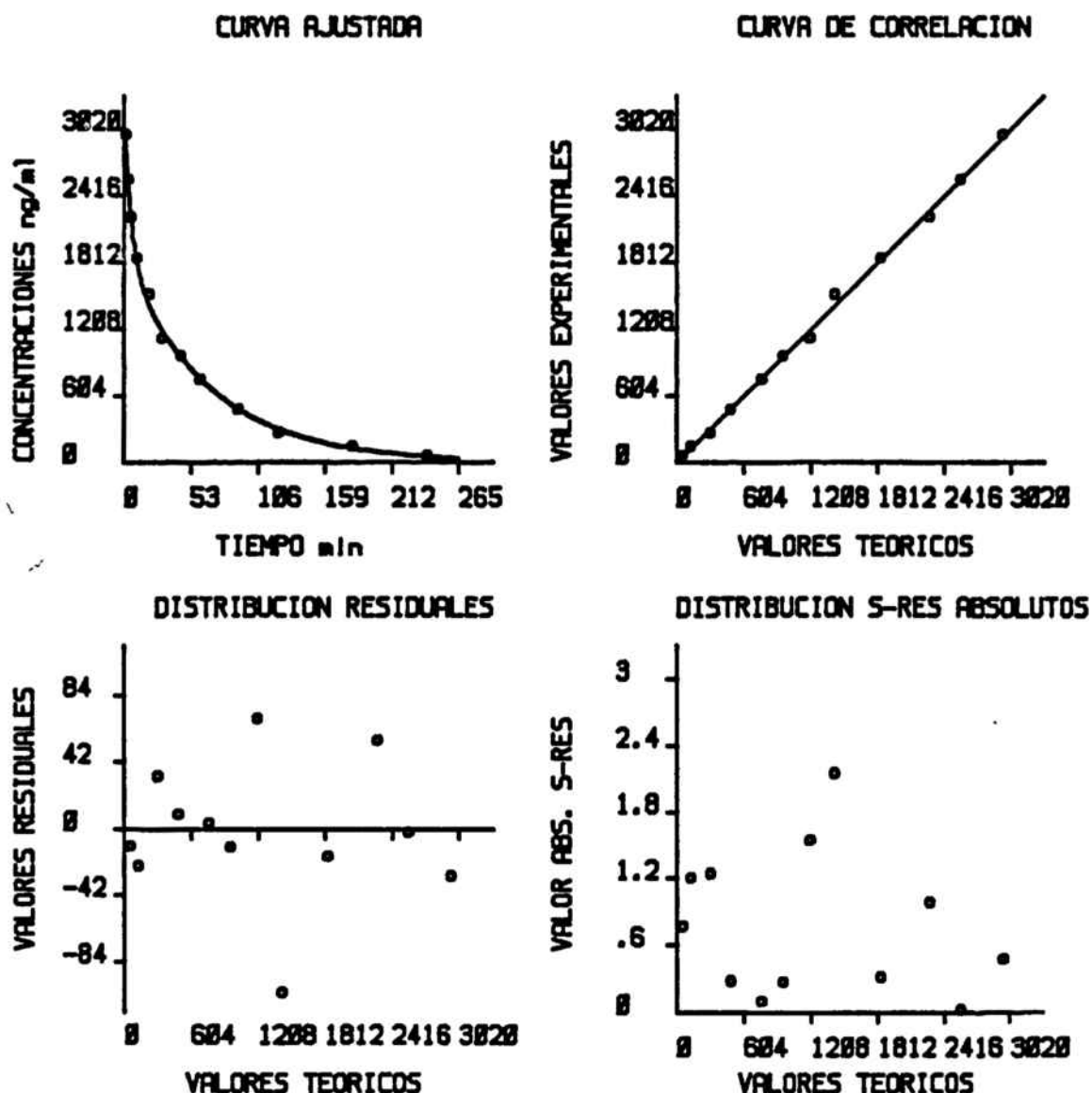


FIGURA 2.6. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de cianamida al perro no.1.

FARMACO: CIANAMIDA
 DOSIS: 2 mg/kg
 MODELO FUNCION: fun 1
 AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.
 MODELO ERROR: saf 1
 perro n.2

ESTUDIO FARMACOCINETICO

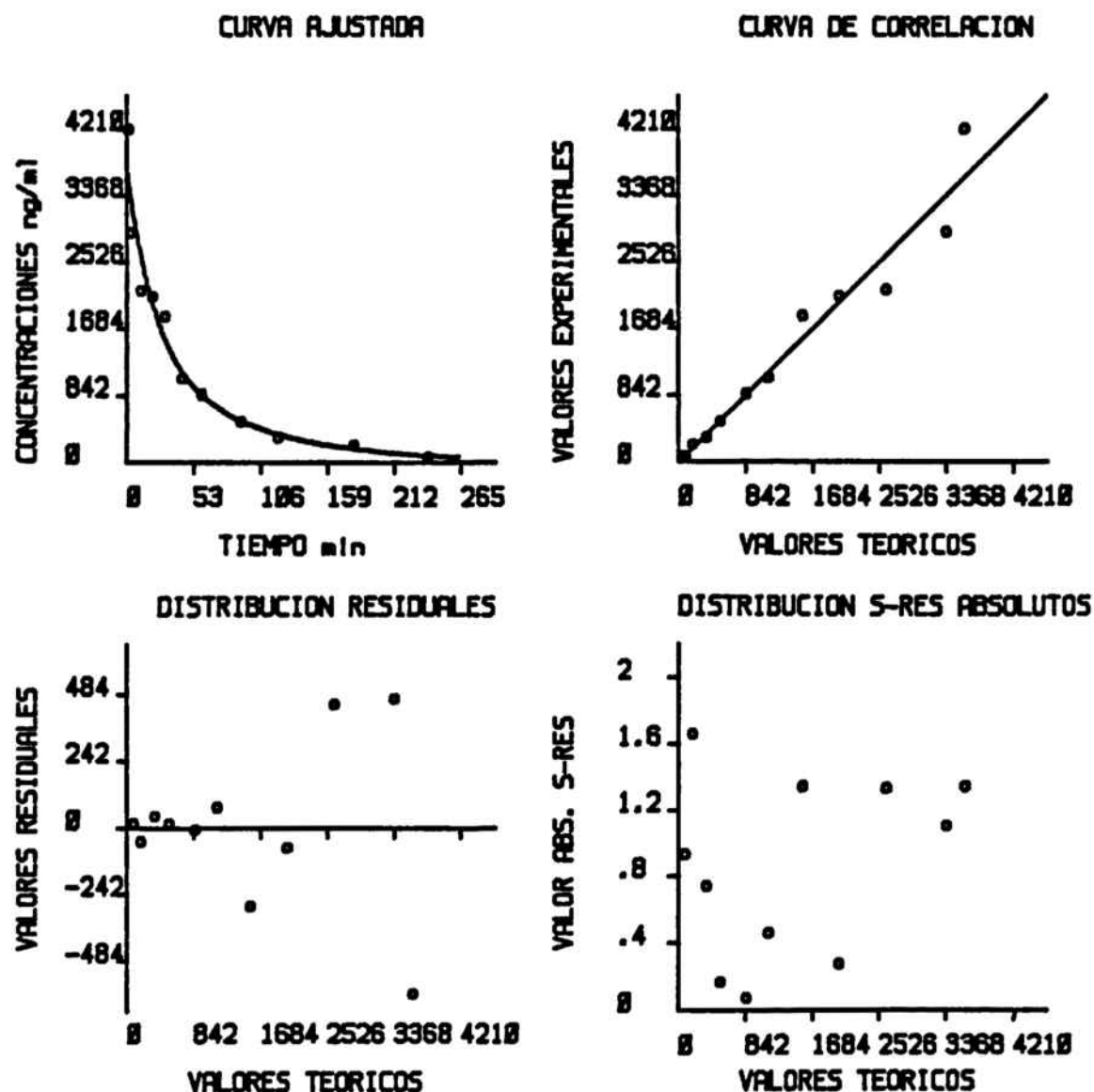


FIGURA 2.7. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de cianamida al perro no.2.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 2 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

MODELO ERROR: saf 1

perro n.3

ESTUDIO FARMACOCINETICO

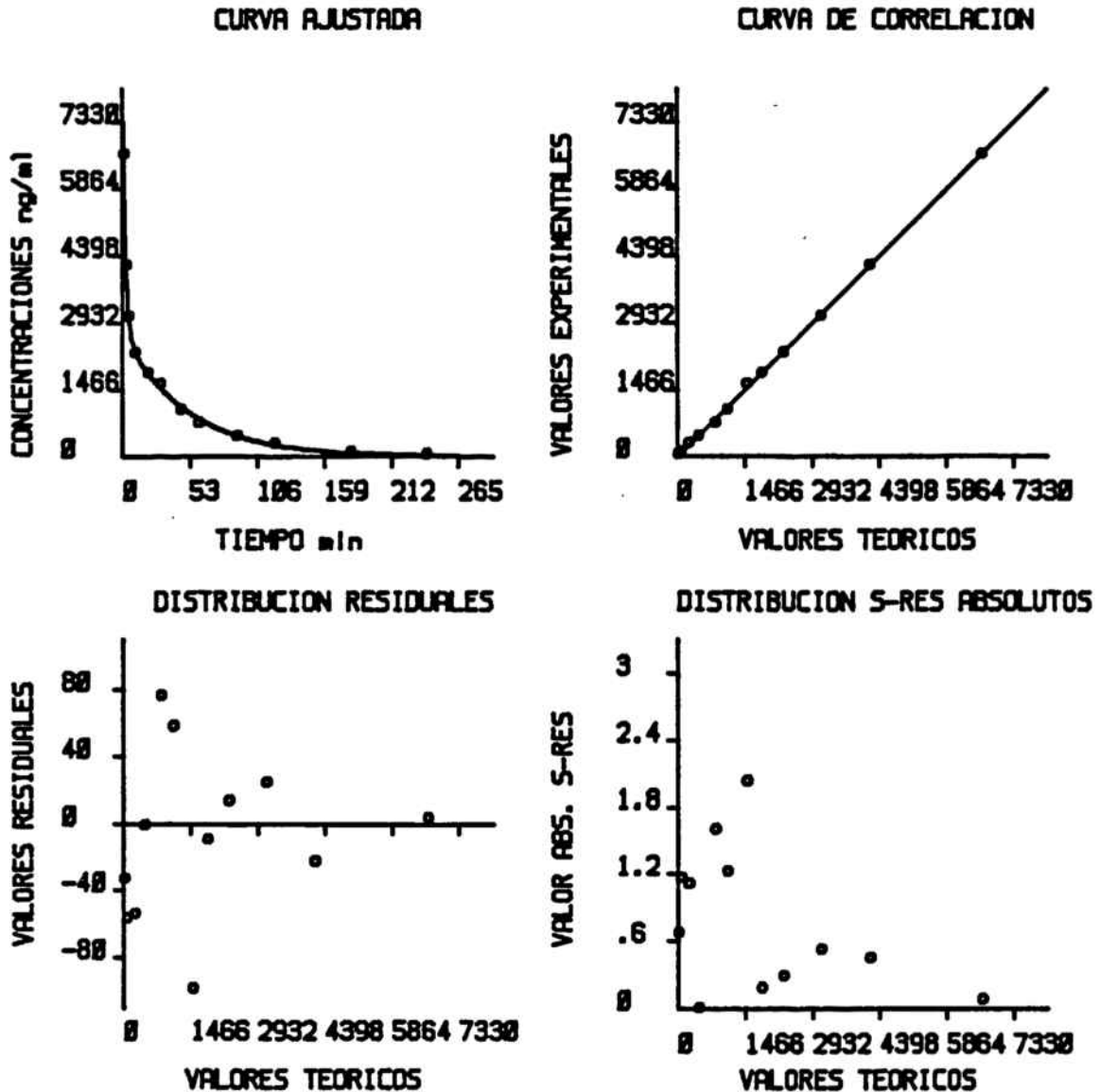


FIGURA 2.8. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de cianamida al perro n.3.

DEPARTAMENT DE FARMACIA. SUBUNITAT DE BIOFARMACIA I FARMACOCINETICA

METODO EXTENDIDO DE MINIMOS CUADRADOS (AJUSTADO ELSMOS)

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 2 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

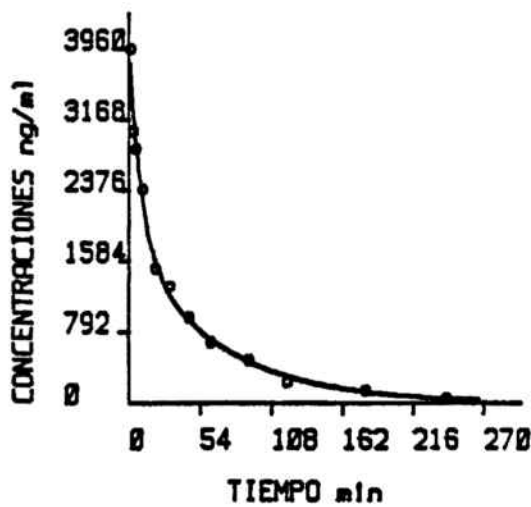
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

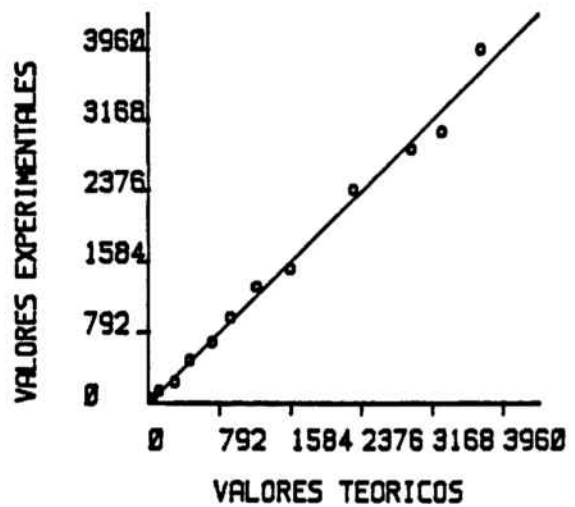
perro n.4

ESTUDIO FARMACOCINETICO

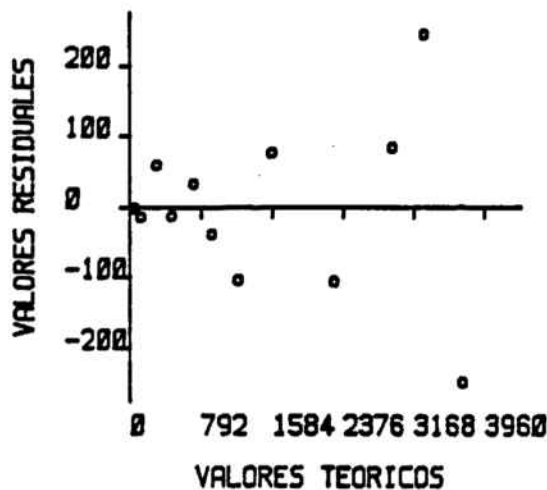
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

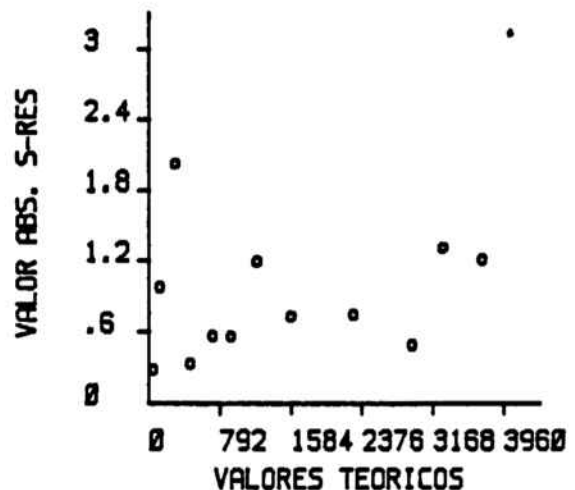


FIGURA 2.9. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de cianamida al perro no.4.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 2 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

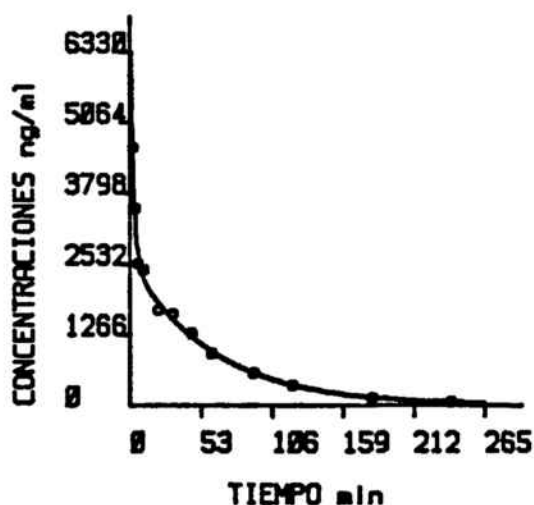
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

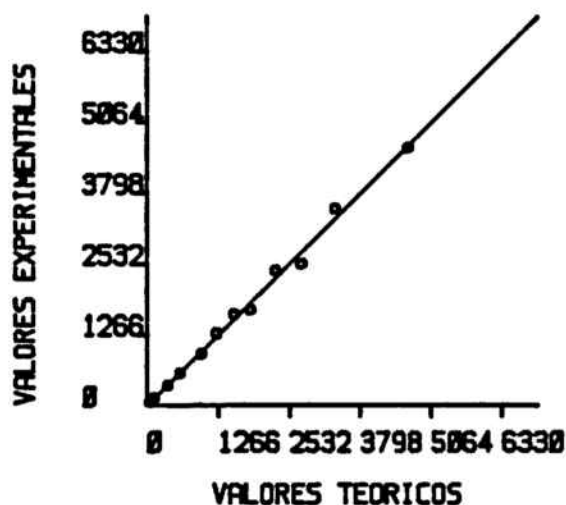
perro n.5

ESTUDIO FARMACOCINETICO

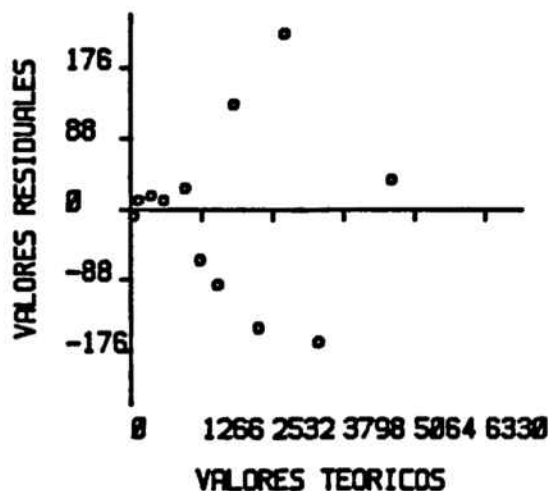
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

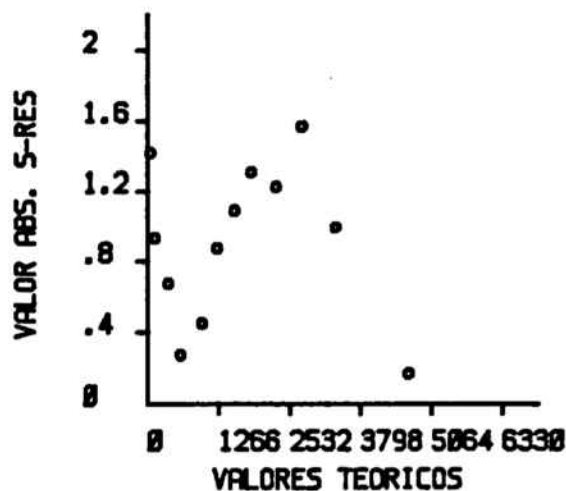


FIGURA 2.10. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de cianamida al perro no.5.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSES: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

MODELO ERROR: saf 1

perro n.1

ESTUDIO FARMACOCINETICO

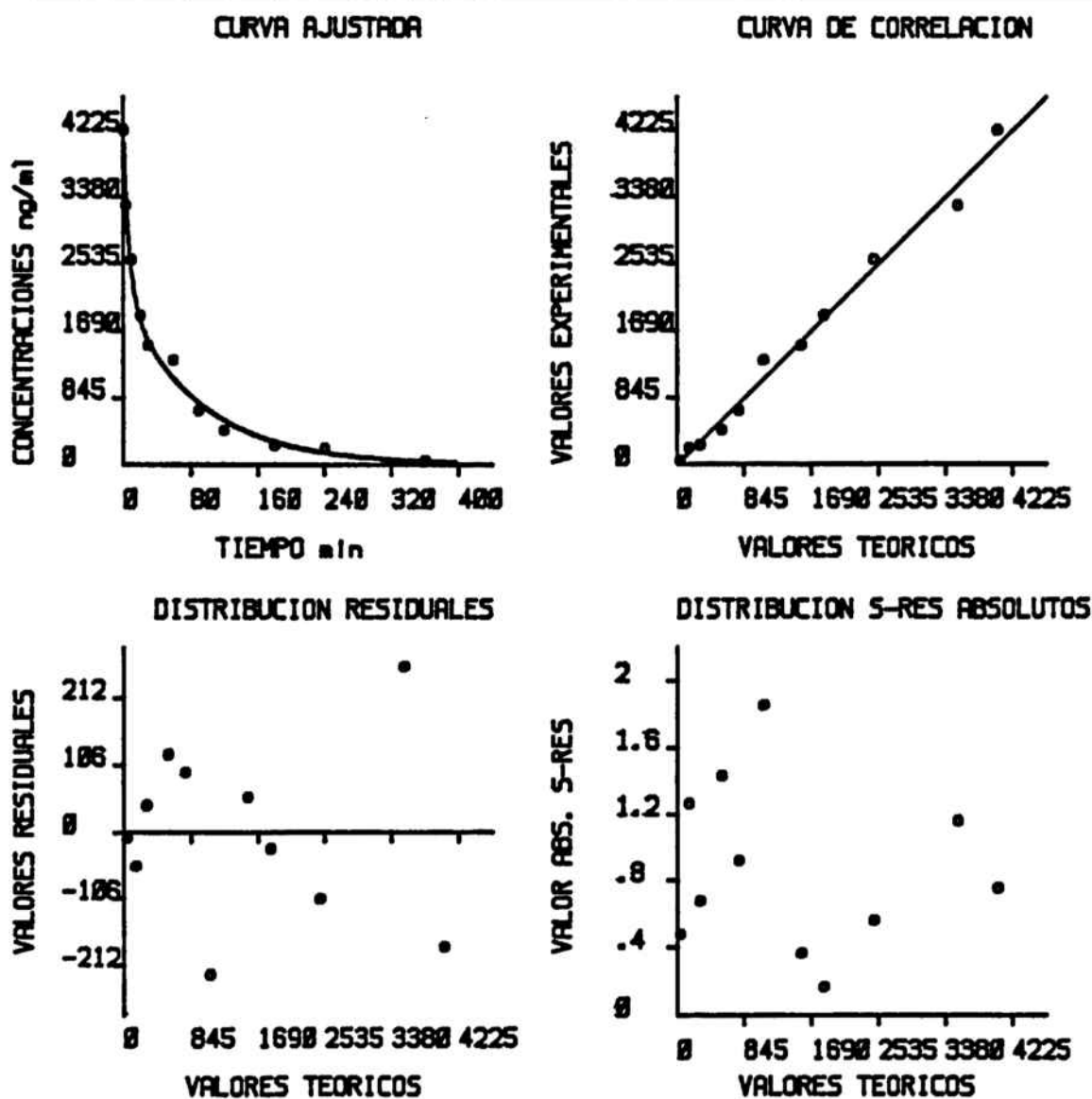


FIGURA 2.11. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 4 mg/kg de cianamida al perro no.1.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

perro n.2

ESTUDIO FARMACOCINETICO

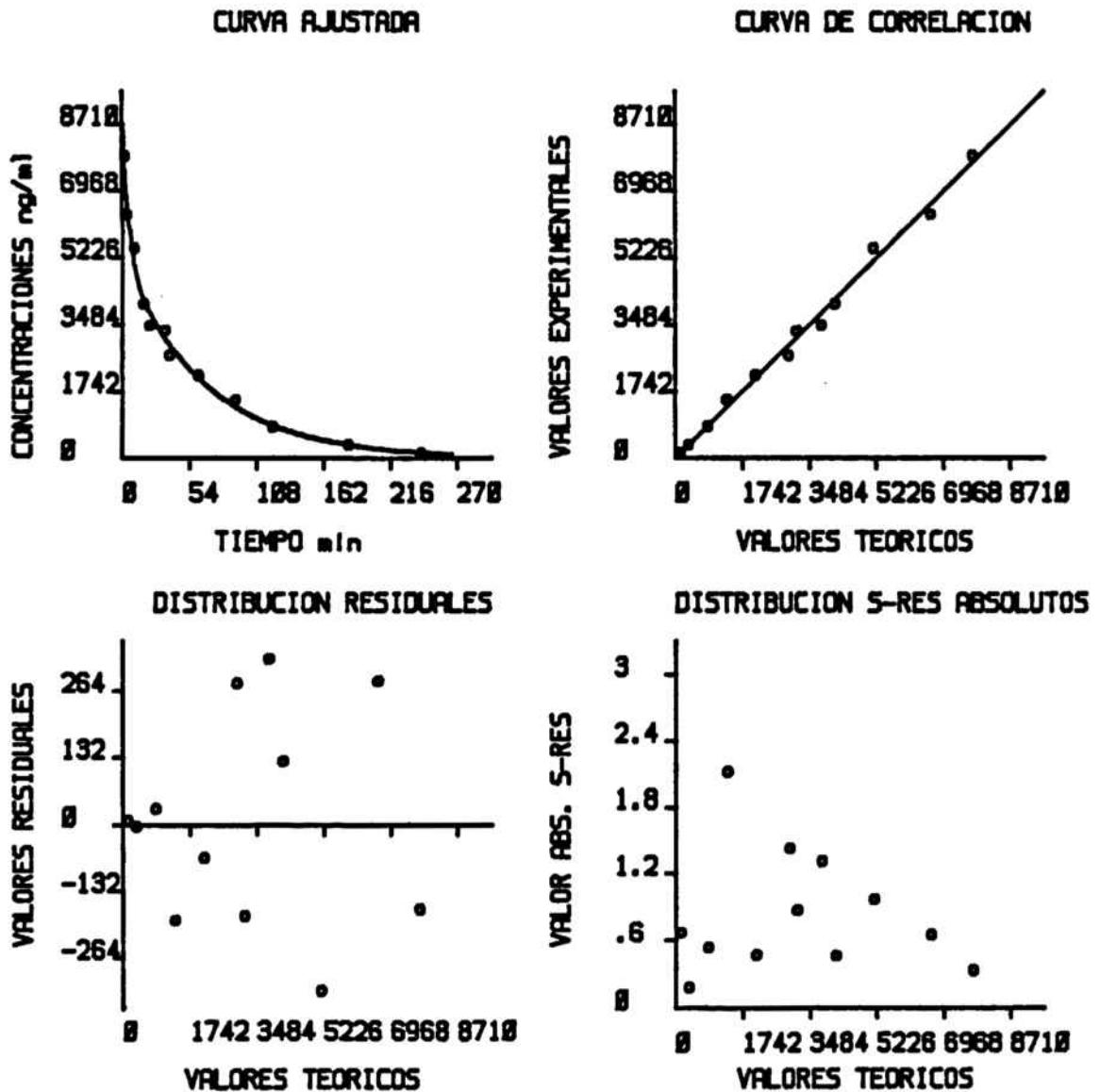


FIGURA 2.12. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 4 mg/kg de cianamida al perro no.2.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

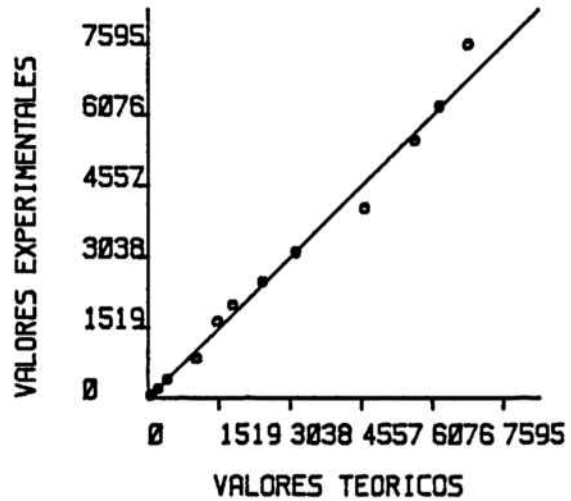
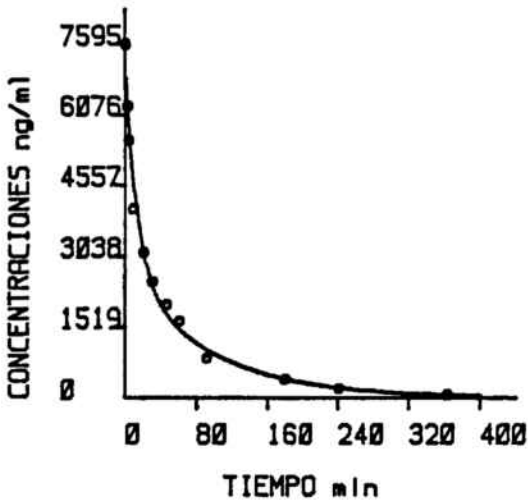
MODELO ERROR: sef 1

perro n.3

ESTUDIO FARMACOCINETICO

CURVA AJUSTADA

CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES

DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

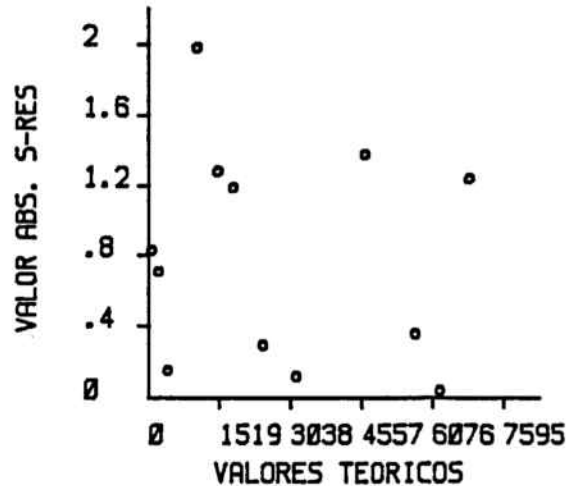
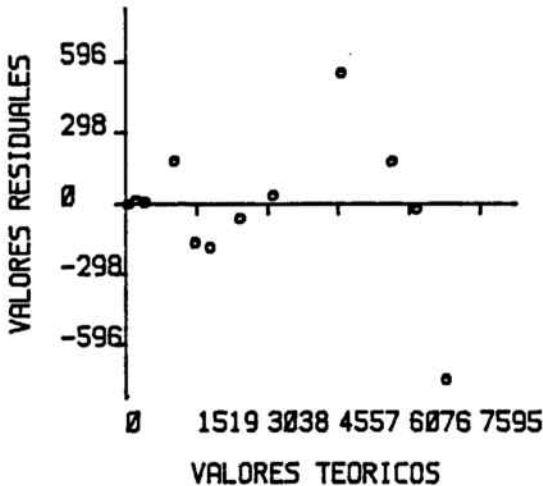


FIGURA 2.13. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración de 4 mg/kg de cianamida al perro no.3.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

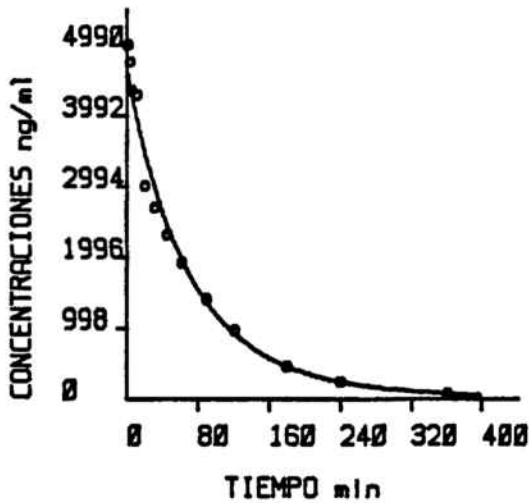
VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

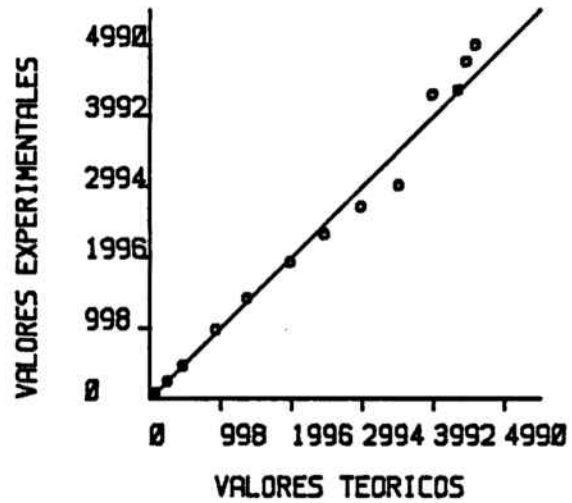
perro n.4

ESTUDIO FARMACOCINETICO

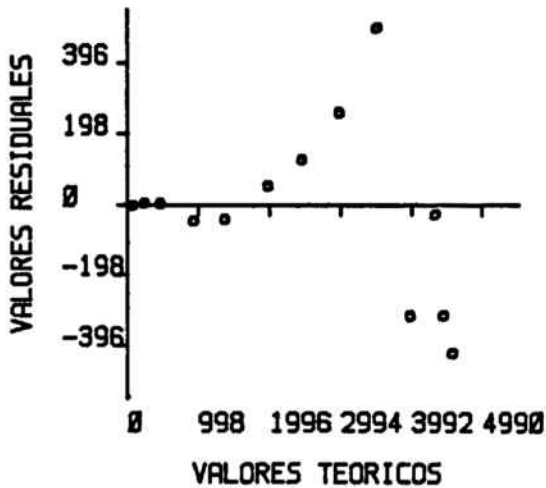
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

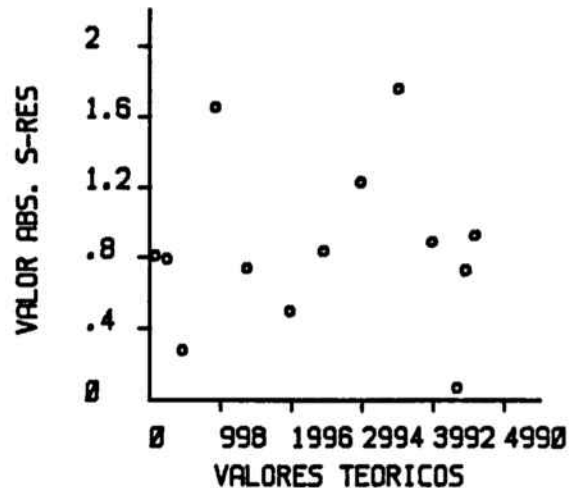


FIGURA 2.14. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 4 mg/kg de cianamida al perro no.4.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 1

AJUSTADO: bicompartimental

VIA: i.v.

MODELO ERROR: sef 1

perro n.5

ESTUDIO FARMACOCINETICO

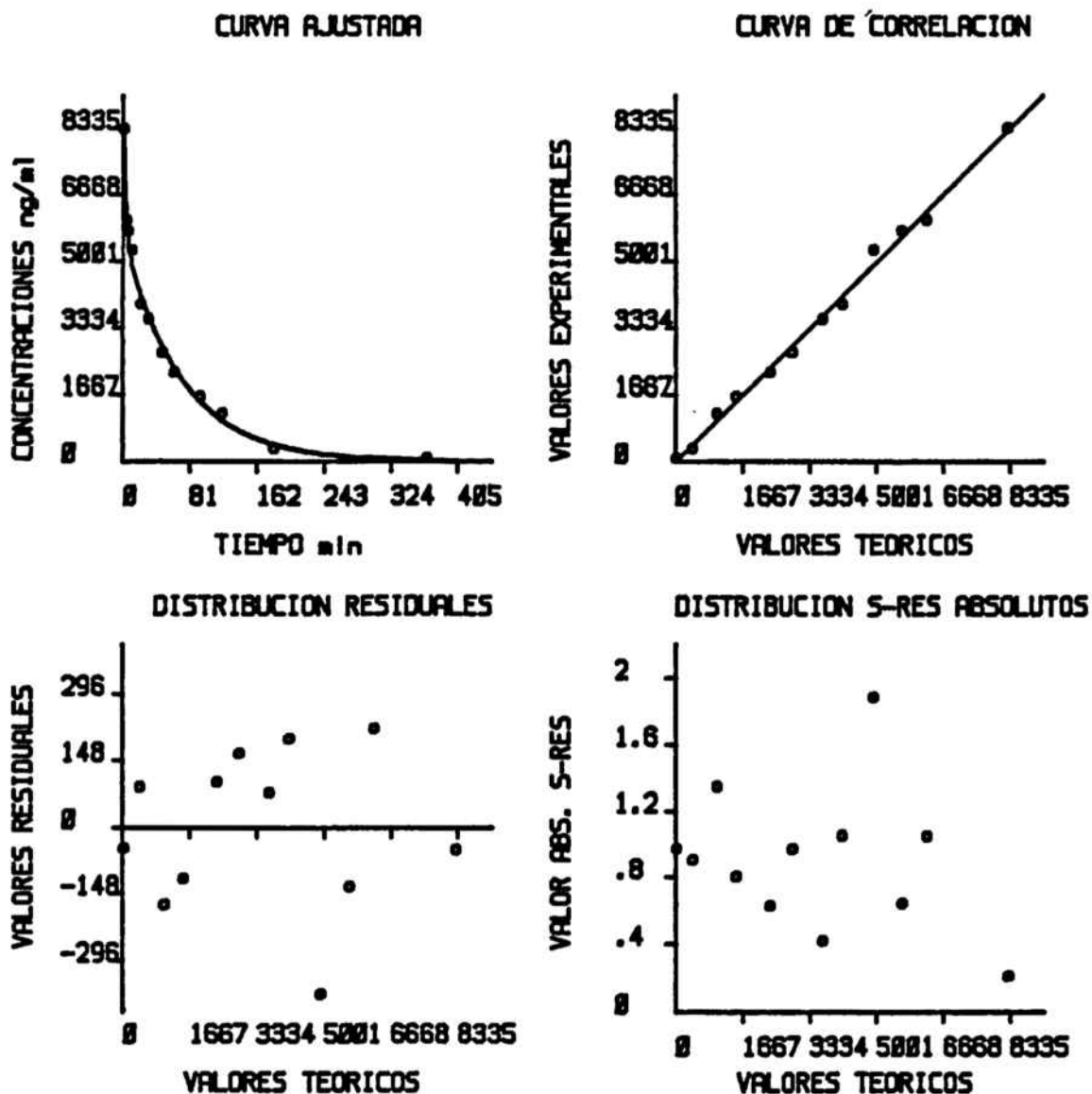


FIGURA 2.15. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre valores experimentales y teóricos y distribución de residuales, tras la administración intravenosa de 4 mg/kg de cianamida al perro no.5.

2.1.2. Elección del modelo farmacocinético óptimo

Los resultados obtenidos por vía i.v., que figuran en la TABLA 2.4, después de la aplicación del criterio de MAICE, ponen de manifiesto que después de la administración de las dosis media y alta de fármaco, los ajustados bicompartimental y tricompartmental explican ambos satisfactoriamente los resultados experimentales, mientras que sólo un comportamiento bicompartimental es capaz de explicar los resultados obtenidos con la dosis más baja.

Sin embargo, mediante la evaluación de los coeficientes de variación porcentual de los correspondientes parámetros estimados para cada nivel de dosificación, cuyos valores promedio se presentan en la TABLA 2.5, se llegó a la conclusión de que el modelo bicompartimental era el que mejor ajusta todos los datos experimentales.

Ante este dilema y dado que uno de los objetivos propuestos en esta Memoria era obtener parámetros farmacocinéticos de la máxima fiabilidad posible, se consideró únicamente el segundo criterio de los mencionados, adoptando el modelo bicompartimental como el más probable para explicar el comportamiento farmacocinético de la cianamida.

TABLA 2.4. Valores de AIC obtenidos después del ajustado de los datos experimentales de acuerdo con los modelos bicompartmental y tricompartmental, para las dosis intravenosas de 1, 2 y 4 mg/kg de fármaco.

VALORES DE AIC				
PERRO Nº	DOSIS (mg/kg)	MODELO BICOMPARTIMENTAL	MODELO TRICOMPARTIMENTAL	ELECCION MODELO
1	1	61.98	-	Bicompartmental
2	1	47.51	49.51	Bicompartmental
3	1	61.37	-	Bicompartmental
4	1	51.86	53.87	Bicompartmental
5	1	48.04	-	Bicompartmental
1	2	64.73	64.36	Tricompartmental
2	2	73.08	75.08	Bicompartmental
3	2	67.48	66.35	Tricompartmental
4	2	70.81	69.75	Tricompartmental
5	2	69.92	70.73	Bicompartmental
1	4	70.74	71.69	Tricompartmental
2	4	79.85	81.94	Bicompartmental
3	4	79.48	73.42	Tricompartmental
4	4	79.32	80.06	Bicompartmental
5	4	81.30	82.39	Bicompartmental

TABLA 2.5. Precisión de la estimación de todos los parámetros farmacocinéticos intravenosos obtenidos tras administración de 1, 2 y 4 mg/kg de cianamida, expresada como coeficiente de variación porcentual promedio.

PERRO Nº	DOSIS (mg/kg)	CV (%) PROMEDIO		ELECCION MODELO
		MODELO BICOMPARTIMENTAL	MODELO TRICOMPARTIMENTAL	
1	1	18.70	-	Bicompartimental
2	1	4.66	5526	Bicompartimental
3	1	34.61	-	Bicompartimental
4	1	34.76	9886	Bicompartimental
5	1	21.42	-	Bicompartimental
1	2	9.52	76.12	Bicompartimental
2	2	33.97	5375	Bicompartimental
3	2	3.80	21.28	Bicompartimental
4	2	13.23	700.2	Bicompartimental
5	2	14.10	193.01	Bicompartimental
1	4	21.10	88.61	Bicompartimental
2	4	23.03	41x10 ⁶	Bicompartimental
3	4	13.10	42.57	Bicompartimental
4	4	43.15	119.04	Bicompartimental
5	4	13.98	124.86	Bicompartimental

2.1.3. Parámetros farmacocinéticos

Los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para las tres dosis de cianamida ensayadas se resumen en las TABLAS 2.6 a 2.8.

TABLA 2.6. Valores individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para la dosis intravenosa de 1 mg/kg.

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE CIANAMIDA (DOSIS 1 mg/kg)					
PARAMETRO (unidades)	PERRO 1	PERRO 2	PERRO 3	PERRO 4	PERRO 5
Ao (µg/ml)	1.51	4.23	1.09	1.27	0.70
Bo (µg/ml)	0.81	1.07	0.89	0.52	0.51
α (min ⁻¹)	0.2042	0.7708	0.1934	0.0723	0.0456
β (min ⁻¹)	0.0147	0.0246	0.0198	0.0162	0.0136
Vc (l/kg)	0.43	0.19	0.51	0.56	0.82
Vd _{ss} (l/kg)	0.97	0.74	0.90	0.90	1.10
AUC (µg/ml) min	62.20	48.96	50.68	49.57	53.02
Clp (l/kg) min ⁻¹	0.0161	0.0204	0.0197	0.0202	0.0189
t _{½α} (min)	3.4	0.9	3.6	9.6	15.2
t _{½β} (min)	47.0	28.1	35.0	42.6	50.9
K ₁₂ (min ⁻¹)	0.1008	0.5118	0.0762	0.0199	0.0092
K ₂₁ (min ⁻¹)	0.0808	0.1753	0.0979	0.0325	0.0271
K ₁₀ (min ⁻¹)	0.0373	0.1083	0.0391	0.0362	0.0229

TABLA 2.7. Valores individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para la dosis intravenosa de 2 mg/kg.

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE CIANAMIDA (DOSIS 2 mg/kg)					
PARAMETRO (unidades)	PERRO 1	PERRO 2	PERRO 3	PERRO 4	PERRO 5
A ₀ (µg/ml)	1.32	2.28	6.24	2.17	4.97
B ₀ (µg/ml)	1.86	1.45	2.73	1.78	2.59
α (min ⁻¹)	0.1750	0.0479	0.4514	0.1074	0.4203
β (min ⁻¹)	0.0149	0.0119	0.0198	0.0149	0.0162
V _c (l/kg)	0.63	0.54	0.22	0.51	0.26
V _{dss} (l/kg)	0.93	0.78	0.61	0.84	0.67
AUC (µg/ml) min	132.51	169.09	151.40	139.67	172.09
Cl _p (l/kg) min ⁻¹	0.0151	0.0118	0.0132	0.0143	0.0116
t _{½ α} (min)	4.0	14.4	1.5	6.5	1.65
t _{½ β} (min)	46.5	58.1	34.9	46.4	42.9
K ₁₂ (min ⁻¹)	0.0573	0.0119	0.2608	0.0374	0.2379
K ₂₁ (min ⁻¹)	0.1086	0.0259	0.1512	0.0566	0.1546
K ₁₀ (min ⁻¹)	0.0240	0.0220	0.0592	0.0283	0.0439

TABLA 2.8. Valores individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para la dosis intravenosa de 4 mg/kg.

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE CIANAMIDA (DOSIS 4 mg/kg)					
PARAMETRO (unidades)	PERRO 1	PERRO 2	PERRO 3	PERRO 4	PERRO 5
Ao ($\mu\text{g/ml}$)	2.23	4.08	4.46	3.64	3.89
Bo ($\mu\text{g/ml}$)	2.12	5.23	2.74	0.99	5.66
α (min^{-1})	0.1347	0.2181	0.0727	0.0160	0.3653
β (min^{-1})	0.0111	0.0149	0.0106	0.0075	0.0142
Vc (l/kg)	0.92	0.43	0.56	0.86	0.42
Vd _{SS} (l/kg)	1.61	0.69	0.99	0.98	0.67
AUC ($\mu\text{g/ml min}$)	207.96	368.59	319.35	360.38	408.06
Clp (l/kg min^{-1})	0.0192	0.0108	0.0125	0.0111	0.0098
t $\frac{1}{2}$ α (min)	5.1	3.2	9.5	43.3	1.9
t $\frac{1}{2}$ β (min)	62.7	46.4	65.3	92.4	48.7
K ₁₂ (min^{-1})	0.0536	0.0788	0.0265	0.0013	0.1339
K ₂₁ (min^{-1})	0.0713	0.1290	0.0342	0.0093	0.2222
K ₁₀ (min^{-1})	0.0209	0.0253	0.0225	0.0129	0.0234

Los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos con sus correspondientes errores estándar estimados por grupo de dosis de cianamida (1, 2 y 4 mg/kg) son los que se indican en la TABLA 2.9.

La determinación de dichos valores se ha efectuado a partir del ajustado obtenido de acuerdo con el modelo bicompartimental.

TABLA 2.9. Valores medios \pm ES de los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de un ajustado según un modelo bicompartimental, para las dosis intravenosas de 1, 2 y 4 mg/kg de cianamida.

PARAMETRO (unidades)	VALORES MEDIOS \pm ES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE CIANAMIDA		
	DOSIS (mg/kg)		
	1	2	4
Ao ($\mu\text{g/ml}$)	1.76 \pm 0.63	3.40 \pm 0.94	3.66 \pm 0.38
Bo ($\mu\text{g/ml}$)	0.76 \pm 0.11	2.08 \pm 0.25	3.35 \pm 0.90
α (min^{-1})	0.2573 \pm 0.1322	0.2404 \pm 0.082	0.1614 \pm 0.061
β (min^{-1})	0.0178 \pm 0.0020	0.0156 \pm 0.0013	0.0117 \pm 0.0013
Vc (l/kg)	0.50 \pm 0.10	0.43 \pm 0.08	0.64 \pm 0.11
Vd _{SS} (l/kg)	0.92 \pm 0.06	0.77 \pm 0.06	0.99 \pm 0.17
AUC ($\mu\text{g/ml}$) min	52.89 \pm 2.43	152.96 \pm 7.82	332.87 \pm 34.26
Cl _p (l/kg) min^{-1}	0.0190 \pm 0.0008	0.0132 \pm 0.0007	0.0127 \pm 0.0017
t $\frac{1}{2}$ α (min)	6.5 \pm 2.6	5.61 \pm 2.39	12.6 \pm 7.8
t $\frac{1}{2}$ β (min)	40.7 \pm 4.1	45.77 \pm 3.73	63.1 \pm 8.2
K ₁₂ (min^{-1})	0.1436 \pm 0.0936	0.1211 \pm 0.05030	0.0588 \pm 0.0228
K ₂₁ (min^{-1})	0.0827 \pm 0.0269	0.0994 \pm 0.0255	0.0932 \pm 0.0380
K ₁₀ (min^{-1})	0.0487 \pm 0.0152	0.0355 \pm 0.0071	0.0210 \pm 0.0021

2.1.4. Estudio de la linealidad cinética

Con el fin de poder evidenciar la presencia o ausencia de un comportamiento farmacocinético no lineal para la cianamida, en las TABLAS 2.10 y 2.11 se exponen los resultados que permiten evaluar las magnitudes relativas de los parámetros que en ellas se presentan, para las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg, mediante los métodos compartimental, y no compartimental respectivamente.

Los diagramas de barras expuestos en las FIGURAS 2.16 y 2.17 permiten observar con mayor claridad los resultados proporcionados por los dos métodos anteriormente citados.

TABLA 2.10. Valores medios \pm ES de $t_{1/2}$, V_d , Cl_p y $AUC_{0-\infty}/D$, obtenidos después de un ajustado según un modelo bicompartimental para las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg.

PARAMETRO (unidades)	VALORES MEDIOS \pm ES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS COMPARTIMENTALES		
	DOSIS (mg/kg)		
	1	2	4
$t_{1/2}$ (min)	40.7 \pm 4.1	45.8 \pm 3.7	53.1 \pm 8.2 ^a
V_d (l/kg)	0.92 \pm 0.06	0.77 \pm 0.05	0.99 \pm 0.17
Cl_p (l/kg)min ⁻¹	0.0190 \pm 0.0008	0.0132 \pm 0.0007 ^a	0.0127 \pm 0.0017 ^a
$AUC_{0-\infty} / D$ (μ g/ml)min	52.89 \pm 2.43	76.48 \pm 3.91 ^b	83.21 \pm 8.56 ^b

* = p (0.05

a = prueba de Scheffé

b = prueba U de Mann-Whitney

TABLA 2.11. Valores medios \pm ES de $t_{1/2}$, Vd, Clp y $AUC_{0-\infty}/D$, obtenidos después del tratamiento por el método de los momentos estadísticos para las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg.

PARAMETRO (unidades)	VALORES MEDIOS \pm ES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS NO COMPARTIMENTALES		
	DOSIS (mg/kg)		
	1	2	4
$t_{1/2}$ (min)	37.8 \pm 3.3	46.9 \pm 1.1	60.6 \pm 4.4 ^{*a}
Vd (l/kg)	1.01 \pm 0.06	0.88 \pm 0.05	1.11 \pm 0.21
Clp (l/kg)min ⁻¹	0.0197 \pm 0.0008	0.0132 \pm 0.0006 ^{*a}	0.0125 \pm 0.0016 ^{*a}
$AUC_{0-\infty} / D$ (μ g/ml)min	53.47 \pm 2.51	78.04 \pm 3.64 ^{*b}	85.06 \pm 9.00 ^{*b}

* = p (0.05

a = prueba de Scheffé

b = prueba U de Mann-Whitney

ESTUDIO LINEALIDAD CINETICA

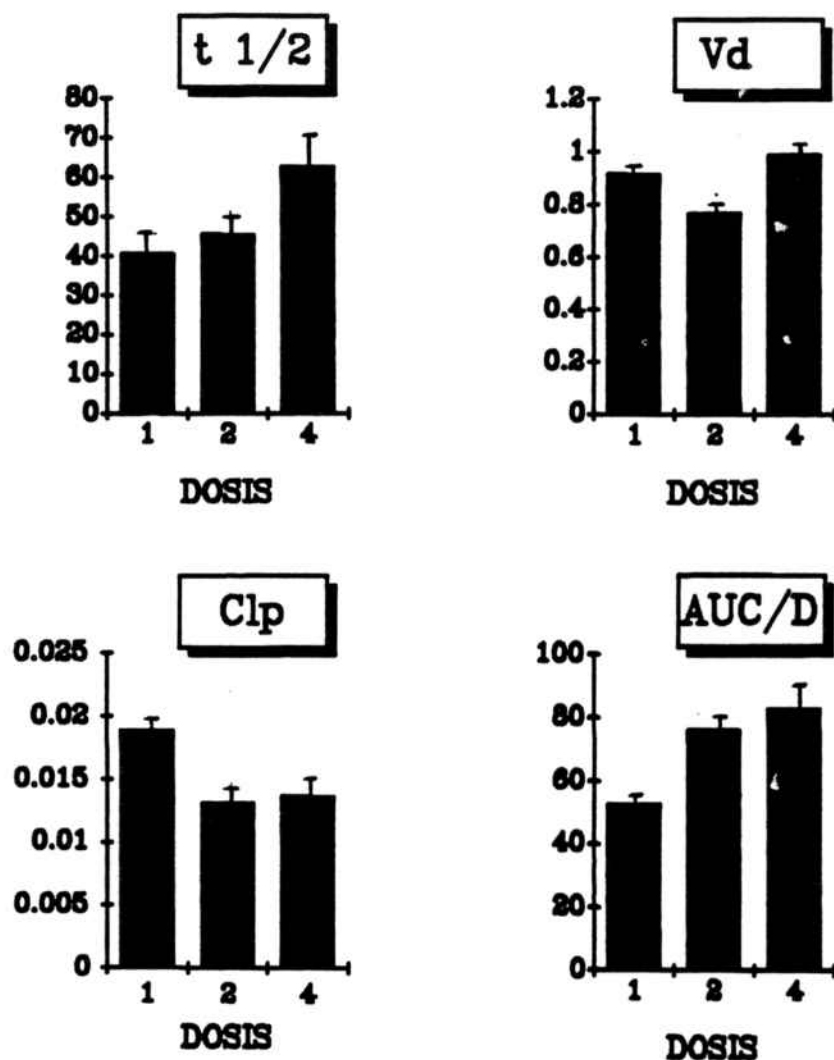


FIGURA 2.16. Diagrama de barras correspondiente a los valores medios + ES de los parámetros $t_{1/2}$, V_d , Cl_p y $AUC_{0-\infty} / D$, tras el ajustado de los datos experimentales según un modelo bicompartimental, para las dosis intravenosas de 1, 2 y 4 mg/kg de fármaco.

ESTUDIO LINEALIDAD CINETICA

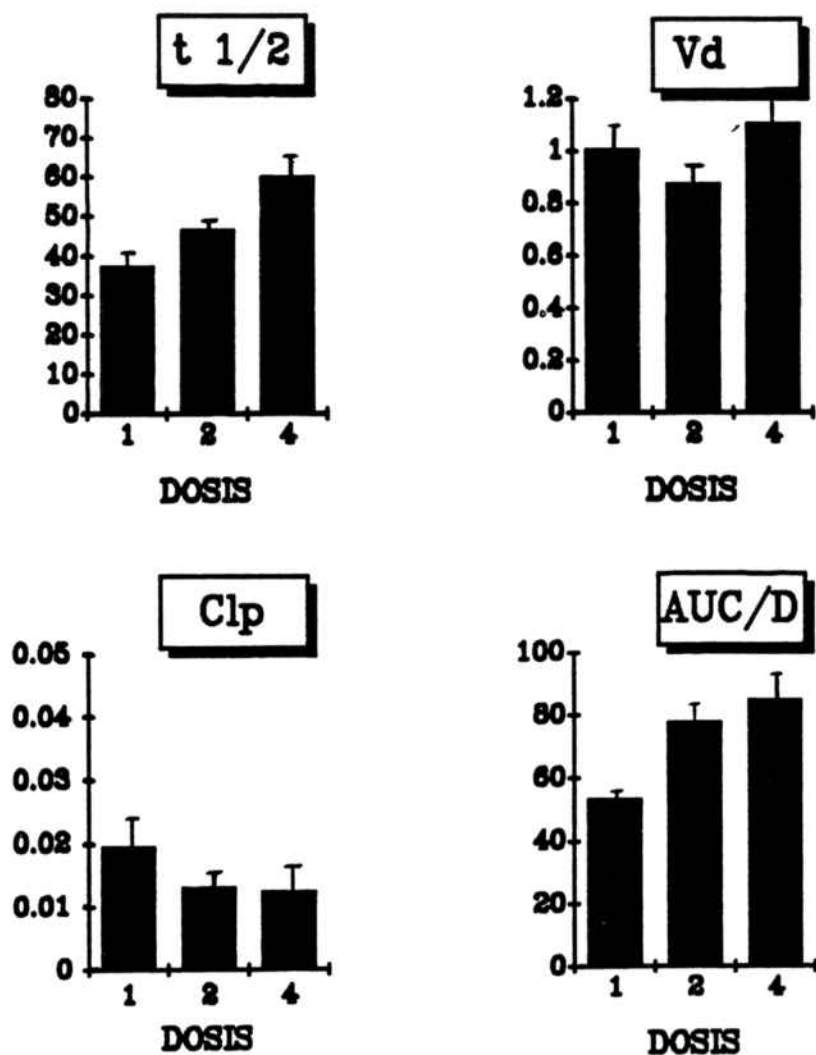


FIGURA 2.17. Diagrama de barras correspondiente a los parámetros $t_{1/2}$, V_d , Cl_p y $AUC_{0-\infty} / D$, obtenidos mediante el método de los momentos estadísticos, para las dosis intravenosas de 1, 2 y 4 mg/kg de fármaco.

2.2. Estudio farmacocinético tras la administración oral

2.2.1. Niveles plasmáticos de fármaco

Las cinéticas individuales seguidas después del tratamiento oral de 4 mg/kg de cianamida proveyeron los valores de concentraciones plasmáticas que se indican en la TABLA 2.12.

Las curvas obtenidas después del ajustado de los datos experimentales según una ecuación biexponencial, así como la curva de correlación entre las concentraciones experimentales y teóricas y la distribución de residuales se representan en las FIGURAS 2.18-2.22.

TABLA 2.12. Valores de concentración plasmática en función del tiempo obtenidos después de la administración oral de 4 mg/kg de cianamida.

PERRO Nº	CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE CIANAMIDA															
	DOSIS 4 mg/kg oral															
1	t (min)	1	3	5	7	9	12	15	30	45	60	90	120	180	240	366
	C (ng/ml)	159	549	1356	1389	1273	1397	1664	1203	1130	1097	905	592	319	132	44
2	t (min)	1	12	16	33	46	61	183	244	361						
	C (ng/ml)	9	989	1004	3262	1179	1021	762	312	59						
3	t (min)	1	3	5	7	9	12	15	33	45	60	92	120	180	245	
	C (ng/ml)	117	584	414	487	503	359	578	933	1177	1118	855	596	199	81	
4	t (min)	1	3	5	7	9	12	17	30	45	60	91	121	182	241	
	C (ng/ml)	61	281	2093	2621	2377	4089	2870	2575	1774	1348	971	646	259	151	
5	t (min)	3	5	7	9	12	15	30	47	59	96	129	181	253	372	
	C (ng/ml)	263	607	597	761	760	898	1039	1011	1300	1026	1380	495	281	81	

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 8

AJUSTADO: monocompartimental

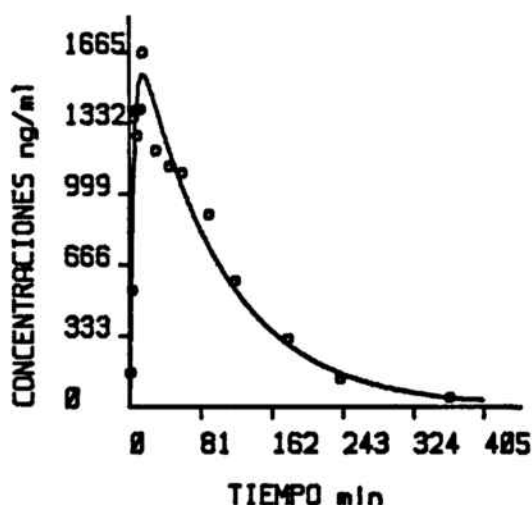
VIA: oral

MODELO ERROR: sef 1

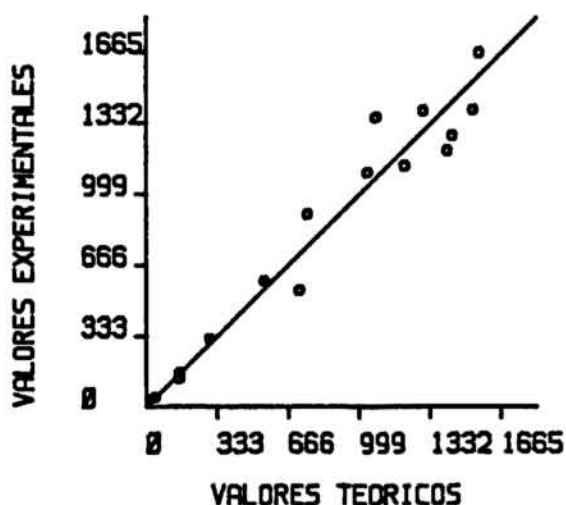
perro n.1

ESTUDIO FARMACOCINETICO

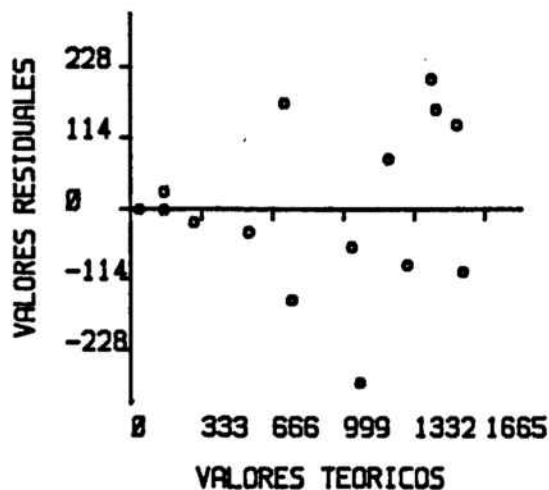
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

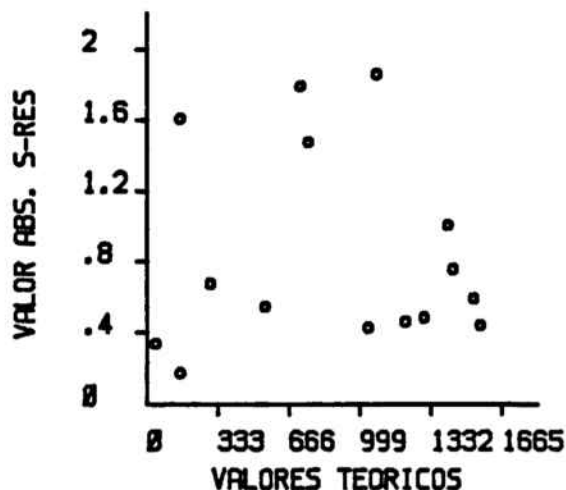


FIGURA 2.18. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre concentraciones experimentales y teóricas y distribución de residuales, tras la administración oral de 4 mg/kg de cianamida al perro no.1.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 8

AJUSTADO: monocompartimental

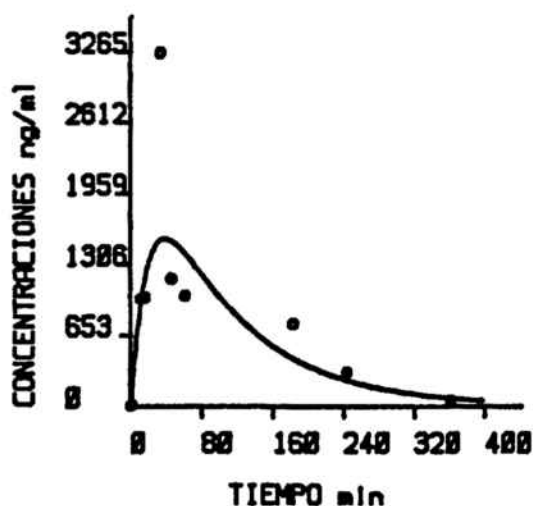
VIA: oral

MODELO ERROR: sef 1

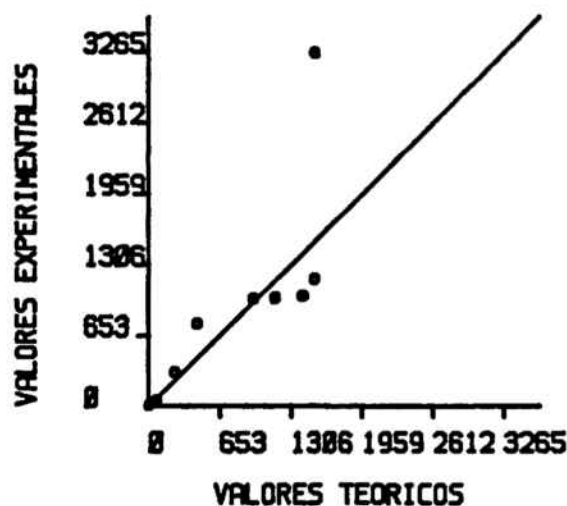
perro n.2

ESTUDIO FARMACOCINETICO

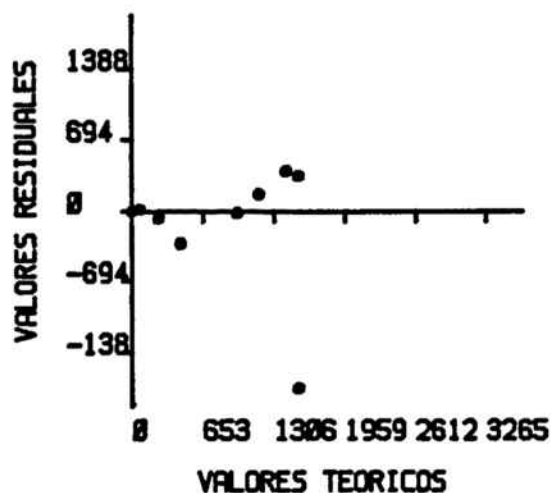
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

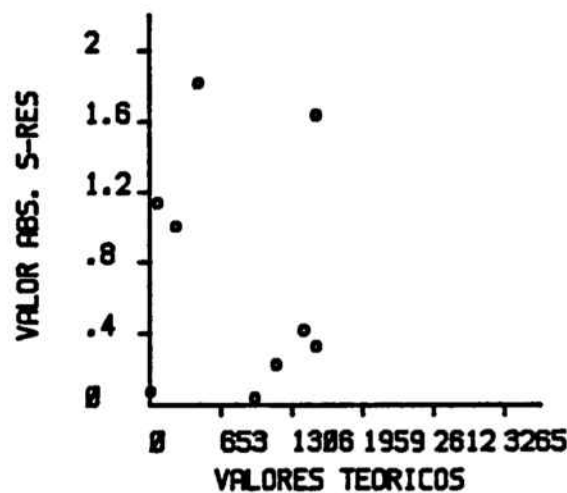


FIGURA 2.19. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre concentraciones experimentales y teóricas y distribución de residuales, tras la administración de 4 mg/kg de cianamida al perro no.2.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4mg/kg

MODELO FUNCION: fun 8

AJUSTADO: monocompartimental

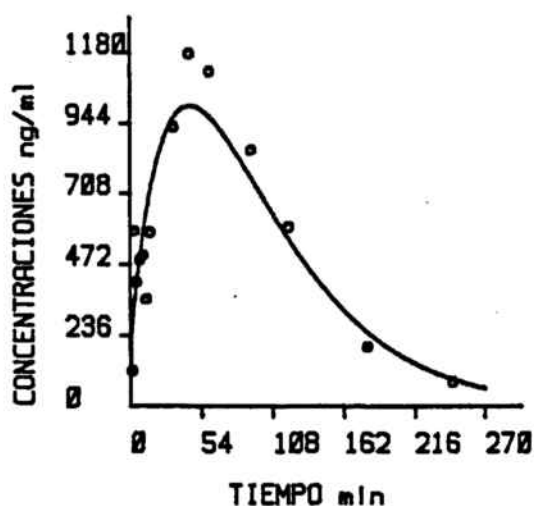
VIA: oral

MODELO ERROR: sef 1

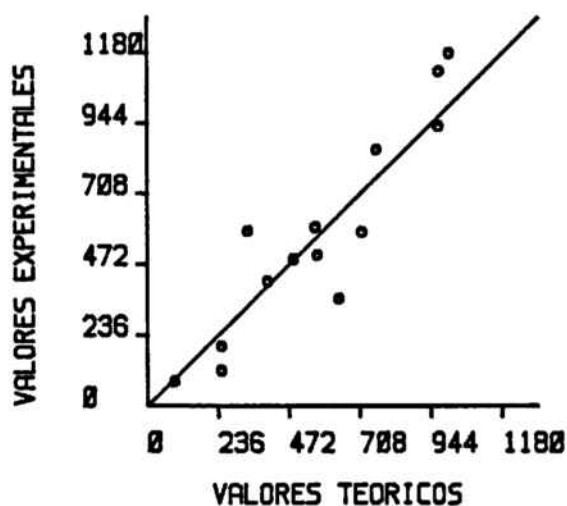
perro n.3

ESTUDIO FARMACOCINETICO

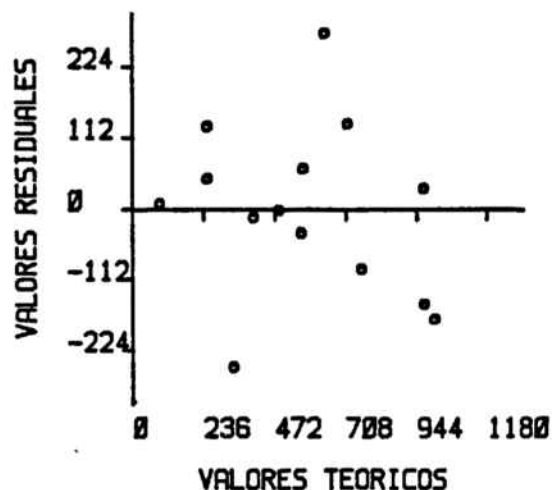
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

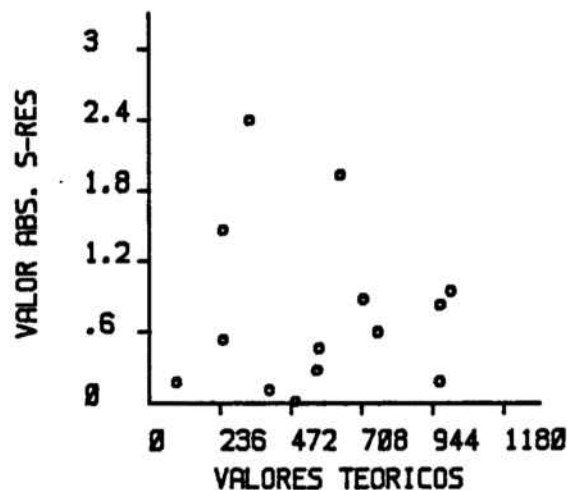


FIGURA 2.20. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre concentraciones experimentales y teóricas y distribución de residuales, tras la administración oral de 4 mg/kg de cianamida al perro no.3.

METODO EXTENDIDO DE MINIMOS CUADRADOS (AJUSTADO ELSMOS)

FARMACO: CIANAMIDA

DOSIS: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 8

AJUSTADO: monocompartimental

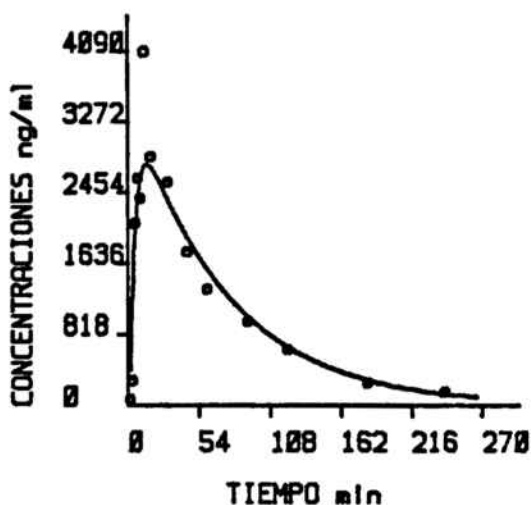
VIA: oral

MODELO ERROR: sef 1

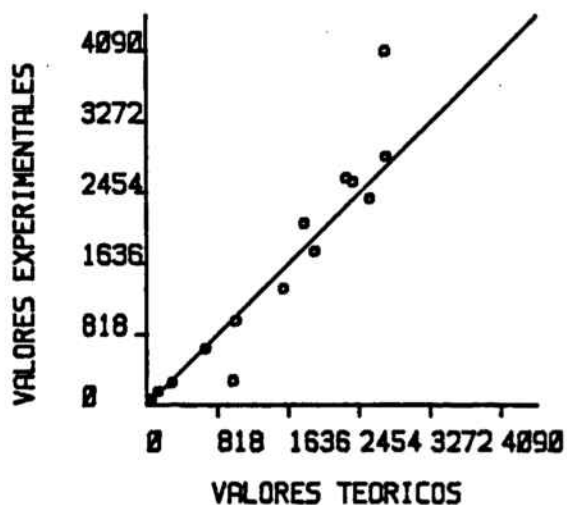
perro n.4

ESTUDIO FARMACOCINETICO

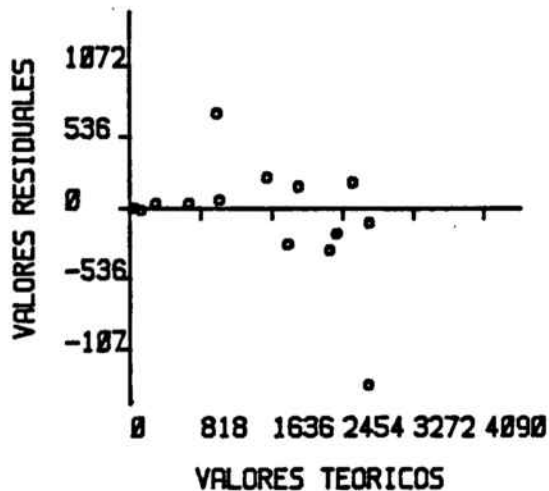
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

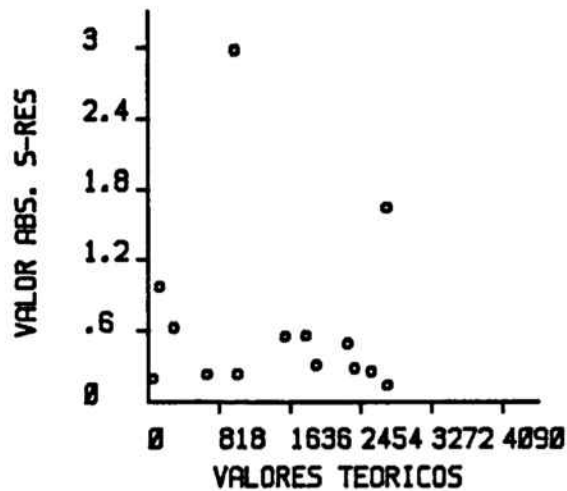


FIGURA 2.21. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre concentraciones experimentales y teóricas y distribución de residuales, tras la administración oral de 4 mg/kg de cianamida al perro no.4.

FARMACO: CIANAMIDA

DOSES: 4 mg/kg

MODELO FUNCION: fun 8

AJUSTADO: monocompartimental

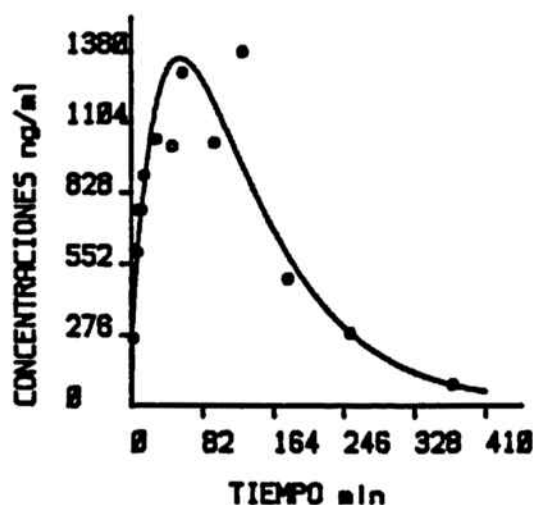
VIA: oral

MODELO ERROR: sef 1

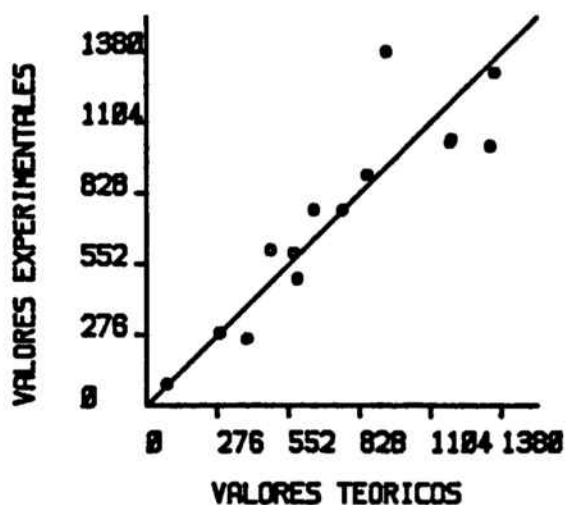
perro n.5

ESTUDIO FARMACOCINETICO

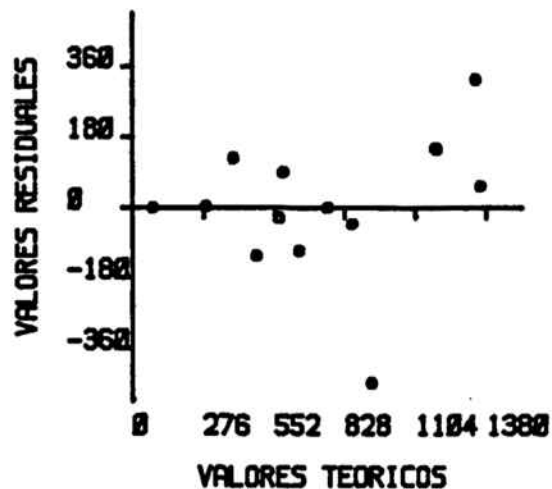
CURVA AJUSTADA



CURVA DE CORRELACION



DISTRIBUCION RESIDUALES



DISTRIBUCION S-RES ABSOLUTOS

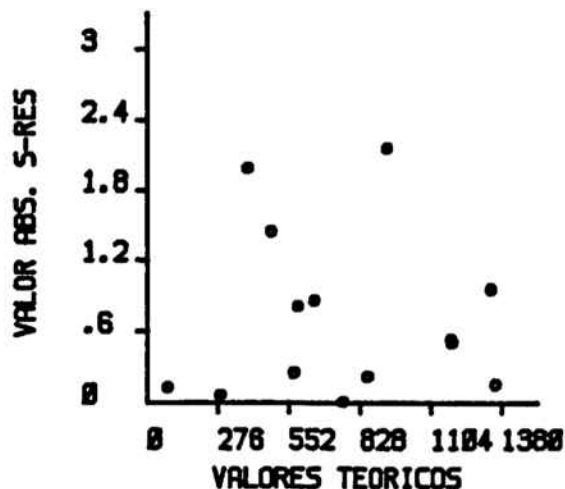


FIGURA 2.22. Representaciones gráficas del ajustado de la curva, correlaciones entre concentraciones experimentales y teóricas y distribución de residuales, tras la administración oral de 4 mg/kg de cianamida al perro no.5.

2.2.2. Elección del modelo farmacocinético óptimo

Siguiendo el criterio ya mencionado en el paragrafo 2.1.2, a partir de los valores promedios de los coeficientes de variación porcentual y de los AIC expuestos en las TABLAS 2.13 y 2.14 respectivamente, se puede afirmar que el comportamiento del fármaco administrado vía oral a la dosis de 4 mg/kg queda explicado con mayor probabilidad por la ecuación biexponencial (Ec.27), es decir el modelo monocompartimental.

Sin embargo, los ajustados obtenidos no han resultado lo suficientemente fiables y han obligado a un tratamiento no compartimental de los mismos.

TABLA 2.13. Valores de AIC correspondientes al ajustado de los datos experimentales obtenidos después de la administración oral de 4 mg/kg de fármaco según una ecuación biexponencial y triexponencial.

PERRO Nº	VALORES DE AIC		ELECCION
	BIEXPONENCIAL	TRIEXPONENCIAL	MODELO
1	91.20	93.21	Biexponencial
2	61.94	-	Biexponencial
3	92.03	94.84	Biexponencial
4	100.8	101.7	Biexponencial
5	91.05	-	Biexponencial

TABLA 2.14. Precisión de la estimación de todos los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración oral de 4 mg/kg de fármaco, expresada como coeficiente de variación porcentual promedio.

PERRO Nº	CV (%) PROMEDIO		ELECCION
	BIEXPONENCIAL	TRIEXPONENCIAL	MODELO
1	9.64	1863.9	Biexponencial
2	22.13	-	Biexponencial
3	215.04	2079.4	Biexponencial
4	17.33	29.85	Biexponencial
5	42.36	-	Biexponencial

2.2.3. Parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos individuales obtenidos tras la administración oral de 4 mg/kg de cianamida para los cinco perros ensayados se detallan en la TABLA 2.15.

La TABLA 2.16 resume los valores promedios de los parámetros farmacocinéticos determinados posteriormente a la administración oral de una dosis de 4 mg/kg de cianamida mediante los métodos de ajustado de la ecuación biexponencial a los datos experimentales y de los momentos estadísticos.

TABLA 2.15. Valores individuales de los parámetros farmacocinéticos tras la administración oral de 4 mg/kg.

VALORES INDIVIDUALES DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE CIANAMIDA (DOSIS 4 mg/kg)					
PARAMETRO (unidades)	PERRO 1	PERRO 2	PERRO 3	PERRO 4	PERRO 5
$t_{1/2}$ (min)	66.5	68.7	36.1	50.3	63.6
Cl_p / F (l/kg) min^{-1}	0.0228	0.0178	0.0297	0.0166	0.0166
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}$) min	175.23	224.83	134.56	241.45	240.67
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	1.75	2.28	18.12*	3.26	3.43
t_{max} (min)	15.1	38.0	49.5	13.0	60.6
MRT (min)*	100.16	113.95	91.84	78.38	133.0
VRT (min^2)*	8716.2	8577.6	4446.6	6379.7	10486.8
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/ml}$) min^*	181.08	258.43	139.83	243.25	243.83
Cl_p / F (l/kg) min^{-1} *	0.0221	0.0155	0.0286	0.0164	0.0164
$t_{1/2}$ (min)*	66.9	48.3	43.5	57.2	72.4
V_d / F (l/kg)*	2.13	1.08	1.79	1.36	1.71

* = parámetros farmacocinéticos no compartimentales

* = valor no considerado al efectuar el promedio

TABLA 2.16. Parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales correspondientes a una dosis oral de 4 mg/kg de cianamida.

PARAMETRO (unidades)	VALORES MEDIOS \pm ES	
	MODELO COMPARTIMENTAL	MODELO NO COMPARTIMENTAL
$t_{1/2}$ (min)	57.04 \pm 0.5	57.7 \pm 4.9
Vd/F (l/kg)	-	1.61 \pm 0.18
Clp / F (l/kg)min ⁻¹	0.0207 \pm 0.0025	0.0198 \pm 0.0025
AUC _{0-∞} (μ g/ml)min	203.35 \pm 21.01	213.28 \pm 22.70
MRT (min)	-	103.5 \pm 9.4
VRT (min ²)	-	7721.4 \pm 1046
C _{max} (μ g/ml)	2.68 \pm 0.40	2.30 \pm 0.58
T _{max} (min)	35.2 \pm 9.4	33 \pm 8.9

Cálculo de la biodisponibilidad

La biodisponibilidad del fármaco , después de su administración a una dosis oral de 4 mg/kg se ha estimado tal como se indica en el apartado 1.5.2.2 mediante la ecuación 33, a partir de los parámetros obtenidos después del ajustado correspondiente, y por el método de los momentos estadísticos. Los resultados obtenidos expresados como valor medio \pm ES han sido de 62.68 \pm 6.79 % y 64.20 \pm 6.78, respectivamente.

Cabe destacar que en nuestro caso, se administró la misma dosis por vía intravenosa que oral, como consecuencia no fue preciso normalizar los valores de las áreas bajo las curvas por la dosis.

CAPITULO 3

DISCUSION

3.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

3.1.1. Administración intravenosa

En general, el modelo farmacocinético que mejor ha satisfecho los niveles plasmáticos de cianamida obtenidos tras su administración intravenosa al perro a tres niveles de dosis: 1, 2 y 4 mg/kg, ha sido el modelo abierto de dos compartimientos. En efecto, nos decantamos por el modelo bicompartimental después de aplicar el ensayo de MAICE para un nivel de probabilidad de 0.05 y comprobar que tras la utilización de este modelo los parámetros más representativos del mismo se estimaban con mayor precisión, es decir presentaban un coeficiente de variación porcentual notablemente inferior, que los obtenidos con el modelo tricompartmental.

A la luz de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración intravenosa de 1 mg/kg al perro beagle se pone de manifiesto que la cianamida presenta una semivida biológica fugaz, de unos 40 minutos, al tiempo que el equilibrio de distribución se alcanza rápidamente, sobre los 30 minutos. El volumen de distribución en condiciones de estado de equilibrio estacionario es del orden de un litro por kilogramo de peso, lo que supone en principio una amplia distribución de la cianamida por todo el organismo. El aclaramiento plasmático es elevado, del orden de $0.02 \text{ (l/kg)min}^{-1}$ y, a juzgar por los valores de las microconstantes obtenidos, el retorno del fármaco del compartimiento periférico al central no es el factor limitativo del proceso de eliminación del mismo, puesto que la constante de eliminación K_{10} es la microconstante menor.

La dosis de 2 mg/kg por vía intravenosa permite realizar un comentario idéntico en cuanto al comportamiento farmacocinético de la cianamida. Cabe resaltar, sin embargo, que tras

la administración de esta dosis el aclaramiento plasmático es significativamente inferior ($p < 0.05$) del orden de $0.013 \text{ (l/kg)min}^{-1}$ y por su parte el area bajo la curva de nivel plasmático ha aumentado más que proporcionalmente respecto a la obtenida tras la administración de la dosis de 1 mg/kg .

La administración intravenosa de cianamida a la dosis de 4 mg/kg permite obtener unos parámetros farmacocinéticos que muestran una tendencia similar en el comportamiento farmacocinético de dicho fármaco. La semivida biológica obtenida tras la administración de esta dosis ha sido superior a la obtenida con las dos dosis anteriores, del orden de los 63 minutos pero el aclaramiento plasmático es del mismo orden que el obtenido tras la dosis de 2 mg/kg , de unos $0.013 \text{ (l/kg)min}^{-1}$.

Todos estos datos nos inducen a pensar que la cianamida presenta en el perro, para el ámbito de dosis administradas (de 1 a 4 mg/kg), un comportamiento farmacocinético dosis-dependiente. Para comprobar este extremo se han sometido a comparación estadística los siguientes parámetros farmacocinéticos: el aclaramiento plasmático total (Cl_p), la semivida biológica de eliminación ($t_{1/2}$), el volumen de distribución (V_d) y el area bajo la curva de niveles plasmáticos normalizada por la dosis administrada ($AUC_{0-\infty} / D$), parámetros que se asumen constantes e independientes de la dosis administrada cuando el comportamiento farmacocinético del fármaco es lineal. La comparación de dichos parámetros mediante un ANOVA ha puesto de manifiesto los siguientes puntos:

a) El aclaramiento plasmático se modifica con las dosis administradas ($p = 0.003$), presentando una cierta tendencia a disminuir con la dosis.

b) La semivida biológica también se modifica con las

dosis administradas ($p = 0.041$), tendiendo, por el contrario, a aumentar con la dosis.

c) El volumen de distribución V_d prácticamente permanece constante dentro del ámbito de dosis administradas ($p = 0.365$).

d) El área bajo la curva de niveles plasmáticos normalizada por las dosis ($AUC_{0-\infty} / D$) varía con ellas ($p = 0.006$), tendiendo a incrementarse al aumentar éstas.

Todos estos puntos constituyen, a nuestro entender, una evidencia experimental del comportamiento farmacocinético dosis-dependiente de la cianamida.

Por otro lado, cabe destacar que la eliminación de la cianamida en el perro es muy rápida, presentando una semivida biológica en esta especie animal entre los 45 y 60 minutos.

Esta semivida biológica tan fugaz de la cianamida en el perro resulta ligeramente superior a la estimada en la rata, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg (20 minutos) (1) y del mismo orden que la obtenida tras la administración de 35 mg/kg (56.6 minutos) (2). Creemos que no resultan relevantes las diferencias, en cuanto al comportamiento farmacocinético de la cianamida, entre ambas especies animales (rata y perro).

La fugaz semivida biológica de la cianamida se puede atribuir a la rápida metabolización de la misma. En efecto, Shirota y col. (3) demostraron, tras la administración de cianamida a la rata, conejo, perro y hombre, la pronta aparición en orina de la N-acetilcianamida, el principal metabolito inactivo de la cianamida. Cabe destacar, por último, que la fugaz semivida biológica en las especies estudiadas:

rata (1,2,4), conejo (5) y perro (presente Memoria) no coincide con la actividad farmacológica de la cianamida, mucho mas prolongada. No existe, pues, un paralelismo entre el efecto farmacológico y los niveles plasmáticos de cianamida. Este hecho soportaría la idea expuesta por otros autores (6-8) de que la actividad farmacológica "in vivo" de la cianamida depende de un metabolito activo de naturaleza desconocida. Por otro lado, recientemente Shirota y col. (9) han propuesto las pautas racionales para el diseño de profármacos de cianamida con la finalidad de disponer de una mayor duración de la actividad farmacológica. Kwon (10) y Nagasawa (11) han demostrado que los acil derivados y los peptidil derivados poseen una actividad farmacológica que se detecta incluso a las 72 horas de su administración.

No hemos hallado ningún antecedente bibliográfico acerca de la disposición de la cianamida en el perro. Tampoco hemos hallado ninguna referencia acerca de su posible comportamiento farmacocinético dosis-dependiente en el ámbito de las dosis administradas, algunas de ellas utilizadas en terapéutica. Obach y col (5) pusieron de manifiesto, en el conejo, que la cianamida presentaba un comportamiento farmacocinético dosis-dependiente, pero, cabe señalar que dicho estudio se realizó tras la administración de dosis 40 veces superiores a las del estudio de la presente Memoria.

El hecho de que se observen diferencias significativas tras la administración intravenosa de 1, 2 y 4 mg/kg en los valores de las semividas biológicas y del aclaramiento plasmático y no se detecten en cambio estas diferencias en los valores del volumen de distribución nos induce a pensar que dichas diferencias se producen sólo a nivel de la eliminación del fármaco.

Shirota y col (3) demostraron que tras la administración

de ^{14}C -cianamida a la dosis de 0.04 mmol/kg (1.68 mg/kg) se recuperaba en orina entre el 80 y 99 % de la dosis administrada. Unicamente el 11 % de la excretada se recuperaba en orina como cianamida inalterada mientras que el 87 % era N-acetil cianamida. Así pues el mecanismo de eliminación mayoritario de la cianamida es el metabólico. Por su parte, los mismos autores demostraron que el perro posee una actividad acetiltransferasa hepática inferior a la de otras especies animales y, por consiguiente, con una mayor posibilidad de saturación. El comportamiento dosis-dependiente observado por nosotros a las dosis ensayadas podría atribuirse a una probable saturación del proceso de acetilación.

3.1.2. Administración oral

La administración oral de 4 mg/kg de cianamida al perro beagle provee unos niveles plasmáticos que no se han podido tratar adecuadamente con las ecuaciones biexponenciales o triexponenciales clásicas (r entre 0.9278 y 0.9882) por lo que hemos decidido utilizar un tratamiento farmacocinético no compartimental de estos datos experimentales.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto que la cianamida presenta una rápida absorción oral a juzgar por los valores de C_{max} ($2.3 \pm 0.58 \mu\text{g/ml}$) que se alcanzan ya a los 33 ± 8.9 minutos (T_{max}). La biodisponibilidad en velocidad de la cianamida se ha estimado a partir de los valores de T_{max} y C_{max} experimentales.

En puridad es difícil estimar la biodisponibilidad en magnitud de este fármaco que como ya se ha comentado anteriormente presenta una cinética dosis dependiente probablemente a causa de que el aclaramiento plasmático disminuye al pasar de una dosis de 1 a una de 4 mg/kg. No obstante creemos que puede utilizarse la expresión clásica $F = \text{AUC}_{\text{ev}}/\text{AUV}_{\text{iv}}$ para el cál-

culo de la biodisponibilidad absoluta por los siguientes motivos:

a) Las administraciones oral e intravenosa se realizaron a las mismas dosis.

b) En el ámbito de dosis utilizado por vía intravenosa no se han podido observar diferencias en el volumen de distribución (Vd).

c) Por último, la semivida biológica obtenida tras la administración intravenosa de 4 mg/kg no difiere significativamente de la obtenida por vía oral.

No parece aventurado pensar, pues, que el aclaramiento plasmático de la cianamida permanece constante tras las administraciones oral e intravenosa, a la dosis de 4 mg/kg. Así pues podemos aproximar el valor de la biodisponibilidad absoluta de la cianamida por vía oral en el perro en un 62.6 %.

La biodisponibilidad en velocidad de la cianamida en el perro, estimada de los valores de Cmax y de Tmax es del mismo orden que la obtenida en la rata (1,2,4) y en el conejo (5), incluso, teniendo en cuenta las acusadas diferencias en las dosis administradas. La absorción de la cianamida es rápida y no es de extrañar, a juzgar por la estructura y el escaso peso molecular de dicho compuesto, que la difusión de la cianamida a través de la membrana absorbente y a través de los poros acuosos de la misma puedan ser ambas relevantes para esta molécula (12).

La biodisponibilidad en magnitud estimada del orden del 63 % es sensiblemente inferior a la obtenida en la rata (2) y que la que se puede deducir de los estudios de Shirota y col. (3) en el perro. Dichos autores pudieron recuperar en

orina alrededor del 86 % de la radiactividad administrada, siendo las pérdidas por heces insignificantes, del orden del 0.03 % . A la luz de los resultados obtenidos por nosotros, no puede descartarse la posibilidad de que la cianamida no se halle sometida a un efecto de primer paso en el perro.

Del trabajo efectuado en la presente Memoria, pueden extraerse las conclusiones que a continuación se exponen.

3.2. CONCLUSIONES

1.- Tras la administración intravenosa, la disposición de la cianamida en el perro puede explicarse satisfactoriamente de acuerdo con un modelo abierto de dos compartimientos. La elección del modelo se justifica tras la aplicación del ensayo de MAICE y tras la comparación de la precisión (CV %) con la que se estiman los parámetros mas representativos.

2.- En el ámbito de las dosis administradas (de 1 a 4 mg/kg), la semivida biológica de eliminación obtenida para la cianamida, entre 40 y 63 minutos, puede considerarse fugaz contrastando con la prolongada duración de su actividad farmacológica; ello que apoyaría la idea de que la cianamida precisa biotransformarse a un metabolito activo.

3.- La comparación de los valores de la semivida biológica, aclaramiento plasmático y área bajo la curva de niveles plasmáticos normalizada por las dosis administradas ha puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas de estos parámetros para el ámbito de dosis ensayadas. Este hecho permite concluir que la cianamida presenta un cierto comportamiento farmacocinético dosis-dependiente.

4.- El hecho de que no se hayan observado para las tres dosis ensayadas diferencias estadísticamente significativas en el

valor del volumen de distribución y sí, en cambio, se haya observado una disminución del aclaramiento plasmático cuando se incrementan las dosis, apunta a que la farmacocinética dosis-dependiente del fármaco está relacionada con su proceso de eliminación.

5.- El tratamiento no compartimental de los datos experimentales llega a idénticas conclusiones que el tratamiento de los mismos de acuerdo con el modelo bicompartimental abierto, lo cual de hecho uno y otro tratamiento reafirman la no-linealidad farmacocinética de la cianamida.

6.- El proceso de absorción de la cianamida es rápido, los valores de C_{max} se alcanzan a los treinta minutos, hecho ya observado en otras especies animales. La biodisponibilidad absoluta obtenida en el perro es del orden del 63 %, inferior a los datos obtenidos en otras especies animales, si bien, estimada por métodos inespecíficos. No puede descartarse por tanto que el fármaco no sufra un efecto de primer paso.

BIBLIOGRAFIA CAPITULO 3

1. Obach R, Prufionosa J, Menargues A, Nomen M, Vallés J m, Peraire C. Farmacocinética de la cianamida en la rata y estudio preliminar en el hombre. Revista de Farmacología clínica y experimental 1986: 3, 186.
2. Obach R, Valentí C, Vallés J, Vallés J M, Domenech J. Bioavaibility of cyanamide in fasted and unfasted rats. Biopharmaceutics & Drug Disposition 1986: 7, 273-280.
3. Shirota F N, Nagasawa H T, Kwon C H, DeMaster E G. N-acetylcyanamide, the major urinary metabolite of cyanamide in rat, rabbit, dog and man. Drug Metabolism Disposition 1984: 12 (3), 337-344.
4. Loomis C W, Brien J F. Inhibition of hepatic aldehyde dehydrogenase in the rat by calcium carbimide (calcium cyanamide). Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1983: 61 (9), 1025-1034.
5. Obach R, Moreno J, Domenech J, Pla-Delfina J M. Etude pharmacocinetique de la cyanamide chez le lapin. Actas 1er Congreso Europeo de Biofarmacia y Farmacocinética. Clermont Ferrand 1981: 2, 367-375.
6. Deitrich R A, Troxell P A, Worth W S, Erwin G V. Inhibition of aldehyde dehydrogenase in brain and liver by cyanamide. Biochemical Pharmacology 1976: 25, 2733-2737.
7. DeMaster E G, Nagasawa H T, Shirota F N. Metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase in vitro. Pharmacology Biochemistry & Behavior 1983: 18 (1), 273-277.

8. DeMaster E G, Shirota F N, Nagasawa H T. The metabolic activation of cyanamide an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalysed by catalase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984: 122 (1), 358-365.
9. Shirota F N, Nagasawa H T, Kwon C H, DeMaster E G. Rationale for the design of prodrug forms of cyanamide as alcohol deterrent agents. *The Pharmacologist* 1985: 27 (3), 283.
10. Kwon C H, Nagasawa E G, DeMaster E G, Shirota F N. acyl, N-protected α -aminoacyl, and peptidyl derivatives as prodrug forms of the alcohol deterrent agent, cyanamide. *The Pharmacologist* 1985: 27 (3), 283.
11. Nagasawa H T, Kwon C H, DeMaster E G, Shirota F n. Prodrugs of cyanamide as (long-acting) alcohol deterrent agents. *Biochemical Pharmacology* 1986: 35 (2), 129-132.
12. Plá-Delfina J M, Moreno J. Intestinal absorption-partition relationships: A tentative functional nonlinear model. *Journal of Pharmacokinetics & Biopharmaceutics* 1981: 9, 191-215.