



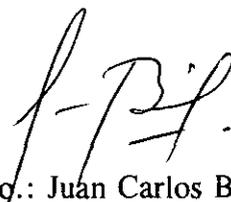
J. de Boggio

CATEDRA DE FARMACOLOGIA
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**ESTUDIO CRONOFARCOCINETICO
DEL ACETATO DE CIPROTERONA
EN EL CONEJO**

Juan Carlos Boggio
Madrid, 1993.

TRABAJO QUE PRESENTA EL LICENCIADO D.
JUAN CARLOS BOGGIO PARA ASPIRAR AL GRADO
DE DOCTOR



Fdo.: Juan Carlos Boggio

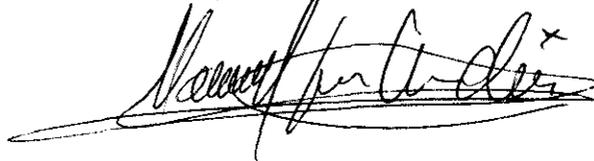
Madrid, Noviembre 1993.

D. MANUEL I. SAN ANDRES LARREA, Profesor Titular de Universidad de Farmacología y Terapéutica Veterinarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que la memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Juan Carlos Boggio con el título "*Estudio cronofarmacocinético del acetato de ciproterona en el conejo*" ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Cátedra de Farmacología.

Madrid, Noviembre de 1993.



Fdo: M.I. San Andrés Larrea.



A mis padres
A M^a Angustias

A mi abuelo, Jose M^a,
in memoriam

Si tuviera que nombrar a todas las personas que de alguna forma me ayudaron a realizar este trabajo creo que podría escribir un libro. No obstante, en este apartado quiero agradecer a todos los que me prestaron su apoyo, tanto moral como material. El orden que ocupan en estas páginas, no es un orden de importancia, pues todos merecen ser citados en primer lugar.

Quiero agradecer de una forma muy especial a mi director de Tesis el Prof. Dr. D. Manuel San Andrés Larrea, por su dirección, sus constantes estímulos y su comprensión.

Al Prof. Dr. D. Emilio Ballesteros Moreno, Catedrático de Farmacología y Terapéutica Veterinaria, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis en su grupo de trabajo.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Litoral, a la cual pertenezco, que me permitió realizar mis estudios de post-grado en la Universidad Complutense de Madrid.

Al Prof. Dr. D. Eduardo Costas Costas, Profesor Titular de Genética, por sus consejos y valiosas aportaciones.

A Shering España, S.A., por la aportación del fármaco y de diverso material bibliográfico.

Al Prof. Dr. D. Tomás Pérez García y al Prof. Dr. D. Juan Carlos Fontanillas Pérez, por facilitarme el trabajo en sus laboratorios.

A la Prof. Dra. Dña. Margarita Arboix, Catedrática de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Barcelona, por facilitarme el soporte informático, y a Carmen Franquelo, por su paciencia.

A Teresita, por su colaboración y apoyo permanente en lo científico y en lo personal, sin lo que no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A Casilda, por todos sus consejos, en cromatografía, cinética y estadística, y cómo no, por todo el diseño gráfico.

A Mariló, por su ayuda, y porque siempre pude contar con ella para lo que sea.

A Mara, Emma y Chema por su disposición permanente.

A Mariano por todo el trabajo manual, pero también por su constante aliento y estímulo, y por supuesto, los cepos DIAZ-FLORES®.

A Jose, por su ayuda inestimable en la construcción de las jaulas cronobiológicas y en el cuidado de los animales.

A todos los demás integrantes de la Cátedra de Farmacología. A D. Rafael, Rafa, Javier, Julio, Fernando, Carlitos, José Manuel, Mariangeles y Juanito.

Al Prof. Dr. D. Marcelo Rubio, a Eduardo Baroni, Enrique Formentini, Héctor Fernández y M^a Victoria Romero, miembros de la Cátedra de Farmacología de la F.A.V.E., sin ellos y sin su trabajo no hubiera podido realizar mi doctorado.

A todos los miembros del Departamento de Patología Animal II que me apoyaron. En especial, a Concepción García Botey, Paloma García, Mercedes Sánchez de la Muela y a Floren.

A Raúl, Antonio y M^a Angeles, con quienes empecé mi andadura científica en España, por su amistad.

A M^a Angustias, por su apoyo, su paciencia, su aguante, y sacrificios para que esta Tesis salga adelante.

A mis padres, que con su prédica y ejemplo, me enseñaron que todo sacrificio tiene su recompensa y que lo importante no es la meta sino el esfuerzo por llegar a ella.

A mi familia, a mis amigos argentinos y españoles, y en especial a los miembros de la Sociedad de Misiones Africanas que, aunque lejos de mi país, hicieron que me sintiera cerca.

A todos, muchas gracias.

INDICE

I.- JUSTIFICACION	1
II.- REVISION BILIOGRAFICA	4
II.1.- CRONOFARMACOLOGIA	5
II.1.1.- INTRODUCCION	5
II.1.2.- TIPOS DE RITMOS BIOLOGICOS	6
II.1.3.- PARAMETROS DEL RITMO	8
II.1.4.- RITMOS CIRCADIANOS	12
II.1.5.- SINCRONIZADORES DE LOS RITMOS	14
II.1.6.- ASPECTOS FARMACOLOGICOS	18
II.1.6.1.- Cronofarmacocinética	20
II.1.6.2.- Cronotoxicología	29
II.1.6.3.- Cronoterapéutica	31
II.2.- ANDROGENOS	33
II.2.1.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS	33
II.2.1.1.- La hipófisis y el hipotálamo	33
II.2.1.2.- Producción androgénica testicular	41
II.2.1.3.- Producción androgénica adrenal	44
II.2.2.- ANDROGENOS Y CANCER DE PROSTATA	47
II.2.2.1.- Terapias hormonales específicas	50
II.3.- ACETATO DE CIPROTERONA	59
II.3.1.- FARMACOLOGIA	59
II.3.1.1.- Introducción	59
II.3.1.2.- Estructura química	60
II.3.1.3.- Mecanismo de acción	62
II.3.1.4.- Farmacocinética	65
II.3.1.5.- Propiedades farmacológicas	66

II.3.2.- USOS CLINICOS DEL ACETATO DE	
CIPROTERONA	71
II.3.2.1.- Problemas de próstata	71
II.3.2.2.- Alteraciones cutáneas inducidas por	
andrógenos	76
II.3.2.3.- Pubertad precoz	80
II.3.2.4.- Desórdenes sexuales en machos	82
III.- MATERIAL Y METODOS	83
III.1.- ESTUDIO CRONOTOXICOLOGICO	84
III.1.1.- MATERIAL	84
III.1.2.- METODO	86
III.2.- ESTUDIO CRONOFARMACOCINETICO	90
III.2.1.- MATERIAL	90
III.2.2.- METODO	93
III.2.2.1.- Administración del fármaco y recogida	
de muestras	94
III.2.2.2.- Análisis de las muestras	96
III.2.2.3.- Tratamiento cronofarmacocinético	100
III.2.2.4.- Tratamiento estadístico	101
IV.- RESULTADOS	102
IV.1.- ESTUDIO CRONOTOXICOLOGICO	103
IV.1.1.- CALCULO DE LA DL ₅₀	103
IV.1.2.- ESTUDIO CRONOBIOLOGICO	103
IV.2.- ESTUDIO CRONOFARMACOCINETICO	106
IV.2.1.- METODO ANALITICO	106
IV.2.2.- CRONOFARMACOCINETICA	117
V.- DISCUSION	150
V.1.- ESTUDIO CRONOTOXICOLOGICO	151
V.2.- ESTUDIO CRONOFARMACOCINETICO	154

V.2.1.- METODO	154
V.2.2.- ACONDICIONAMIENTO DE LOS ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS	157
V.2.3.- INFLUENCIA DEL TIEMPO SOBRE LOS PROCESOS FARMACOCINETICOS	160
V.2.4.- FARMACOCINETICA	162
V.2.5.- ELECCION DE PARAMETROS	163
V.2.6.- ESTUDIO INDIVIDUALIZADO DE LOS PARAMETROS	165
V.2.7.- ESTUDIO GLOBAL DE LOS PROCESOS CINETICOS	173
VI.- CONCLUSIONES	175
VII.- RESUMEN	178
VIII.- BIBLIOGRAFIA	183

I.- JUSTIFICACION

I.- JUSTIFICACION

Desde hace años se conoce la relación que existe entre el desarrollo de ciertos tumores malignos y algunos niveles hormonales de ese organismo, puesto que dependen de los mismos para crecer y mantener su identidad morfológica.

Esta relación es más evidente en los tumores que asientan sobre tejidos relacionados con los órganos reproductores, pues las modificaciones en los niveles de hormonas pueden alterar el curso del proceso e incluso detenerlo.

Concretamente, en el tratamiento de tumores prostáticos mediante el control de andrógenos, se han obtenido unos resultados esperanzadores. Basado en ésto, y en vista de que la prostatectomía suele requerir a continuación una orquiectomía, es por lo que la terapia con antiandrógenos ha cobrado una gran importancia, unas veces como alternativa y otras como tratamiento coadyuvante a los métodos quirúrgicos.

Dentro de los compuestos antiandrogénicos destaca el Acetato de Ciproterona, que, en los tejidos andrógeno-dependientes compite con la testosterona y la dihidrotestosterona por su receptor. Además de esta propiedad posee actividad progestacional y suprime la secreción de gonadotropinas.

También sabemos las grandes variaciones de secreción que hay en un organismo, tanto estacionales como diarias, especialmente, en los niveles hormonales. La Cronobiología estudia estas variaciones en los seres vivos. Una de las consecuencias de estas actividades rítmicas es la de la susceptibilidad y respuesta de los organismos a medicamentos, agentes químicos e incluso físicos. Una importante rama de la Cronobiología la constituye la Cronofarmacología, que incluye a la Cronofarmacocinética y a la Cronoterapia.

Por todo ello, pretendemos profundizar en el conocimiento de la farmacocinética del Acetato de Ciproterona desde un punto de vista cronobiológico, para así poder aplicar unas pautas cronoterapéuticas que permitan adaptar la dosis a los niveles fisiológicos de cada organismo sin perder eficacia y reducir al máximo los efectos secundarios y colaterales.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

II.1.- CRONOFARMACOLOGIA

II.1.1.- INTRODUCCION

Las múltiples actividades biológicas de los seres vivos, incluidas las del hombre, no se manifiestan de manera constante. Por el contrario varían de forma periódica, regular y predecible. Actualmente se admite que la ritmicidad es una propiedad fundamental de todos los organismos, desde los unicelulares hasta los pluricelulares más complejos, y en estos últimos, a todos los niveles de organización: desde el subcelular hasta el sistema orgánico en su totalidad (HALBERG, 1969; REINBERG, 1979)

La CRONOBIOLOGIA estudia estas variaciones en los seres vivos, y una de las consecuencias de estas actividades rítmicas es la susceptibilidad y el tipo de respuesta de los organismos a medicamentos, agentes químicos e incluso físicos; por ello, una importante rama de la cronobiología la constituye la CRONOFARMACOLOGIA y la CRONOTOXICOLOGIA (REINBERG y HALBERG, 1971; HALBERG y HALBERG, 1984; REINBERG, 1979 y 1992).

II.1.2.- TIPOS DE RITMOS BIOLÓGICOS

Los ritmos biológicos son de origen genético (HARDIN y col., 1990; YOUNG, 1992), no presentan solución de continuidad, son característicos de cada especie animal, aunque pueden observarse acusadas variaciones interindividuales, y están influidos o condicionados por factores externos ambientales, o por hábitos de vida, denominados sincronizadores (STEIMBACH y col., 1976; REINBERG, 1979).

Según la evolución temporal del sincronizador, se tendrán ciclos de duración diferente. Los más estudiados son los ciclos que se repiten cada 24 horas, denominados ciclos circadianos. El tiempo que media entre dos repeticiones de un ritmo biológico se denomina período, y en el hombre viene definido por los ciclos de vigilia-sueño o actividad-reposo. Los animales de experimentación se regulan por los períodos luz-oscuridad, que deben ser correctamente respetados en la ejecución de los ensayos.

Se han tomado como prototipo los ritmos circadianos, en los que el período equivale al tiempo que tarda la tierra en una rotación completa, sin embargo, hay ritmos de alta frecuencia o ultradianos, en los que el período es más corto. Incluyen entre otros a los circaoctohoranos (8 horas) y a los circasemidianos (12 horas), y ritmos de baja frecuencia o infradianos, entre los cuales tenemos los circaseptanos

(7 días), circatrigintanos (30 días), circaanuales (1 año), etc (REINBERG, 1982; CADORNIGA, 1990).

II.1.3.- PARAMETROS DEL RITMO

Como primera aproximación, una variación regular y previsible puede ser asimilada a una función periódica. La función más utilizada para la aproximación a un ritmo es la forma sinusoidal. Esta semejanza tiene la ventaja de permitir la caracterización de un ritmo y su cuantificación por la estimación de varios parámetros: el período (τ), la fase o acrofase (ϕ), la amplitud (A), y el nivel medio o Mesor (M).

Período (τ): es el primer parámetro a estudiar para la cuantificación de un ritmo. Podríamos definirlo como una variación regular y previsible de un fenómeno, en este caso biológico, o en otra palabras, como la duración de un ciclo completo en una variación rítmica (HALBERG y col., 1977).

El análisis de las oscilaciones periódicas de una variable fisiológica registrada durante suficiente tiempo, puede revelar la existencia de varios períodos preponderantes (BINGHAM y col., 1982); así, la actividad cardíaca se manifiesta según ritmos donde los períodos son de alrededor de un segundo, de alrededor de 24 horas, o de alrededor de un año (BINGHAM y col., 1984). Para el conocimiento y situación en el tiempo de los períodos, componentes de un fenómeno bioperiódico, constituyen una operación que puede hacerse de manera precisa y rápida por medio

de programas especiales de cálculo electrónico (CORNELISSEN y col., 1980).

Partiendo, entre otros de la fórmula siguiente:

$$y = M + A \cos (w + \phi)$$

en la cual t = tiempo; w = velocidad angular; A = amplitud; M = Mesor o nivel medio y ϕ = acrofase; fórmula que indica el tipo de función matemática usada generalmente.

El período tiene una relación indirectamente proporcional con la frecuencia (f), de esta forma:

$$f = 1/\tau \quad \text{o bien} \quad \tau = 1/f$$

es decir, cuanto menor es el período, mayor es la frecuencia y a la inversa; así, por ejemplo, grandes frecuencias, como pueden ser los 1000 latidos por minuto del corazón del murciélago enano o las ondas neuronales que alcanzan frecuencias de envío del orden de 1000 / seg. o los aletazos de los colibrís, corresponderán a ritmos ultradianos o menores (MONSALVATJE, 1981). Por otra parte, a ritmos de baja frecuencia, como pueden ser el ritmo sexual de las hembras monoéstricas, es decir, las que entran en celo una vez al año, les corresponden ritmos infradianos o mayores.

El ritmo medio o de mediana frecuencia es, como antes hemos indicado, el ritmo circadiano.

Fase o Acrofase (ϕ) : Es la distancia que hay desde un tiempo de referencia dado (como puede ser la medianoche o el despertar), hasta el momento en que se produce el valor máximo de un ritmo (pico), definida mediante una función matemática ajustada a los datos. La acrofase se expresa en grados (negativos), donde 360° equivalen al período elegido (circadiano, circaseptano, etc...) y se toma 0° como el tiempo de referencia. En el caso de los ritmos circadianos, cuando se elige 0° como la medianoche, la acrofase también se puede expresar en horas y minutos (HALBERG y col., 1977).

Amplitud (A): Se define como la mitad de la variabilidad total del ritmo por el período considerado, o como, la mitad del cambio predecible que se produce en un ciclo estimado mediante una función (sinusoidal u otra). En una curva coseno ideal es la diferencia que hay desde el pico de la curva hasta el MESOR. El cambio total predecible es la doble amplitud (2A) (HALBERG y col., 1977).

Mesor (M): Acrónimo de "Midline Estimatic Statisc Of Rhym". Valor medio de una función rítmica (curva coseno) ajustada a los datos de una serie temporal, normalmente es el punto medio entre los picos y descenso de la curva coseno. Es

una media ajustada al ritmo (HALBERG y col., 1977).

El análisis de los ritmos se realiza por diferentes métodos, el más utilizado es el método COSENOTR que involucra un procedimiento analítico, que equivale al ajuste de una función cosenoidal de período fijo, a los datos por mínimos cuadrados y una representación gráfica de los resultados (HALBERG, 1969). Este método ha sido implementado en diferentes sistemas operativos (MONK y FORT, 1983; VOKAC, 1984).

II.1.4.- RITMOS CIRCADIANOS

El ciclo diario, de la misma forma que el lunar y el estacional, posee una correlación exterior que no se constata aparentemente, en los ritmos más rápidos, es decir, los ultradianos. Debido a ello se consideró durante mucho tiempo como una consecuencia pasiva de nuestro ciclo sueño-vigilia, que nos ha sido impuesto por el día solar y por la necesidad de trabajar con la luz. Posteriormente se comprobó que este ritmo continúa en un ambiente constante, de la misma forma que otros muchos ritmos más rápidos, difuminándose la distinción artificial que se había hecho con estos otros ritmos.

Son características de estos ritmos (REINBERG y HALBERG, 1971):

- La duración del ciclo que podrá apartarse de las 24 horas, pero oscilará entre las 16 y las 32 horas. Son circadianos, etimológicamente de *circa*=alrededor y *diem*=día.

- La variación de un individuo a otro, aunque el período es constante, con una oscilación de pocos minutos para cada uno, sin embargo, puede variar de repente y permanecer así durante semanas o meses.

- La frecuencia que se modifica con la intensidad lumínica del medio ambiente. Los organismos con actividad diurna se mueven con mayor rapidez cuanto más intensa es la luz; en los animales nocturnos sucede lo contrario.

- La frecuencia es sensible a la temperatura, pero sólo cambia sensiblemente en condiciones constantes de temperatura.

El comportamiento circadiano aparece tanto en el hombre como en los animales y las plantas, como se demostró aislando a perros en minas y búnquers abandonados o en cámaras de control (MONTSALVATJE, 1981). El proceso más seguro para medir el tiempo es el despertar, que es autónomo, claramente delimitado, y surge de un estado subconsciente. Utilizamos los ritmos circadianos a modo de cronómetro. Una cuarta parte de las personas, aproximadamente, pueden "dar bien la hora", estiman el tiempo transcurrido, se despiertan a una hora predeterminada o duermen un cierto número de minutos. Este reloj está sincronizado normalmente con el tiempo longitudinal del medio ambiente (STEIMBACH y col., 1976).

II.1.5.- SINCRONIZADORES DE LOS RITMOS

Los ritmos se corresponden con adaptaciones biológicas al ambiente, y así los circadianos, circamensuales y circaanuales se explican como adecuaciones a la variación día-noche, lunar (mareas) y estacional, respectivamente (REINBERG, 1982; JURADO, 1989). Sin embargo, el reciente descubrimiento de ritmos infradianos y ultradianos no puede explicarse como adaptación a parámetros ambientales de variación cíclica. Esto nos hace pensar que todavía estamos lejos de conocimiento profundo de la estructura temporal de los organismos (COSTAS, 1989).

No obstante, un cierto número de factores del entorno, susceptibles de variaciones periódicas son capaces de influenciar ciertos ritmos biológicos. Estos factores son denominados sincronizadores o *Zeitgeber* (STEIMBACH y col., 1976; REINBERG, 1979).

Hay sincronizadores de varios tipos: físicos, químicos y sociales. Ejemplo de los primeros es la luz, muy especialmente para los ritmos circadianos (de luz oscuridad o de actividad-reposo) y la temperatura (calor-frío), que también será muy útil para los ritmos infradianos de tipo estacional (como el de la reproducción); como ejemplo de sincronizadores de tipo químico podrían ser ciertos productos orgánicos

de tipo hormonal, como son las feromonas, que tendrán acción sobre ritmos circaestacionales o circaanuales en la esfera sexual; finalmente, los sincronizadores sociales típicos de los antropoides, especialmente de los homínidos y concretamente del hombre, como puede ser la presencia o ausencia de la madre (o persona que ocupa su lugar) para el recién nacido, también los horarios alimenticios, especialmente para el neonato, en cambio, para los adultos tiene más importancia el ruido silencio, íntimamente ligado, en general, al de la luz-oscuridad (MAYERSBACH, 1976; STEIMBACH y col., 1976; REINBERG, 1979; MONSALTVAJE, 1981; JURADO, 1989).

Los factores ambientales, cuya alternancia juega un papel de sincronizador, no tienen todos la misma importancia ni la misma influencia, sino que varía según la especie animal y las circunstancias, es decir que existe una jerarquía de sincronizadores (REINBERG, 1979; MONSALTVAJE, 1981).

En otro orden de cosas, existe una integración de ritmos ultradianos con los circadianos y de éstos con los infradianos; un ejemplo de ello es el ritmo del cortisol plasmático (LOPEZ-CALDERON, 1992).

Es típica la integración circaanual de la sincronización circadiana en las plantas (plantas de días largos, plantas de días cortos o mejor de noches largas y

plantas indiferentes o neutras). Todo ello, está relacionado con el fenómeno del fotoperiodo, que también influye en los órganos de reproducción de los vegetales (flores) y de los animales (testículos y ovarios); en estos últimos es muy importante el efecto de la luz sobre el eje diencéfalo-hipófiso-gonadal (MAYERSBACH, 1976).

Tanto en aves como en mamíferos, hemos de aceptar la existencia de animales de día largo y animales de día corto en relación a la influencia de la luz. Así, ciertos pájaros migradores, como las golondrinas, son sensibles a los días cortos. En enero y febrero, cuando el día se acorta al sur del Ecuador, los testículos y los ovarios de las golondrinas empiezan de nueva actividad normal, vuelan entonces hacia el sur de Europa y se acoplan en primavera, estación de su madurez sexual (MONSALTVAJE, 1981).

El hurón es sensible al aumento de la duración del día, así como el ratón. Por el contrario, el estro de las ovejas y ciervas se sitúa en otoño cuando los días son más cortos. Los cobayos son insensibles a la duración de los días y las noches (MONSALTVAJE, 1981).

Los sincronizadores pueden ser manipulados, logrando cambios de período y/o un desplazamiento de la acrofase, es decir, que es posible imponer a los ritmos biológicos ultradianos, circadianos e infradianos un período diferente de su período

natural, siempre que se respenten ciertas condiciones. Una de estas condiciones será que los estímulos deben tener un período cercano al período del sistema excitado (PHILIPPENS, 1976; COSTAS, 1989).

En el hombre, los cambios de la fase circadiana del sincronizador socio-ecológico sin modificación de su período, se realizan en dos circunstancias particulares: en los vuelos transatlánticos y en los cambios horarios de trabajo a turnos. En estos casos el organismo tiene que volver a "ponerse en hora", es decir, desplazar las acrofases de sus diferentes ritmos a fin de "ajustarse" a su nuevo horario. Este ajuste a las nuevas circunstancias dependerá de varios factores: 1) de la variable considerada; así, para el ciclo actividad-reposo el reajuste es bastante rápido, para la temperatura menos rápido y mucho más lento para la actividad suprarrenal, y 2) para una misma variable: de la especie animal, de la manipulación del sincronizador, de la edad, del individuo, de su tipo constitucional, etc... (STEIMBACH y col., 1976; MAYERSBACH, 1976; JURADO, 1989).

II.1.6.- ASPECTOS FARMACOLOGICOS

Lo anteriormente expuesto tiene una serie de aplicaciones concretas. Desde nuestro punto de vista la Cronofarmacología, estudia los efectos de los fármacos en función de la estructura temporal del organismo considerado, dicho de otra forma, de la hora de tratamiento, teniendo en cuenta la sincronización de este organismo. También estudia los efectos de los fármacos, así como las eventuales alteraciones del período, la acrofase, la amplitud y el mesor sobre los mismos (REINBERG, 1992).

La cronofarmacología es el paso obligado para la aplicación correcta de los medicamentos a efectos terapéuticos, cuyo estudio es la cronoterapéutica (HALBERG y col., 1984).

Tanto para el estudio de la cronofarmacología, como de la cronoterapéutica, hay que conocer bien los ritmos secretorios glandulares y las oscilaciones rítmicas orgánicas (HAUS y col., 1979; KÜHN y col., 1980; NELSON y col., 1980; LAGOGUEY y REINBERG, 1981).

Los hechos experimentales en Cronofarmacología permiten considerar que los efectos de un agente farmacológicamente activo varían según una periodicidad circadiana y eventualmente circamensual y circanual (DESCOVICH y col., 1974;

TAYLOR y col., 1983 y 1984; LEVI y col., 1986; OLLANGNIER y col., 1987;
GUISOU y col., 1987).

II.1.6.1.- Cronofarmacocinética

Se han aceptado experimentalmente una serie de nuevos conceptos farmacológicos. Se trata de la Cronofarmacocinética de una sustancia, la Cronoestesia de los órganos diana frente a una sustancia y la Cronoergía o resultado global (HALBERG y col., 1977; REINBERG, 1982; CARDONIGA, 1990).

A partir del momento en que una sustancia se introduce en el organismo (por vía enteral o parenteral), su concentración en los fluidos orgánicos (sangre, sudor, orina, etc...), aumentará, alcanzará un máximo y decrecerá, excepto por vía endovenosa, que solo disminuirá. Los efectos farmacológicos dependerán, en gran medida de la concentración de la sustancia en la sangre en un momento dado. Las variaciones de la concentración pueden ser cuantificadas. Teniendo en cuenta la hora de la administración de un fármaco, se constata que su farmacocinética no es constante, sino que varía, según los ritmos biológicos (REINBERG, 1982; HALBERG y HALBERG, 1984; CARDONIGA, 1990).

La cronofarmacocinética, que Ritschel considera "una nueva subdisciplina entre la cronobiología y la farmacocinética", estudia los cambios rítmicos en biodisponibilidad, aclaramiento, metabolismo y excreción de fármacos por el organismo en función del momento del ciclo biológico en el que se hace la

administración (CADORNIGA, 1990).

Cuando se modifica la forma o ritmo de administración se pueden obtener diferencias significativas demostrables en valores de concentración máxima (C_{max}), tiempo máximo (t_{max}), $t_{1/2}$ o biodisponibilidad. También se modifican la toxicidad, efectos adversos y tolerancia, lo que puede mejorar de forma muy acusada el resultado obtenido y el cumplimiento por el paciente de la terapia medicamentosa (CADORNIGA, 1990).

En función de la hora del día a que se hace la administración de un medicamento, se puede modificar su absorción, distribución, metabolismo y excreción. La alteración puede afectar a una sola o varias de las fases indicadas; así, la Griseofulvina presenta una absorción máxima cuando se administra a mediodía, y mínima a las seis de la mañana (datos obtenidos por el estudio de la excreción acumulada en setenta y dos horas) (KABASAKALIAN y col, 1970). El $t_{1/2}$ de absorción del Hexobarbital es de 1,16 horas a las 2 horas y de 0,44 horas a las 18 horas. La disminución simultánea de las constantes de velocidad de absorción y eliminación incide en el valor de la biodisponibilidad que es cinco veces mayor a las 18 horas que a las 2 horas (ALTAMAYER y col, 1979).

La diferencia en la cinética de absorción no se limita a administración oral.

Se encuentran constantes de velocidad de absorción 3,5 veces más altas en la administración intramuscular de Petidina en el período 6-10 horas que en el período 18-23 horas (BELANGER y col., 1982).

El volumen de distribución, real o aparente, experimenta variaciones entre períodos de actividad y reposo por la influencia de factores tales como: volumen plasmático, flujo sanguíneo, pH o concentración de proteínas plasmáticas. En electrolitos débiles, el leve descenso del pH durante el período de sueño, puede modificar la distribución de fármacos por transferencia intercompartimental. El metabolismo y excreción son, probablemente, los procesos más afectados por los ritmos circadianos (CADORNIGA, 1990; REINBERG, 1992).

Las diferencias que se pueden observar entre los datos aportados por distintos autores, trabajando con protocolos experimentales análogos, son habitualmente de tipo cuantitativo y pueden atribuirse a las inevitables variaciones interindividuales en estudios de esa naturaleza. Desde el punto de vista cualitativo se obtienen en general, resultados homogéneos. Así, Chauhan y col. (1986) encuentran valores de semivida para la Teofilina de 7,9 horas a las 7 a.m. y de 11,41 horas a las 7 p.m.; Giacona y col. (1983), en un estudio semejante, dan valores de $t_{1/2}$ de 6,6 y 7,8 horas con administración a las 7 y 19 horas, respectivamente. Taylor y col. (1984) de 6,64 y 7,5 horas a las 9 y 21 horas. Por el contrario, y ésta es la excepción,

Vematsu y col. (1986) no encuentran diferencias significativas en la constante de velocidad de eliminación en el transcurso del día.

Todos los autores que han realizado el seguimiento de los niveles hemáticos de Teofilina encuentran variaciones periódicas en la concentración que se corresponde con los ciclos circadianos. En todos los casos se obtienen niveles más altos cuando la Teofilina se administra por la mañana que cuando se hace por la tarde o por la noche, tanto si la liberación es inmediata como si es liberación sostenida (GIACONA y col., 1983; TAYLOR y col., 1984; CHAUHAN, 1986).

Se han sugerido distintas interpretaciones farmacocinéticas para explicar este distinto comportamiento:

1) La velocidad de absorción es diferente por la mañana que por la noche. Esta diferencia, generalmente aceptada, puede explicar cualitativamente el distinto perfil de las curvas concentración-tiempo, pero no satisface un análisis cuantitativo riguroso de los resultados experimentales, ya que se han comprobado las mismas variaciones periódicas en concentración hemática cuando la administración se hace por perfusión endovenosa a velocidad constante.

Se observan variaciones circadianas en la disposición de la Teofilina durante

la perfusión endovenosa a velocidad constante en perros. El tiempo de perfusión se establece en 48 horas y el seguimiento de los niveles hemáticos se comienza a las 24 horas de iniciada la perfusión, momento en que, por consideraciones elementales farmacocinéticas, se habrá conseguido el equilibrio dinámico.

Las concentraciones máximas se presentan entre las 24 y 30 horas cuando la perfusión se inicia por la mañana (entre las 11 y las 12) y las mínimas entre las 39 y 42 horas. Si la perfusión se inicia a las 11 de la noche, los máximos y mínimos se obtienen a las 39 y 24 horas, respectivamente. En consecuencia, las variaciones periódicas en las concentraciones de Teofilina, en equilibrio dinámico, no son imputables exclusivamente a la velocidad de absorción (RACKELEY y col., 1988).

2) Variaciones en la constante de velocidad de eliminación. Casi todos los autores coinciden en que la velocidad de eliminación es mayor por el día que por la noche. Ateniéndonos a este dato, sería previsible el fenómeno inverso. Los niveles nocturnos serían más altos que los diurnos (CADORNIGA, 1990).

3) Modificación del volumen de distribución. La relación aparente entre volúmenes de distribución de día y de noche es de apenas del 10%, notablemente inferior a la variación que experimenta la concentración en equilibrio que oscila entre el 20 y el 30 %. No obstante, éste es el factor que contribuye a las

fluctuaciones circadianas de las concentraciones hemáticas (TAYLOR y col., 1984; RACKLEY y col., 1985).

4) Variación periódica del aclaramiento. El cociente entre velocidad de perfusión y aclaramiento total es la concentración en equilibrio. Si la velocidad de perfusión es constante, el aclaramiento constituye la variable independiente y la concentración en equilibrio la variable dependiente. Algunos autores no encuentran variaciones significativas en el aclaramiento en el transcurso del día (GIACOMA y col., 1983; TAYLOR y col., 1986).

De las consideraciones apuntadas, se puede decir que las variaciones circadianas, periódicas y rítmicas de las concentraciones en equilibrio de la Teofilina, tienen fácil interpretación en la administración oral, pero en perfusión endovenosa a velocidad constante la interpretación puede ser objeto de controversia.

Como ya se apuntó con anterioridad, la cronofarmacocinética, cronofarmacología, cronoeficacia y cronotoxicidad, proporcionan las bases racionales a la cronoterapia, que tiene por objeto establecer las pautas posológicas adecuadas a los ritmos biológicos, a fin de aprovechar al máximo los efectos deseados y reducir los adversos (REINBERG, 1979 y 1992).

Otro grupo de fármacos que constituyen un magnífico ejemplo en el capítulo de la cronofarmacoterapia, es el de los antiinflamatorios no esteroides, de los cuales existe una abundante literatura farmacocinética y cronofarmacocinética en animales de laboratorio y en humanos. Entre estos seleccionaremos como representante del grupo a la Indometacina.

Se ha comprobado la existencia de variaciones circadianas en la farmacocinética de la Indometacina tras administrar a ratas una dosis de 0,5mg/kg por vía I.V. en cuatro tiempos distintos (GUISOU y col., 1987).

Del estudio del comportamiento farmacocinético de la Indometacina en ratas, tras administrar 3 mg/kg por vía oral. Se concluye que la velocidad de absorción es notablemente mayor a las 21 que a las 8 horas por las variaciones de los valores de C_{max} y t_{max} , no se modifica sensiblemente la biodisponibilidad y la semivida es mayor por la noche que por la mañana (BELANGER y col., 1982).

En los hombres se observa que una diferencia de 12 horas en el tiempo de administración (de 7 a 19 horas) reduce la concentración plasmática a la mitad y esta diferencia guarda relación con la tolerancia al medicamento (CLENCH y col., 1981).

Es interesante resaltar la acusada fluctuación alrededor del mesor, de los valores de C_{max} y t_{max} , sin variación significativa de la biodisponibilidad (CADORNIGA, 1990).

En un estudio realizado en enfermos aquejados de reuma, donde se evaluaron los niveles plasmáticos de Indometacina y su metabolito O-demetilindometacina, después de administrar 75 mg de Indometacina. Se observó que el grupo correspondiente a la administración a las 20 horas se diferenciaba del de las 8 horas, tanto en los valores de Indometacina inalterada como de su metabolito demetilado. La mayor demetilación de la indometacina en este grupo de ensayo puede deberse en parte, a la gran actividad enzimática del sistema microsomal que, como es sabido, experimenta variación circadiana con incremento de actividad en el último tercio del día. Probablemente coadyuven al mantenimiento de los niveles plasmáticos la modificación de la unión a seroalbúmina y las constantes de velocidad de absorción y excreción (GUISOU y col., 1983).

Los efectos indeseables manifestados por los individuos tratados con Indometacina, como trastornos gastrointestinales, nerviosos o cutáneos, guardan relación con la hora de administración; a las 20 horas causa menos trastornos que a las 8 horas. Ello se debe probablemente, al valor acusadamente inferior de la C_{max} en la administración vespertina que en la matutina (CLENCH y col., 1981;

GUISSOU y col., 1983).

Se han realizado estudios análogos, aunque con diferentes resultados cuantitativos, con otros analgésicos antiinflamatorios no esteroides, como la fenilbutazona, piroxican, ibuprofen, ketoprofen, etc...

En un estudio sobre cronofarmacocinética del Ketoprofen en administración oral, a cuatro horas diferentes (1;7;13;19 horas) se encontraron variaciones muy acusadas en todos los parámetros farmacocinéticos que dependen de la hora y del día en que se realiza la administración (OLLANGNIER y col., 1987).

II.1.6.2.- Cronotoxicología

Al igual que existen variaciones circadianas en la susceptibilidad y en los efectos adversos, también se manifiestan modificaciones circadianas y estacionales en la toxicidad. Si se admite que todo organismo vivo, es sede de una bioperiodicidad, es fácil comprender que reaccionará de forma diferente frente a un mismo estímulo, sea tóxico, patogénico o medicamentoso, según el momento en que este actúe (REINBERG, 1979).

Probablemente, en los productos en los que mejor se ha estudiado la cronotoxicidad es en los metales pesados y en los antibióticos aminoglucósidos. Con los antibióticos que se han utilizado en estudios de crononefrotoxicidad, se ha comprobado la existencia de variaciones circadianas con indicación de la hora y del día a la que se presenta mayor tolerancia o toxicidad. Es interesante señalar que la hora de máxima toxicidad en primavera, coincide exactamente con la de mínima toxicidad en otoño para la Amicacina (DORIAN y col., 1987).

La nefrotoxicidad de los metales pesados presenta máximos de toxicidad a las 20 horas y mínimos a las 2 horas, manifestación vinculada a la cronofisiología renal (CAL y col., 1985).

En la misma línea se demostró, trabajando con ratas, que la mortalidad inducida por el Cis-Platino es máxima en el verano y mínima en el invierno (LEVY, 1982).

En consecuencia, cada vez es más necesario en toxicología precisar no sólo la especie animal, vía de administración, protocolo de trabajo y tratamiento de datos, sino también hora y época del año en que se ha realizado el ensayo (JURADO, 1989).

II.1.6.3.- Cronoterapéutica

La cronofarmacología y la cronotoxicología deben necesariamente desembocar en una cronoterapéutica (CONSO, 1979; HALBERG y HALBERG, 1984; REINBERG, 1992).

Actualmente el interés de la cronoterapéutica se centra en tratar de resolver los problemas de la optimización del uso de los medicamentos. Esta optimización consiste en saber de que manera se pueden reducir los efectos indeseables.

Un ejemplo muy importante son los tratamientos hormonales, en los que se debe tener en cuenta el efecto de la luz sobre el eje diencéfalo-hipófiso-gonadal, puesto que los niveles de la ACTH, la prolactina, la HCG, etc... se modifican notablemente (KÜHN y col., 1980; LAGOGUEY y REINBERG, 1981; REINBERG, 1982; SANCHEZ y col., 1983).

Otro ejemplo de optimización con un esquema cronofarmacológico, es el de los agentes antitumorales, ya que se trata de sustancias para las cuales el margen de seguridad entre la dosis antitumoral eficaz y la dosis tóxica es muy estrecho. En efecto, estas sustancias producen la muerte de las células tumorales y/o les impide multiplicarse, interviniendo en uno o varios de los procesos fundamentales que

implican entre otros, al metabolismo de los ácidos nucleicos. Así, resulta que las células sanas pueden verse afectadas también por estas sustancias.

La nueva estrategia fundamentada en la cronofarmacología consiste en sacar provecho de las variaciones de cronotoxicidad del medicamento con respecto al huésped, portador del cáncer, y/o frente al tumor mismo. Consiste en modular, por ejemplo, la distribución del medicamento en las 24 horas, de forma que la fracción máxima de la dosis cotidiana se aplique en el momento en que se tolera mejor, mientras que la fracción mínima se administra a la hora en que el agente anticanceroso es más tóxico. El momento se determina por diferentes técnicas (termografía, actividad enzimática, etc...) y se aplica no solamente a fármacos, sino en tratamientos físicos, como la crioterapia las por radiaciones. (CAVALLINI y col., 1987, COSTAS, 1989; HALBERG y col., 1992).

II.2.- ANDROGENOS

II.2.1.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE ANDROGENOS:

II.2.1.1.- La hipófisis y el hipotálamo

La hipófisis es una glándula endocrina, localizada en la silla turca del esfenoideas, y puede funcionar como una extensión anatómica y funcional del sistema nervioso central. Se subdivide anatómicamente en: neurohipófisis o hipófisis posterior y adenohipófisis o hipófisis anterior.

Embriológicamente ambas provienen de primordios diferentes de origen ectodérmico. Durante el desarrollo embrionario, una porción del techo de la faringe avanza dorsalmente para alcanzar una evaginación de dirección ventral de la base del diencéfalo. La evaginación proyectada dorsalmente, conocida como *Divertículo de Rathke o Ducto Craneofaríngeo*, forma la adenohipófisis, mientras que la dirigida ventralmente, de tejido neuronal, forma la neurohipófisis.

El tejido de la hipófisis anterior se expande dorsalmente para rodear el tallo infundibular y la eminencia media formando la *pars distalis* (porción secretora principal de la adeno- hipófisis) y la *pars tuberalis*. El tallo infundibular y la *pars tuberalis*, constituyen el pedículo hipofisiario. La *pars intermedia* normalmente se

forma a partir del Ducto Craneofaríngeo cerca del punto en que se fusiona con la *pars nervosa* (VALLOTON, 1985; CAPEN y MARTIN, 1991).

El desarrollo embriológico está de acuerdo con la inervación final de estos lóbulos. La neurohipófisis presenta una inervación directa de los núcleos hipotalámicos, pero hasta la fecha no se ha demostrado ninguna inervación funcional significativa de la hipófisis anterior por vía hipotalámica, es más, la comunicación con el hipotálamo se establece por una ruta humoral provista por el sistema de venas portales de la hipófisis.

El sistema portal comienza en la eminencia medial del *Tuber Cinereum* a modo de bucles capilares que drenan en venas paralelas que atraviesan el pedúnculo. En el lóbulo anterior los vasos portales desembocan en sinusoides que irrigan las células hipofisarias. La sangre venosa de la glándula, drena en el seno cavernoso. Aunque puede haber un pequeño aporte arterial a la hipófisis anterior, los vasos portales componen el principal aporte sanguíneo. En adición a estos vasos portales "largos", hay conexiones portales venosas "cortas" que alcanzan al lóbulo neural y atraviesan el lóbulo intermedio hacia la hipófisis anterior (NEUMANN, 1987; FLOREZ y AMADO, 1992).

Los sinusoides venosos de la glándula están formados por diversos tipos de células hipofisarias, que pueden ser clasificadas como eosinófilas, basófilas y

cromóforas según su afinidad por distintos colorantes. Se pensaba que cada tipo celular producía una única hormona, pero actualmente es sabido que determinadas células son capaces de secretar más de una hormona.

Las acidófilas se subdividen en somatotrofas y luteotrofas y secretan hormona del crecimiento (STH) y prolactina (LTH) respectivamente. Las basófilas incluyen tanto granos gonadotrofos que secretan hormona luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH), como gránulos tirotrofos que secretan hormona tirotrópica (TSH). Las cromóforas incluyen células endocrinas que intervienen en la síntesis de adrenocorticotropa (ACTH) y hormona estimulante de los melanocitos (MSH), células foliculares no secretoras y células indiferenciadas del tallo (VALLOTON, 1985; CAPEN y MARTIN, 1991). Dentro de este grupo de hormonas, presentan un papel reconocido en la terapia del cáncer de próstata la prolactina, la ACTH y la LH (Mc CONNELL, 1991; CARPEN Y MARTIN, 1991).

La prolactina tiene considerable semejanza estructural con la STH; induce al crecimiento de la glándula mamaria y a la secreción láctea (hormona lactógena). En roedores afecta a la función gonadal con efecto estimulante del cuerpo lúteo y también ayuda al mantenimiento de la estructura y función de los órganos sexuales accesorios. Tiene un efecto estimulador de las células prostáticas en cultivo, por lo que se cree que participa en la regulación del crecimiento prostático (NEUMANN, 1987; Mc CONNELL, 1991).

La ACTH es la hormona de la hipófisis anterior que regula la función de la corteza adrenal. Este pequeño polipéptido, de una cadena de 39 aminoácidos, es parte del sistema precursor de la proopiomelanocortina. En la adenohipófisis, el precursor es procesado hacia la ACTH y β -endorfina, un péptido opiáceo endógeno. La secreción de ACTH aumenta por diversos estímulos estresantes y la secreción es inhibida por glucocorticoides pero no por andrógenos (Mc CONNELL, 1991).

La adenohipófisis secreta dos glucoproteínas, la FSH y la LH o ICSH, que tienen efecto gonadotrópico específico sobre los testículos. La primera, promueve la espermatogénesis pero no estimula la producción de andrógenos por las células de Leydig, y tiene un papel desconocido en el cáncer de próstata, sin embargo, la FSH puede regular parcialmente el número de receptores LH de las células de Leydig a los esteroides (NEUMANN, 1987). La hormona LH es estructuralmente semejante a la FSH y actúa directamente sobre las células de Leydig provocando la producción de testosterona. Aparentemente, algunas células gonadotropas hipofisarias secretan solo LH, mientras que otras secretan FSH y LH.

A través del sistema venoso portal descrito, la función de la adenohipófisis es regulada por el hipotálamo. Lesiones que destruyen la eminencia media provocan disminución en la secreción, por lo tanto, hay una influencia estimuladora neta del hipotálamo en la secreción de la mayoría de las hormonas de la hipófisis anterior, con excepción de la prolactina.

Las hormonas hipotalámicas liberadoras e inhibidoras, influyen en la liberación de las adenohipofisarias. La hormona liberadora de corticotropina o CRH, junto con la ADH u hormona antidiurética o vasopresina (neurohipofisaria), controlan la secreción de ACTH. Las hormonas liberadoras de LH y de FSH son probablemente idénticas, aunque se cuestiona la existencia de una FSHRH. Actualmente se hace referencia a esta RH como GnRH u hormona liberadora de gonadotropinas (NEUMANN, 1987; Mc CONNELL, 1991).

Todas las hormonas polipeptídicas, incluidas las hormonas liberadoras del hipotálamo, activan las células de la hipófisis por unión a receptores altamente específicos en la membrana externa de la célula diana. La unión al receptor activa la adenil-ciclase, conduciendo a la producción de AMPc y a un aumento del Ca^{++} intracelular. El AMPc activa una proteín-cinasa que media en la mayor parte de los efectos de los nucleótidos cíclicos o de la función celular. En la célula hipofisaria la activación de la proteín-cinasa provoca fosforilación de determinados constituyentes de membrana que promueven la secreción de la hormona. Esta ruta del AMPc es el principal mediador del efecto estimulador del CRH en la secreción de ACTH. Por el contrario, el sistema de AMPc juega solo un papel parcial en el mecanismo de acción de la GnRH. Los productos del metabolismo del ácido araquidónico (eicosanoides), están involucrados en la inducción de exocitosis. Específicamente los leucotrienos y los epóxidos participan de forma importante en la movilización intracelular del calcio (VALLOTON, 1985; FLOREZ y AMADO,

1991).

La regulación de la secreción de hormonas depende de varios mecanismos: humoral, nervioso y genético. El control humoral de la regulación de una hormona adenohipofisaria por concentración de otra hormona, se lleva a cabo por un sistema de retroalimentación. En el caso de la ACTH, los esteroides adrenales retroalimentan directamente la hipófisis para inhibir la respuesta liberatoria; esta retroalimentación también tiene lugar a nivel del hipotálamo para inhibir la liberación de CRH y vasopresina. La relación entre los esteroides gonadales y el eje hipotálamo-hipofisario es la base de distintos tipos de tratamientos hormonales para el cáncer de próstata. Los agonistas-antagonistas GnRH, estrógenos y agentes progestacionales inducen a un estado de castración médica en el hombre, por interrupción de la función gonadotrópica de la hipófisis. La castración y eliminación del efecto de retroalimentación por acción de la testosterona, produce un aumento de los niveles de FSH y LH (DE VOOGT y col., 1990; Mc CONNELL y col., 1991).

La regulación de la secreción y liberación de estas hormonas hipofisarias es pulsátil y rítmica. En ciertas especies animales, y en el hombre, el incremento de la duración diurna envía señales al hipotálamo que regulan la liberación pulsátil de GnRH que a su vez incrementa la liberación o cambia la tasa de gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH); esto determina e indica la existencia de unos ritmos circadianos y circanuales de secreción para estas hormonas. Siendo

muy importante el efecto de la luz sobre el eje diencéfalo-hipófiso-gonadal (MONSALTVAJE, 1981; Mc CONNELL, 1991).

El cese de la retroalimentación negativa mejora la liberación GnRH, aumentando tanto la síntesis como la descarga de gonadotropinas. Dosis bajas de estrógenos o andrógenos pueden suprimir la respuesta a GnRH. En el caso de los estrógenos esta supresión puede tener lugar al cabo de una hora.

La terapia con esteroides a largo plazo induce a la supresión no sólo de la secreción, sino también de la síntesis, disminuyendo consecuentemente el contenido de gonadotropinas en la hipófisis; este declive va asociado a un descenso posterior de la respuesta a GnRH que puede ser causado en parte por una desensibilización de los receptores a la GnRH (Mc CONNELL, 1991).

La acción de retroalimentación negativa de andrógenos y estrógenos en el hipotálamo y en la hipófisis, regula la secreción de LH. Tanto la testosterona como el estradiol pueden inhibir la secreción de LH. Aunque el cerebro y la hipófisis pueden pasar la testosterona a estradiol, ambas hormonas probablemente actúan independientemente. El hecho de que el metabolito Dihidrotestosterona (DHT), que no puede ser aromatizado a estrógeno, ejerza retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, sugiere que la testosterona no requiere convertirse en estradiol para inhibir la secreción de estrógenos.

La testosterona también parece producir una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH en la hipófisis, ya que aumentos moderados en los niveles de testosterona plasmática disminuyen la respuesta a la estimulación aguda por GnRH en presencia de niveles plasmáticos normales de estradiol. La testosterona actúa en el sistema nervioso central disminuyendo el pulso generador hipotalámico, y por tanto la frecuencia de pulsos de LH; es más, la testosterona parece producir una retroalimentación negativa directa sobre la secreción de LH a nivel hipofisario (McCONNELL, 1991; FLOREZ y AMADO, 1992).

II.2.1.2.- Producción androgénica testicular

La LH hipofisaria alcanza las células de Leydig testiculares a través de la circulación sistémica. La unión de LH a su receptor de membrana, cataliza la formación de AMPc. La activación de la proteín-cinasa de la célula de Leydig, produce el estímulo para la conversión del colesterol en pregnenolona. La cantidad de testosterona sintetizada se relaciona más directamente con el grado de ocupación de las subunidades reguladoras de la proteín-cinasa por el AMPc, que con la cantidad total de AMPc en las células. El complejo LH-receptor desencadena probablemente la endocitosis y la subsiguiente degradación. Los receptores de LH disminuyen en respuesta a la administración de LH o HCG (gonadotropina coriónica humana) y este descenso de los receptores esta asociado a una disminución de la respuesta (desensibilización); sin embargo, la desensibilización no puede ser exclusivamente el resultado del descenso en el número de receptores . Las reacciones post-receptoriales probablemente son más importantes que la regulación por receptores, ya que el AMPc es incapaz de revertir esta desensibilización (NEUMANN, 1987).

El colesterol, principal esteroide precursor de la testosterona, puede también ser sintetizado a partir de la Acetil CoA, o ser derivado del pool plasmático de LDLP. Cinco enzimas (o complejos enzimáticos) están involucrados en el paso de colesterol a testosterona. Además de la testosterona, la DHT, androsterona,

androstenediona, progesterona y 17-dihidroxiprogesterona son secretadas por las células de Leydig (VALLOTON, 1985).

La testosterona en el plasma se encuentra fundamentalmente ligada a proteínas plasmáticas, principalmente albúminas y globulinas, y en forma de enlace testosterona-estradiol (TeBG). En la sangre aproximadamente el 2 % de testosterona esta en forma libre, el 44 % va ligada a TeBG y el 54 % se une a albúminas y otras proteínas; sólo la porción libre esta disponible para entrar en el tejido diana, sin embargo, la fracción activa de la hormona es funcionalmente mayor del 2%, ya que la testosterona puede disociarse de la TeBG y de la albúmina.

El transporte de hormonas esteroideas en las células, es complejo, necesitando la disociación de la hormona ligada a proteínas dentro del capilar, por tanto, la cantidad de hormona disponible para entrar en las células depende de la combinación del tiempo de tránsito capilar, de la cantidad de hormona ligada y de la permeabilidad de membrana. El tiempo medio de disociación de la testosterona es menor de 1 segundo, desde la albúmina, mientras que es de 22 segundos desde la TeBG, por tanto, toda la testosterona ligada a albúminas esta más disponible que la TeBG. Debido al tiempo de tránsito en la mayoría de los tejidos, está disponible del 40 % al 50 % de la testosterona plasmática total (NEUMANN, 1987).

La testosterona sirve de precursor circulante o prohormona para la formación

de dos tipos de metabolitos activos, que median muchos de los fenómenos fisiológicos involucrados en la acción androgénica. La testosterona puede transformarse en esteroides 5α reducidos, como la DHT, por la enzima 5α reductasa. Alternativamente, los andrógenos circulantes pueden ser aromatizados hacia estrógenos en los tejidos periféricos; estos estrógenos en algunos casos actúan en unión con los andrógenos para influir en los procesos fisiológicos, pero también pueden ejercer efectos independientes y opuestos a los de los andrógenos. Pequeñas cantidades de estradiol y DHT son secretadas directamente desde los testículos, sin embargo la conversión periférica constituye la mayor fracción de estos dos metabolitos (NEUMANN, 1987; FLOREZ y AMADO, 1992).

II.2.1.3.- Producción androgénica adrenal

La glándula adrenal segrega cuatro compuestos de 19 átomos de carbono: testosterona , dihidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dihidroepiandrosterona (DHEAS) y androstenodiona.

Las glándulas adrenales y los testículos, comparten un mecanismo de biosíntesis de testosterona, sin embargo, la actividad de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en los testículos, es más importante; por tanto, la androstenodiona y la dihidroepiandrosterona, son los principales andrógenos adrenales (VELLTON, 1985).

El efecto de los andrógenos adrenales sobre células tumorales prostáticas, tanto benignas como malignas, es controvertido. En animales de experimentación la, adrenalectomía influye poco en el tamaño de la próstata, el ADN o la morfología de los tejidos sexuales accesorios, es más, la castración induce a una reducción significativa en el tamaño prostático sin adrenalectomía concomitante. Ciertamente, los andrógenos adrenales no son suficientes para restaurar el tamaño de la próstata, sin embargo, la estimulación adrenal ACTH puede inducir a crecimiento prostático (MOBBS y col., 1983; SCHULZE y col., 1987).

La tasa de producción de DHEA en hombre es de 10-30 mg/día, sin

embargo, menos del 1 % de la testosterona plasmática proviene de la DHEA. El tejido prostático tiene la capacidad de hidrolizar el DHEAS a esteroides libres mediante una sulfatasa. Aunque una porción considerable de androstenediol aparece como epiandrosterona y androsterona, sólo pequeñas cantidades de potentes metabolitos 5α reducidos como el DHT, se forman en fuentes adrenales, por tanto, el DHEAS no es un andrógeno muy potente.

Los andrógenos adrenales DHEA y androstenediona pasan a testosterona en la célula prostática por la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta enzima y su ARNm están presentes en gran cantidad en tejidos procedentes de cáncer prostático (LABRIE y col., 1989).

La importancia de los andrógenos adrenales se demuestra cuando después de una orquiectomía descienden en un 60% los niveles de DHT en el tejido prostático cancerígeno (GELLER y col., 1984). En otros estudios, sin embargo, la castración médica ha demostrado que descienden los niveles prostáticos de DHT al 90%; de hecho, evidencias clínicas, sugieren que los andrógenos adrenales juegan un pequeño papel en pacientes con cáncer de próstata (SCHULZE y col., 1987). Realmente, en condiciones normales, los andrógenos adrenales no producen un crecimiento significativo del tejido prostático. Estudios anteriores, que demostraban niveles significativos de DHT en hombres castrados, con cáncer de próstata, tienen el defecto de que en los grupos de pacientes tratados con estrógenos, no se informa de

los niveles de testosterona sérica (ELLER y col., 1984), es más, la opinión de que el bloqueo de receptores disminuye los niveles de DHT en el tumor no puede explicarse fácilmente a no ser que la transcripción del gen 5 α -reductasa sea andrógeno dependiente; además, los andrógenos adrenales no median efectos de retroalimentación en la secreción de ACTH; también el cortisol participa de la retroalimentación negativa (NEUMANN, 1987; LABRIE y col., 1989).

II.2.2.- ANDROGENOS Y CANCER DE PROSTATA

Todos los procesos celulares andrógeno dependientes en la próstata, aparentemente están mediados a través del receptor androgénico.

La concentración de receptores androgénicos es mayor en los órganos accesorios de reproducción masculinos y dependen de los andrógenos para su crecimiento. Otros tejidos como el músculo esquelético, hígado y corazón tienen menor cantidad de receptores (GELLER y col.1989). También se ha descrito la mayor o menor sensibilidad androgénica de una línea tumoral, en función del número de receptores a dicha hormona (DIAMOND y col., 1984; LIN y SHAIN, 1989; SHUURMANS y col., 1990).

El receptor es activado por la testosterona o por la DHT, que es un metabolito de la primera por acción de la 5 α - reductasa.

Aunque las hormonas actúan sobre el mismo receptor, la DHT, tiene más afinidad. Presumiblemente la unión hormona-receptor interactúa con secuencias específicas de ADN a contracorriente con los genes andrógeno-regulados mejorando la tasa de transcripción y producción de ARN específico.

Estos complejos hormona-receptor también pueden inhibir la transcripción de

genes, conduciendo a la muerte celular. Este mecanismo puede incluir, en menor grado, la activación de genes específicos (BANDYK y col., 1990).

En estudios sobre líneas celulares se ha observado diferencias entre las células prostáticas normales y las tumorales, que se basan entre otra serie de cuestiones, en que las segundas tienen menores concentraciones de 5 α -reductasa (GELLER y col., 1989) y que la unión andrógeno-receptor y la subsiguiente expresión del receptor ARNm también es menor (QUARMBY, 1990); esto hace que el comportamiento y tipo de respuesta se puedan modificar entre ambas clases de células.

Desde el punto de vista terapéutico, se ha observado que los tumores de próstata o de mama sin receptores a andrógenos o a estrógenos respectivamente, no responden a la terapia endocrina (KING, 1990); pero este hecho también se ha producido en tumores con presencia de receptores. Esto se explicó por un defecto del proceso de transcripción (KING, 1990), pero actualmente se sabe que este proceso es más complejo.

Hay un mecanismo de desensibilización por mutación de proteínas, cambios en la expresión del gen, o la adaptación de pequeños grupos celulares andrógeno dependientes a un ambiente hormonal alterado (ISAACS y KYPRIANOU, 1987; BRUCHOVKY y col., 1990); influyen también los factores de crecimiento,

busquedas de rutas proliferativas alternativas (independencia hormonal), etc... En conjunto el origen celular multifocal y la inestabilidad genética de las células tumorales.

Por todo ello se puede decir que la eficacia de la terapia del cáncer de próstata, dependerá no sólo del número de células hormono-dependientes u hormono-independientes, sino también de la capacidad de adaptación y de la presencia de diversos factores de crecimiento (CHANG y col., 1989; HUSMANN y col., 1990; SADI y col., 1990).

II.2.2.1.- Terapias hormonales específicas

Aunque las terapias hormonales suelen ser aplicadas en combinación, las trataremos de forma independiente:

- Castración Quirúrgica:

La eliminación quirúrgica de los testículos (orquiectomía bilateral), disminuye los niveles de testosterona circulante en un plazo corto de tiempo. Aunque tanto la FSH como LH plasmáticas están elevadas significativamente, debido a la pérdida de la retroalimentación negativa por los esteroides gonadales, los niveles de testosterona permanecen al nivel de castración a lo largo de toda la vida del paciente (NEUMANN y col., 1990; DE VOOGT y col., 1990).

Los niveles tisulares de DHT se reducen de forma significativa debido al descenso del sustrato primario.

- Castración Médica:

. Estrógenos: los estrógenos han sido la forma más común de terapia privativa hormonal para pacientes con cancer de próstata. Su efecto principal es la supresión de la regulación de la LH hipofisaria, pero también aumenta la síntesis de

TeBG en el hígado, disminuyendo por tanto la cantidad de testosterona biodisponible. Además los estrógenos inhiben la 5 α -reductasa, interfieren el enlace de la testosterona y la DHT con el receptor androgénico, e inhiben la ADN polimerasa. No existe la evidencia de un efecto citotóxico directo en la célula.

El DES (Diethylstilbestrol) administrado por vía oral, es la preparación estrogénica activa más ampliamente utilizada. Su uso reduce la testosterona sérica a niveles de castración (CITRIN y col., 1985).

El fosfato de Estrasmutina combina los efectos hormonales de los estrógenos, con una actividad citotóxica específica, sin embargo, el mecanismo exacto de actividad de la estrasmutina no está totalmente dilucidado; ensayos clínicos recientes no indican ninguna ventaja de este tratamiento frente al DES.

.Agonistas LHRH (GnRH): desde la determinación de la secuencia de aminoácidos de la GnRH, se han producido una serie de análogos sintéticos con igual o mayor actividad que los naturales. Por ejemplo, el reemplazo de la 6-glicina por leucina aumenta fuertemente la potencia.

La administración de dosis elevadas a corto plazo de un análogo, produce un aumento de LH y consecuentemente de testosterona sérica, sin embargo, el tratamiento a largo plazo termina con una marcada supresión de la secreción de LH,

debido tanto a autoregulación de los receptores GnRH de la hipófisis, como a otros acontecimientos post-receptoriales. Estos acontecimientos hacen a la hipófisis refractaria a una posterior estimulación por la GnRH, suprimiendo la secreción de LH y eventualmente disminuyendo la testosterona plasmática a niveles de castración.

El efecto estimulante inicial de los análogos GnRH termina con el llamado "fenómeno de flare" (LABRIE y col., 1982). El pretratamiento con distintos compuestos antiandrógenos, tanto como con DES, evitan eficazmente el "fenómeno flare" mediante el bloqueo independiente de la regulación de la LH (DES), o por bloqueo de la acción de la testosterona cuyos niveles se encuentran incrementados en los tejidos (antiandrógenos).

Los análogos GnRH mantienen los niveles plasmáticos de testosterona en el mismo rango que cuando existe castración, durante toda la terapia. Los más usados son: la Leuprolida que fue el primer análogo GnRH estudiado en ensayos clínicos al azar, la Buserelina y la Nafarelina (GLODE y col., 1987; LABRIE y col., 1987; DE VOOGT y col., 1990).

.Ketoconazol: es un compuesto imidazólico dioxolano sintético muy utilizado como agente antifúngico. El desarrollo de ginecomastia en pacientes tratados con Ketoconazol condujo al descubrimiento de que la droga afecta a la biosíntesis de la

testosterona. Específicamente inhibe la síntesis del andrógeno, tanto en testículo como en la glándula adrenal, por bloqueo del sistema citocromo P-450, de la liasa C14-20, responsable de la conversión de pregnolona en 17-hidroxiprogesterona, y del paso de la 17,20 dehidroxiprogesterona a andrógenos. El efecto depende de la dosis y es reversible después del cese del tratamiento. La LH plasmática aumenta como resultado de la disminución de la testosterona.

La terapia con Ketoconazol debe limitarse por los efectos colaterales; además, su capacidad para mantener la tasa de testosterona sérica a niveles de castración, durante mucho tiempo, ha sido cuestionada, debido a que el bloqueo de la síntesis de andrógenos pueda ser parcialmente contrarrestado con un aumento suplementario de los precursores androgénicos secundarios por progresivo aumento en los niveles plasmáticos de LH; no obstante, la disminución puntual de la testosterona plasmática por la terapia con Ketoconazol y la reversibilidad del efecto, hacen de la droga una preparación válida de uso selectivo. El Ketoconazol no parece producir respuesta significativa en pacientes con cáncer de próstata andrógeno independiente (PONT y col., 1982; JUBELIRER y HOGAN, 1989).

- Antiandrógenos Puros:**. Antagonistas andrógeno receptor:**

La Flutamida es uno de los compuestos más estudiados del grupo de los antiandrógenos no esteroides, que actúan por inhibición del enlace de testosterona y DHT al receptor androgénico. El metabolito activo de la flutamida es un derivado hidroxilado. Los niveles de testosterona plasmática aumentan durante el tratamiento, como resultado de un incremento de la LH plasmática. La producción de andrógenos adrenales no se ve afectada.

El uso de la Flutamida generalmente ha sido en combinación con la castración médica o quirúrgica (bloqueo total de andrógenos). En modelos teóricos, los tratamientos llevados a cabo únicamente con Flutamida, pueden tener limitaciones por el aumento de testosterona en plasma. La ginecomastia se produce en una proporción significativa de pacientes debido a que los efectos de los estrógenos no son contrarrestados en la mama; los efectos colaterales gastrointestinales también son comunes. La Flutamida es eficaz para bloquear el "fenómeno flare" inducido por los agonistas GnRH (SCHRODER, 1990; SCHULZE y SENGE, 1990; DI SILVERIO y col., 1990; GAILLAR-MUGUILEWKY, 1991).

El Anandron ((RU 23098) es un antiandrógeno no esteroide con propiedades

de unión a receptor semejantes a las de la Flutamida. Igual que esta induce a una elevación en la testosterona plasmática, como consecuencia de un aumento de LH. En ensayos clínicos el Anandrón muestra una eficacia similar a la de la Flutamida, tanto solo como en combinación con una castración médica o quirúrgica (RAYNAUD y col., 1984).

El Casodex (ICI 176.334) es un nuevo compuesto no esteroide, inhibidor competitivo del receptor androgénico. Estudios preliminares sugieren que este agente es activo sólo en tejidos periféricos y no va asociado con un aumento de LH o testosterona (FURR, 1989).

Un nuevo antagonista de receptor androgénico esteroide, el Win 49,596, está siendo sometido a ensayos preclínicos. Dosis altas de Win 49,596, aumentan la testosterona plasmática en perros y en ratas (WINNEKER y col., 1990).

. Inhibidores de la 5 α -reductasa : se observó un síndrome de deficiencia de 5 α -reductasa, secundario a un daño en la producción de DHT en los tejidos andrógeno dependientes. Estas enzimas actúan selectivamente a nivel de los tejidos diana evitando la conversión de testosterona en DHT. Un inhibidor , el 4MA, produce disminución de la tasa de crecimiento de tumores andrógeno-dependientes en modelos animales (ANDRIOLE y col., 1987).

La importancia de la 5 α -reductasa en el metabolismo de los andrógenos que intervendrían en el desarrollo del cáncer de próstata no está claro. Los niveles de testosterona en el plasma no se modifican por acción de los inhibidores de la 5 α -reductasa, y las células tumorales pueden continuar su desarrollo con un soporte único de testosterona.

Actualmente se están realizando pruebas clínicas preliminares con inhibidores selectivos de la 5 α -reductasa, como el Finasteride, obteniéndose resultados esperanzadores. El uso de compuestos que poseen, tanto propiedades antagonistas andrógeno-receptor, como de inhibidores de 5 α -reductasa, es preferible al uso de inhibidores selectivos de la 5 α -reductasa (NEUMANN, 1987).

- Agentes con mecanismos de acción mixtos:

. Progestágenos: varios agentes progestágenos incluidos el Acetato de Megestrol, la Hidroxiprogesterona y la Medrogestone, se utilizan para el tratamiento del cáncer de próstata. Los progestágenos inhiben la secreción hipofisaria de la LH, con la consecuente disminución de testosterona y DHT plasmáticas; además, los agentes progestágenos presentan una actividad antagonista de los receptores androgénicos . El acetato de Megestrol ha producido una respuesta parcial en algunos pacientes, no obstante, aparece un aumento en la LH y la testosterona plasmática (GELLER y col., 1978).

. Acetato de Ciproterona: es un esteroide antiandrógeno que no solamente compite con la testosterona y la DHT por el receptor androgénico, sino que también posee propiedades progestágenas, glucocorticoideas y de supresión parcial de LH (NEUMANN, 1977 y 1987; NEUMANN y col., 1990; GOLDEMBERG, 1991).

- Supresión Adrenal:

El entusiasmo inicial por la adrenalectomía bilateral para el tratamiento del carcinoma de próstata, esta siendo reconsiderada pues su eficacia es mínima; además puede ser reemplazada por una terapia médica (SHULZE y col., 1987).

Entre los fármacos utilizados en la supresión de los andrógenos adrenales tenemos:

. Ketoconazol: como anteriormente mencionamos, bloquea el sistema citocromo P-450, e inhibe de la producción de andrógenos adrenales y testiculares (PONT y col., 1982).

. Aminoglutemida: bloquea el sistema citocromo P-450 mediante reacciones de hidroxilación, que incluyen la conversión de colesterol en pregnolona y la hidroxilación de los esteroides C21, C11 y C18. Esta droga, en los años 60, fue usada como anticonvulsivante, pero se retiró del mercado por producir

en algunos pacientes una insuficiencia adrenal. En el cáncer de próstata es usada en combinación con Hidrocortisona, para prevenir la insuficiencia adrenal; así, algunos de los efectos clínicos observados pueden ser atribuidos más a la hidrocortisona que al bloqueo de la producción de andrógenos por las adrenales (PLOWMAN y col., 1987).

. Spironolactona: también inhibe el sistema enzimático citocromo P-450, en los testículos y en las adrenales, pero no es tan efectiva como la Aminoglutemida o el Ketoconazol para inhibir la producción de andrógenos adrenales (BABA y col., 1978).

- Bloqueo Androgénico "Total":

La combinación de la castración médica, con la quirúrgica y con la inhibición de los receptores androgénicos periféricos se denomina bloqueo androgénico "total". La castración médico-quirúrgica bloquea los niveles de andrógenos adrenales que pueden estimular las células cancerígenas prostáticas (SCHULZE y col., 1987; NEUMANN y col., 1990; DE VOOGT y col., 1990). Aunque la importancia de los andrógenos adrenales, es aún controvertida, pruebas clínicas realizadas con Leuprolida más Flutamida,, demostraron una ligera ventaja con respecto a tratamientos con Leuprolida sola (GELLER y col., 1978; IMAI y col., 1990).

II.3. ACETATO DE CIPROTERONA

II.3.1.- FARMACOLOGIA

II.3.1.1.- Introducción

El efecto antiandrogénico del acetato de ciproterona (AC) fue descubierto en 1962. Inicialmente, este esteroide era usado como progestágeno. Durante una prueba de las propiedades potenciales de virilidad en ratas, se descubrió que este compuesto no virilizaba a los fetos femeninos, pero si feminizaba a los fetos masculinos, con ausencia de todos los grados de diferenciación sexual andrógeno-dependientes (NEUMANN, 1987).

Sobre esta base se descubre que el AC puede inhibir la biosíntesis de andrógenos en los testículos del feto y la acción de estos en los órganos diana. Todo esto se corrobora con estudios posteriores de Junkman and Neuman (1964) y comienza a usarse clínicamente como antiandrógeno (NEUMANN y TÖPERT, 1986; NEUMANN, 1987).

II.3.1.2.- Estructura Química:

Químicamente el AC es un derivado de la hidroxiprogesterona. Su acción antiandrogénica se debe a la sustitución del radical metilo en la posición 1 y 2 de la molécula del esteroide. Aunque se han desarrollado un gran número de derivados con potencia antiandrogénica, ninguno puede equipararse al AC (NEUMANN y col., 1982; NEUMANN, 1987) (FIGURA II.1).

Los alcoholes libres derivados de la hidroxiprogesterona carecen de propiedades progestágenas, pero tienen actividad antiandrogénica, aunque con menos potencia que el AC. Esto también ocurre con otros derivados alcohólicos del AC; en contraste con ellos, el AC, posee propiedades progestágenas y antigonadotróficas, es un antiandrógeno puro, igual que los antiandrógenos no esteroides (GAILLARD, 1991; IMAI, 1990).

Inicialmente, las propiedades progestágenas y antigonadotróficas del AC fueron consideradas como una desventaja para el uso de un antiandrógeno; posteriormente esta opinión fue cambiando, al demostrarse que este espectro de actividades eran ventajosas en muchas de las indicaciones del AC (NEUMANN y TÖPERT, 1986; Mc CONNELL, 1991).

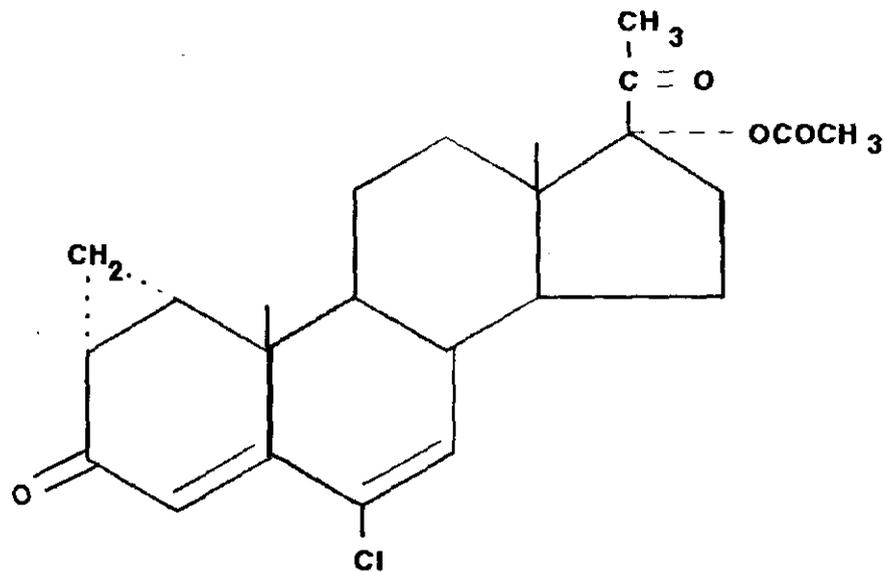


FIGURA II.1.- Fórmula semidesarrollada del acetato de ciproterona.

II.3.1.3.- Mecanismo de Acción:

El control neuroendocrino, de la función gonadal, lo observaremos en la FIGURA II.2.

La síntesis de testosterona por las células de Leydig del testículo es estimulada por LH de la hipófisis, y el 90 % o más de la DHT es sintetizada en la próstata; el resto de la testosterona es aportada en pequeñas cantidades por las glándulas adrenales y los andrógenos de la dieta. La testosterona sérica, por un sistema de retroalimentación negativa, regula a través del hipotálamo, que segrega GnRH, la liberación de LH (FIGURA II.2).

La actividad predominante del AC es la inhibición de los andrógenos, principalmente testosterona y DHT, por bloqueo competitivo de sus receptores, a nivel de las células diana (BROWN y col., 1981; NEUMANN y col., 1982).

Después de administrar este fármaco, disminuye fuertemente la concentración del DHT en los receptores nucleares androgénicos. El AC no tiene efecto sobre la conversión de testosterona en DHT por la 5 α -reductasa, no obstante, el bloqueo de la DHT produce a nivel nuclear la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, que conduce a una reducción de la síntesis de proteínas, un aumento de la autofagitación y muerte celular (GOLDENBERG y BRUCHOVSKY, 1991). En cánidos y roedores

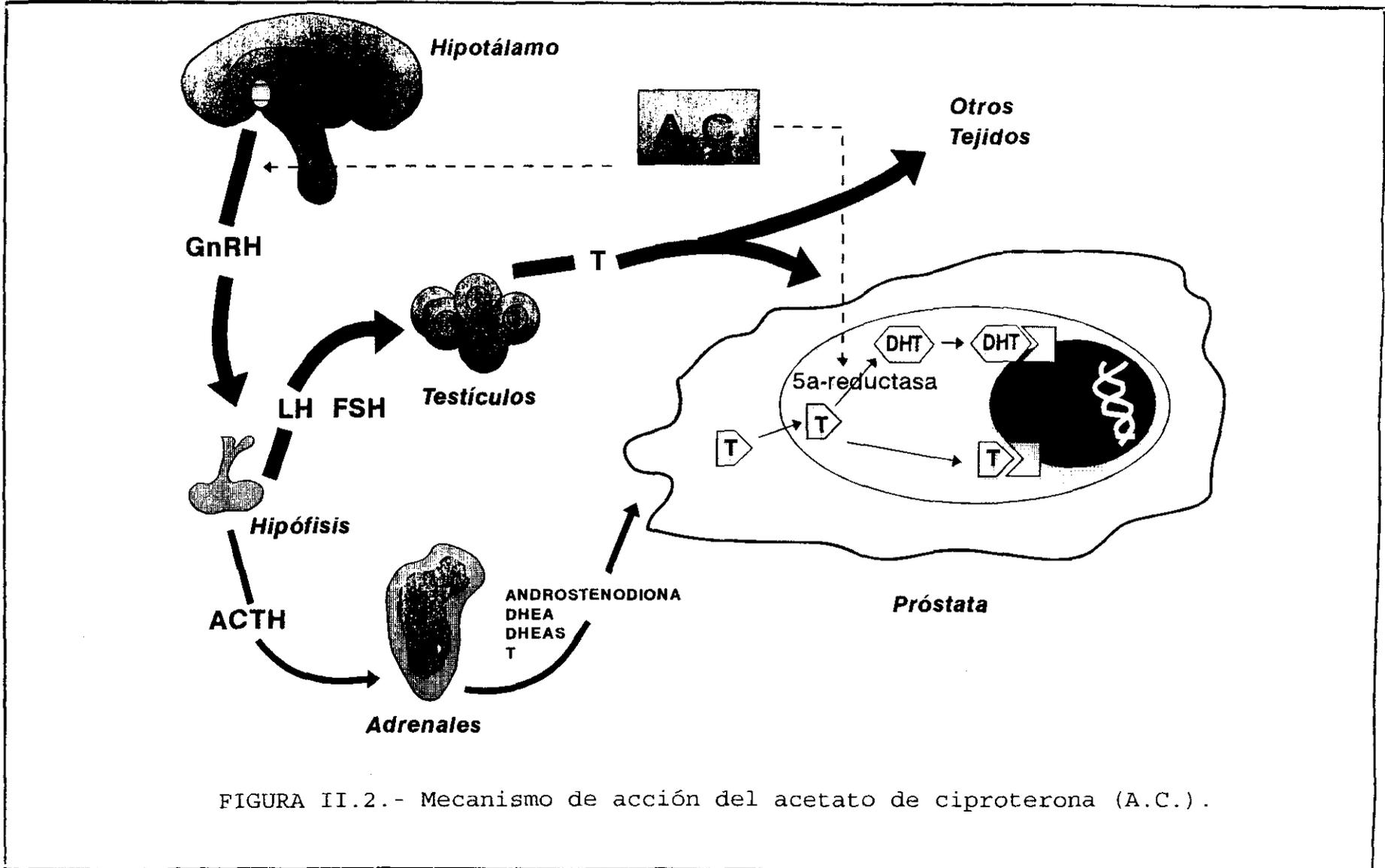


FIGURA II.2.- Mecanismo de acción del acetato de ciproterona (A.C.).

de experimentación, el AC da lugar a la pérdida total de la actividad secretora de la próstata y una reducción de su tejido.

Estudios histológicos de este tejido procedente de perros tratados, demuestran la desaparición casi completa del epitelio con un incremento aparente de los componentes estromales (NEUMANN y col., 1985).

El AC, por su actividad semejante a la progesterona, produce también la inhibición de la retroalimentación negativa hipotálamo-hipofisaria. El resultado es una supresión de GnRH; consecuentemente disminuiría la secreción de LH y la producción de andrógenos por los testículos.

II.3.1.4. Farmacocinética:

Existe una gran diferencia en la cinética de este fármaco entre las distintas especies animales y el hombre (DÜSTERBERG y col. 1981, DÜSTERBERG, 1984).

La absorción en el tracto gastrointestinal es completa, si se la utiliza en suspensión microcristalina. La absorción parenteral (subcutánea e intramuscular), también es muy buena en solución oleosa, prolongándose el tiempo de absorción.

La biodisponibilidad es muy alta, porque el AC es una sustancia muy lipofílica; es de casi el 100 % en el hombre (BECKER y col., 1980); lo mismo ocurre en el mono Rhesus (91 %) y en la rata (100%), siendo en el perro beagle un poco más baja, de alrededor del 75% (DÜSTERBERG, 1984).

La metabolización y la excreción es muy lenta. En el hombre la semivida (después de la administración oral) es de 48 ± 9.6 horas (HÜMPEL y col., 1977a y 1977b), en la rata y el mono Rhesus de 25 ± 6.4 horas y en el perro beagle de 109 ± 42 horas; en estas tres últimas especies tras administración IV (DÜSTERBERG y col., 1981). La excreción se realiza fundamentalmente en las heces y en la orina.

II.3.1.5.- Propiedades Farmacológicas:**- Propiedades antiandrogénicas y sus efectos sobre la diferenciación sexual de los machos:**

Con pocas excepciones, el AC inhibe la acción exógena y endógena de todos los receptores androgénicos en los distintos órganos, incluyendo la próstata, las vesículas seminales, los testículos y los vasos deferentes; antagoniza en menor grado los efectos sexo-específicos de los andrógenos, por ejemplo la osificación del cartílago epifisario, las funciones de las glándulas sebáceas y la densidad de la piel. Además inhibe los procesos andrógeno-dependientes de la diferenciación sexual en machos (NEUMANN, 1977 y 1987).

El efecto feminizante de los fetos masculinos es un riesgo en hembras preñadas que son tratadas con contraceptivos que contienen AC (MURAD y HAYNES, 1982).

Dosis altas de antiandrógenos durante la gestación dan como resultado una forma muy particular de intersexualidad. Las gonadas están presentes pero no el tracto sexual interno y sus glándulas accesorias (próstata, vesículas seminales, etc...) (BHIWGADE y col. 1990). Los genitales externos sufren una diferenciación femenina, incluyendo una rudimentaria vagina. Esta intersexualidad ocurre

espontáneamente en hombres y es conocida como "feminización testicular" o "mujer peluda" (MURAD y col., 1982; NEUMANN, 1987).

- Propiedades Progestágenas:

La potencia progestágena del AC es importante clínicamente tanto en hembras como en machos no orquiectomizados.

El AC es uno de los progestágenos más efectivos del grupo de los derivados de la hidroxiprogesterona y tiene los mismos efectos que la progesterona (NEUMANN, 1987; SCIARRA y col., 1990).

En el siguiente cuadro se muestran algunos de los efectos progestágenos típicos del AC en distintas especies animales (NEUMANN, 1987):

TEST	EFEECTO
Test de Clauberg (conejo)	Transformación endometrial
Test de Clauberg (cánido)	Transformación endometrial
Mantenimiento de la preñez en ratas castradas	Mantiene la preñez en combinación con estrógenos
Retraso de la implantación (conejo)	Implantación retrasada
Parto (rata)	Inhibición del parto
Inducción permanente al estro (rata)	Interrupción permanente del estro

En el test de Clauberg se observó un efecto depot en el AC administrado por vía subcutánea. Esto hay que tenerlo en cuenta en las terapias con dosis altas, en los casos de hirsutismo y en otras aplicaciones clínicas de este compuesto.

- Propiedades Antiestrogénicas:

En distintas puebas farmacológicas se demuestran los efectos antiestrogénicos del AC, que están relacionados con sus propiedades progestacionales.

Produce supresión del estro permanente en ratas inducido experimentalmente con estrógenos. En ratonas castradas, los estrógenos reducen el contenido de ácido siálico en vagina; estos cambios son comparables a la secreción cervical bajo la influencia de los estrógenos. La administración de progestágenos produce una mucificación del epitelio vaginal y un incremento en el contenido de ácido siálico, como consecuencia del aumento de la mucina. Esto también se ha demostrado experimentalmente con el AC (NEUMANN, 1987).

- Propiedades Antigonadotróficas:

Al igual que otros progestágenos, el AC tiene efectos antigonadotróficos, más notables en hembras que en machos, pero con dosis más elevadas.

La inhibición de la ovulación, es un claro ejemplo de la actividad antigonadotrófica (SCIARRA y col., 1990; WILLIAMS, 1990).

- Propiedades Glucocorticoideas:

El AC y otros compuestos esteroides, tienen propiedades semejantes a los glucocorticoides (NEUMANN, 1987), por ejemplo, el peso de las adrenales y del timo disminuyen en ratas y en otras especies de animales de laboratorio. La atrofia adrenal es debida a reducción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) dando como resultado una disminución de la síntesis y secreción de glucocorticoides; por otra parte, no tiene propiedades antiinflamatorias (test del granuloma), ni antialérgicas (test de eosinófilos). Todo esto, demuestra que el AC y otros antiandrógenos similares, solamente presentan algunas propiedades de los glucocorticoides, pero no se aprecian signos de insuficiencia adrenal secundaria.

Clínicamente hay que tener en cuenta estos efectos glucocorticoideos del AC, en los tratamientos con dosis altas que se aplican en los casos de pubertad precoz (NEUMANN, 1977;, GIRARD y col., 1978a y 1978b).

- Importancia del espectro de actividades endocrinas para el uso clínico en machos:

Los antiandrógenos puros, que no tienen actividad progestágena y antigonadotrófica, como la Nilutamida y el Flutamide, ejercen una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo; esto produce un incremento de gonadotropinas por la hipófisis (LH y FSH) y en consecuencia un aumento de la biosíntesis de andrógenos, que suprimirían total o parcialmente el efecto de los antiandrógenos puros mencionados. Por eso se buscan antiandrógenos con actividades endocrinas más amplias, es decir, progestágena y antigonadotrófica, que bloqueen al eje hipotálamo-hipofisario, como el AC. No obstante para que se produzca el efecto antigonadotrófico hacen falta dosis altas tanto en animales como en hombres (KNUTH y col., 1984).

Los antiandrógenos que presentan también actividad progestágena y antigonadotrófica son los más apropiados para usarse en tratamientos sistémicos y de larga duración en machos no castrados (NEUMANN, 1987; SCHRODER, 1990; GAILLARD y MOGUILWY, 1991).

II.3.2.- USOS CLINICOS DEL ACETATO DE CIPROTERONA

II.3.2.1.- Problemas de Próstata:

- Cáncer de Próstata:

Aunque no se conoce la etiología del cáncer de próstata, en trabajos iniciales se descubrió, que el desarrollo de los carcinomas andrógeno dependientes se produce en períodos más cortos de tiempo. Privando de andrógenos a los pacientes ocurría un alargamiento en el proceso; por todo ello es el principal tratamiento de metástasis de cáncer de próstata inoperable; cerca del 70% de los pacientes sufrirían una subjetiva mejoría de los síntomas. La orquiectomía y la terapia con estrógenos son el procedimiento clásico de privación de andrógenos (GELLER y col., 1978).

Teóricamente la terapia con antiandrógenos sería mejor que los métodos clásicos de privación de andrógenos, porque potencialmente da lugar a una menor cantidad de efectos secundarios en comparación con los estrógenos y elimina los efectos de los andrógenos adrenales (GELLER y ALBERT, 1985; NEUMANN, 1987; STUDER y MUNCH, 1990; ROSEMBERG y VON ESCHENBACH, 1990; GOLDEMBERG, 1991).

Los efectos del AC sobre una próstata normal son semejantes a los de una castración quirúrgica. La actividad de secreción y proliferación cesa completamente. Las características de las enzimas (por ejemplo la ácido fosfatasa) y los constituyentes de la próstata (zinc) no muestran cambio alguno (DALESIO, 1990; STUDER y MUNCH, 1990).

Algunos autores recomiendan combinar un agonista del GnRH con un antiandrógeno (RAYNAUD y col., 1984; NEUMANN y TOPERT, 1986; IMAI y col., 1990; WILLIANS, 1990; DE VOOGT y col., 1990). La razón de esto es la siguiente: con la castración química con agonistas de GnRH (por aumento de LH hasta refracción de la hipófisis) suprimimos los andrógenos testiculares y con el antiandrógeno eliminamos los restantes andrógenos producidos por las adrenales; no obstante, no está demostrado si los andrógenos adrenales (eliminados los andrógenos testiculares) pueden causar progresión del tumor (GELLER y ALBERT, 1985; MIJAIN y col., 1990). Es importante considerar si es mejor el uso del AC o de un antiandrógeno puro del tipo de la Flutamida para la terapia combinada (DI SILVERIO y col., 1990; SCHULZE y SENGE, 1990; GAILLARD-MOGUILEWSKY, 1991).

Experimentalmente en ratas está demostrado que en la fase inicial del tratamiento se produce un gran incremento de la concentración de LH y de testosterona cuando aplicamos una terapia combinada de análogos de GnRH con un

antiandrógeno puro, pero no cuando lo combinamos con AC, por la actividad progestágena/antigonadotrófica de este último fármaco (NEUMANN y col., 1985; DI SILVERIO y col., 1990; DE VOOGT y col., 1990).

Esto fue demostrado en una experiencia con pacientes voluntarios. El incremento inicial de LH y testosterona después del tratamiento con análogos de GnRH es pequeño cuando el individuo es pretratado durante una semana con AC (GOLDEMBERG, 1991).

Estos efectos de los antiandrógenos puros sobre la LH y la testosterona duran 3 semanas cuando el tratamiento se combina con análogos de la GnRH; pasado este tiempo comienza la regulación del receptor GnRH y los antiandrógenos puros no son capaces de prolongar la estimulación de la secreción de LH y testosterona. Así en principio un tratamiento con un antiandrógeno puro del tipo de la Flutamida y un antiandrógeno del tipo del AC, en combinación con un agonista del GnRH sería equivalente. En el caso de un agonista GnRH combinado con un antiandrógeno puro, llevaría más tiempo aparentemente la supresión completa de los andrógenos, porque los niveles de LH y testosterona en el suero inicialmente estarían muy elevados (LABRIE y col., 1987; SHULZE y SENGE, 1990; DI SILVERIO y col., 1990).

El primer caso registrado del uso del AC, fue publicado por Scott y Schirmer (NEUMANN, 1987)). Ellos describen el efecto del AC en un paciente con un cáncer

de próstata con metástasis y mucho dolor. El dolor desaparece y el paciente recupera peso.

Motivados por esta respuesta, Scott y Schirmer realizaron un estudio con diez pacientes; ninguno fue tratado con hormonoterapia ni orquiectomizado. Cinco dieron una buena respuesta y en tres hubo un fracaso total. Pero con una terapia con estrógenos tampoco hubo respuesta en estos últimos pacientes. Geller (NEUMANN, 1987) realizó estudios similares usando dosis altas de 250 mg de AC. En uno de estos estudios nueve de once pacientes presentaron una respuesta favorable, objetiva, con descenso del dolor, aumento del apetito y una mejoría general (NEUMANN, 1987; RASMUSSEN, 1990).

Después de revisar otros estudios como los anteriores donde se evalúa la efectividad del AC y se compara con la terapia con estrógenos, los resultados confirman que el tratamiento con estrógenos es tan efectivo como con AC, pero la diferencia radica en que el AC no tiene tantos efectos secundarios como los estrógenos; por ejemplo, la ginecomastia o los problemas cardiovasculares (STUDER y MUNCH, 1990; ROSEMBEURG y VON ESCHENBACH, 1990; GOLDEMBERG, 1990).

El AC es una terapia muy útil en el cáncer de próstata avanzado, y una alternativa tan eficaz como otros métodos de supresión de andrógenos, con la ventaja

de dar lugar a menos efectos secundarios (NEUMANN, 1987; DALESIO, 1990; EATON y GRIFFITHS, 1990; NEUMANN y col., 1990; KOELOWSKY y col., 1991).

- Hiperplasia prostática benigna:

Estudios piloto en un pequeño número de pacientes demostraron que el AC es posible que mejore el flujo urinario. El efecto parece ser debido a la inhibición de componentes del epitelio de la hiperplasia benigna de próstata. Esta enfermedad parece primariamente de origen estromal; la terapia con antiandrógenos únicamente, no sería muy eficaz. Sería mejor una combinación de AC y un antiestrógeno, porque el crecimiento estromal se debería a los estrógenos y el epitelial a los andrógenos (NEUMANN, 1987; Mc CONNELL, 1990; SIKES y col., 1990).

II.3.2.2.- Alteraciones cutáneas inducidas por andrógenos:**- Acné y seborrea oleosa:**

Se ha demostrado en hombre y en varias especies animales como rata, ratón, hamster dorado y conejo, que los andrógenos estimulan el desarrollo y la actividad de las glándulas sebáceas. El número y tamaño de estas glándulas decrecen después de la castración (NEUMANN, 1987).

Antes de comenzar la pubertad, las glándulas sebáceas presentan poco desarrollo y pequeña diferenciación. Su tamaño y actividad se incrementan solamente durante la pubertad, cuando se aumenta la producción de andrógenos que ocurre tanto en machos como en hembras (AMER y col., 1985; CUNLIFFE, 1985; NEUMANN, 1987).

No hay duda de que el incremento de la actividad de las glándulas sebáceas es una causa primaria del acné y de la seborrea. La cornificación del infra-infundíbulo que precede a la formación de la espinilla es consecuencia del incremento del sebo. La infección bacteriana del acné es el último eslabón de esta cadena de eventos (POCHI y STRAUSS, 1974; PLEWIG, 1974). La cornificación del infra-infundíbulo produce alteraciones en el drenaje de la secreción y la formación de espinillas sería andrógeno-dependiente (AMER y col., 1985;

CUNLIFFE, 1985).

Es sabido que el contenido de lípidos de la piel está incrementado en el paciente con acné. Es altamente significativa la correlación existente en ambos sexos entre los niveles de secreción sebácea y la gravedad del acné. El incremento en el metabolismo de los andrógenos en piel especialmente por el aumento de la enzima 5α -reductasa, también influye en el desarrollo del acné. (LUDERSCHMIDT y PLEWIG, 1977).

En base a estos conocimientos, parece natural el empleo de antiandrógenos en el tratamiento de esta enfermedad. El efecto inhibitorio del AC sobre las glándulas sebáceas ha sido demostrado en distintas experiencias usando varias especies animales como ratón, rata, hamster, conejo y también en hombre y mujer (HAMMERSTEIN, 1975; CUNLIFFE, 1985; AMER y col., 1985, GREENWOOD y col., 1985).

El efecto inhibitorio del AC sobre las glándulas sebáceas ha sido confirmado en el hombre; en primer lugar se midió la secreción sebácea en machos hipersexuales tratados con este fármaco (BURTON y col., 1973) y en voluntarios sanos (NEUMANN, 1987). En este estudio, se administraron 100 mg de AC por día por vía oral durante 20 días; la tasa de secreción sebácea disminuyó un 60%.

En base a los estudios realizados experimental y clínicamente, se desarrolló una preparación con propiedades anti-acné y contraceptiva simultaneamente, porque el AC (antiandrógeno, progestágeno, antigonadotrófico) demostró ser una terapia eficaz para evitar la concepción (ERKOLA y col., 1990).

Hay una preparación clínica que contiene 2 mg de AC en combinación con 50 μg de etinil-estradiol (DIANE), que se utiliza con fines anticonceptivos en problemas de ovarios poliquísticos, acné y en androgenización de mujeres, con muy buenos resultados (HAMMERSTEIN, 1980; RAJ y col., 1982; AYDINLIK, 1987; VERMEULEN y RUBENS, 1988). Para reducir los efectos colaterales se disminuyó la dosificación del componente estrogénico y apareció un nuevo producto con 35 μg de etinil-estradiol (DIANE 35) (FALSETTI y col., 1986; AYDINLIK, 1987; PREVELIC y col., 1989 y 1990).

- Hirsutismo y Alopecia Androgénica:

En varios estudios se ha demostrado que existe una elevada concentración de andrógenos en suero de mujeres con hirsutismo idiopático (NIELSEN, 1985; PEDERSEN y col., 1985; RABOCH y col., 1990; STULBERG y CARUTHERS, 1990; MARCONDES y col., 1990; SCHINDLER, 1990). Los andrógenos son parte activa en la etiología del hirsutismo, entonces parece razonable asumir que los antiandrógenos serían adecuados para la terapia sintomática de esta enfermedad y de

la alopecia androgénica (NEUMANN, 1987). La presencia de andrógenos y una apropiada disposición genética son necesarias para el desarrollo de la alopecia androgénica (RAMSAY y RUSHTON, 1990).

II.3.2.3.- Pubertad Precoz

La etiología de esta enfermedad es desconocida. La pubertad precoz idiopática en humanos comienza antes de los 6 años en niñas y 8 años en niños. Dos problemas predominan en la terapia de esta enfermedad; por un lado, la madurez sexual a tan poca edad dificulta la integración social, y por otro produce una reducción final de la estatura de estos chicos. Aunque inicialmente su tamaño es mayor que el de los niños de su misma edad, más tarde no llegan a sobrepasar los 150 cm de altura (CHAUSSAIN y col., 1988; KHANDEKAR y DASH, 1990).

La pubertad precoz ha sido retrasada con tratamiento de AC, al mismo tiempo, el efecto estimulante de los andrógenos sobre la osificación de los cartílagos epifisarios es inhibido y por tanto la fase de desarrollo del hueso se prolonga (NEUMANN, 1977).

Bajo el tratamiento con AC , el desarrollo prematuro somático y psicosexual se suprime por el efecto antiandrogénico periférico y antigonadotrófico central de la droga. Decrece el grado de desarrollo y la maduración del hueso, mejorando el pronóstico de la enfermedad. También previene el crecimiento del vello axilar y púbico (TANAKA y col., 1990; KHANDEKAR y DASH, 1990).

En niñas, disminuye el desarrollo mamario, no se produce la cornificación

del epitelio vaginal, ni la aparición del período menstrual. En niños, disminuye el tamaño de los testículos y del pene. La polución nocturna y la masturbación se suspenden (GIRARD y col., 1978 b; HELGE y KORTH-SCHUZ, 1980; TANAKA y col., 1990).

En general, tanto niñas como niños bajo tratamiento, tienen pocas dificultades de integración social, pueden concentrarse y rendir normalmente en la escuela.

El tratamiento tiene mayores posibilidades de éxito, cuanto más tempranamente se instaure; su duración puede ser de varios años (GIRARD y col., 1978b; HELGE y KORTH-SCHUZ, 1980).

Durante la terapia, se suprime la función gonadal, es inhibida la ovulación y la espermatogénesis. La tolerancia es buena. No se han registrado alteraciones serias en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos. Los efectos secundarios pueden ser: obesidad (por aumento del apetito) y supresión de la función adrenocortical, que es atribuible a su acción glucocorticoidea (inhibición de la secreción de ACTH); no obstante, la insuficiencia adrenocortical no se ha observado (KHANDEKAR y DASH, 1990).

II.3.2.4.- Desordenes sexuales en machos

Mientras el AC no suprime la libido en animales de laboratorio como rata, ratón y hamster, sí lo hace en otras especies, tales como cánidos, cerdos y probablemente en hombre.

El AC induce a la pérdida de la libido y de la erección, seguidos por la imposibilidad de alcanzar el orgasmo, después de 14 días de tratamiento (100 - 200 mg diarios vía oral ó 300 mg semanales vía intramuscular). Al suprimir el tratamiento el efecto es reversible. Esto puede ser descrito como una castración química reversible. El aspecto de la reversibilidad es importante desde el punto de vista de la reinserción social del individuo.

Cuando la dosis es reducida (en general a 50 mg diarios vía oral), las relaciones sexuales con la pareja pueden ser factibles. La terapia disminuye la hipersexualidad agresiva y normaliza las relaciones entre la pareja. El 75 - 80 % de los pacientes responden al tratamiento. El pronóstico es desfavorable en individuos con problemas en la conducción cerebro-espinal. En los pacientes que no responden tampoco es aconsejable la castración quirúrgica.

El AC en general es bien tolerado; como efectos secundarios pueden aparecer: indiferencia, depresión y ginecomastia (NEUMANN, 1987).

III.- MATERIAL Y METODOS

III.- MATERIAL Y METODOS

III.1.- ESTUDIO CRONOTOXICOLOGICO

III.1.1.- MATERIAL.

- Animales.

DL₅₀: se utilizaron un total de 30 ratones (*Mus musculus*) machos, homocigóticos, C57BL/6, cuyos pesos oscilaron entre 22,8 - 24,9 gramos.

Estudio Cronobiológico: se utilizaron un total de 70 ratones (*Mus musculus*), machos homocigóticos C57BL/6, cuyos pesos oscilaron entre 23,2 - 27,9 gramos.

- Alojamiento y Alimentación.

- Jaulas estandar para ratones
- Cámaras Cronobiológicas con programadores de períodos luz-oscuridad, temperatura y humedad.
- Pienso Dieta Rata/Ratón RMM (INTERFAUNA IBERICA).

- Producto.

Acetato de Ciproterona, suministrado como tal producto puro por el laboratorio Schering España S.A.; vehiculizado para su administración en Propilenglicol (PANREAC).

- Instrumental y Material Fungible.

- Granatario (SAUTER MM 160).
- Balanza (METTER AE 160).
- Jeringuillas y Agujas de insulina desechables.
- Algodón hidrófilo.

III.1.2.- METODO

- Cálculo de la DL₅₀

Se utilizaron 30 ratones, con las características mencionadas, que se distribuyeron en 6 lotes (5 animales/lote), de los cuales 5 se utilizaron como problema y uno como control.

El Acetato de Ciproterona fue ensayado a unas dosis de 800, 1000, 1100 y 1200 mg/kg P.V., administrado por vía intraperitoneal a la concentración de 100 mg/ml. Al lote control se le inyectó Propilenglicol por vía intraperitoneal a dosis de 5 ml/kg P.V. Los productos eran administrado a las 10 horas y el período de observación fue de 72 horas.

El método utilizado para el cálculo de la DL₅₀ fue el de Litchfield y Wilcoxon (1949), modificado con la aplicación del ajuste por mínimos cuadrados (STEEL y col.1960). Los datos se procesaron con el programa informático "Pharmacologic Calculation System 4.0" para ordenador compatible.

- Estudio Cronobiológico.**Acondicionamiento de los animales:**

Se utilizaron 70 ratones, con las características mencionadas, distribuidos en 7 lotes (10 animales/lote), de los cuales 6 se utilizaron como problema y uno como control.

Los animales de los lotes problema fueron alojados en las cámaras cronobiológicas, bajo condiciones estandarizadas de temperatura ($24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y de humedad (50 a 55 %).

Las mismas estaban sincronizadas en períodos de luz-oscuridad (LO) de 12 horas (PHILIPPENS, 1976), existiendo un desfase de 4 horas entre una cámara y la siguiente (TABLA III.1). Al lote control se le mantenía en jaula, en idénticas condiciones ambientales y ritmos de luz del animalario.

Los animales de los lotes problema fueron alojados en las cámaras durante los 15 días previos a la prueba, para variar y sincronizar su reloj biológico, y así así tener los animales a "diferentes horas" en un mismo instante . La alimentación y bebida se administraban "ad libitum".

CAMARA	Hora de Encendido:	Hora de Apagado:
nº 1	0	12
nº 2	4	16
nº 3	8	20
nº 4	12	0
nº 5	16	4
nº 6	20	8

TABLA III.1.1.- Horarios de encendido y apagado de la luz en las seis cámaras cronobiológicas, con período de luz-oscuridad de 12 h.

Administración de la DL₅₀:

La DL₅₀ fue administrada por vía intraperitoneal (1023 mg/kg P.V.), a las 10 horas y el período de observación fue de 72 horas.

Análisis de Datos:

Los resultados obtenidos se analizaron por el método COSINOR (HALBERG, 1969), para su estudio cronotoxicológico.

III.2.- ESTUDIO CRONOFARMACOCINETICO

III.2.1.- MATERIAL

- Animales.

Se utilizaron 36 conejos de raza Blanco Gigante Californiano, con unos pesos comprendidos entre 1700 y 2200 gramos.

- Alojamiento y Alimentación.

- Cámaras Cronobiológicas unidas a torres de jaulas de conejos, con programadores de períodos luz-oscuridad, de temperatura y humedad.

- Pienso Dieta Conejo CRB (INTERFAUNA IBERICA).

- Productos.

- Acetato de Ciproterona, suministrado como tal producto puro por el laboratorio SCHERING ESPAÑA S.A.; vehiculizado para su administración en Propilenglicol (PANREAC).

- 17 α -Hidroxiprogesterona (STERALOIDS, INC.).

- Heparina 5% (LEO).

- **Instrumental.**

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (High Performance Liquid chromatography - HPLC):

- . Bomba KONTRON 420.
- . Detector KONTON 742.
- . Integrador SPECTRA-PHYSICS.

- Columna C18 SPHERI-5 RP-8 5 Micron 250 x 4,6 mm
(APPLIED-BIOSYSTEMS).

- Precolumna RP 18 (APPLIED-BIOSYSTEMS).

- Ordenador (IBM PS/1).

- Impresora (HEWLETT PACKARD, LaserJet 4L).

- Centrífuga (HERAEUS).

- Agitador (GRI-CEL).

- Micropipetas GILSON (100, 200 Y 1000 μ L).

- Concentrador de Muestras (TECHNE DB-3A).

- Congelador (ARISTON).

- Equipo de filtración MILIPORE.

- Espectrofotómetro BECKMAN, DU.850.

- Cepas de Conejos.

- Reactivos y Fungibles.

- Cánulas Endovenosas (TERUMO 22gx1").
- Agujas y Jeringas de 1 y 5 ml.
- Filtros de membrana de MILLIPORE G.V. 0,22 μ m.
- Algodón Hidrófilo.
- Acetato de Etilo (PANREAC).
- Acetonitrilo calidad HPLC (PANREAC).
- Agua ultrapura.
- Metanol calidad HPLC (PANREAC).
- Hidróxido de Sodio 2,5 M (PANREAC).
- Helio (ARGON pureza 4,8 %).
- Nitrógeno (ARGON pureza 40%).

III.2.2.- METODO

- Acondicionamiento de los Animales.

Se utilizaron 6 lotes (6 animales/lote) de conejos alojados en cámaras cronobiológicas, bajo las condiciones estandarizadas de temperatura ($24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad (50 a 55 %).

Las mismas estaban sincronizadas en períodos de luz-oscuridad (LO) de 12 horas (PHILIPPENS, 1976), con un desfase de 4 horas entre una cámara y la siguiente (TABLA II.1).

Los animales se introducían en las cámaras en los 15 días previos a la prueba con objeto de variar su reloj biológico y de esta forma facilitar la toma de muestras a "diferentes horas" en un mismo instante. La alimentación y bebida se administraban "ad libitum".

Antes de la realización de cada prueba se depilaban las orejas de los animales, dejando visibles las venas marginales, se colocaba un catéter, fijado con esparadrapo en una de ellas, y se dejaba la otra oreja para la administración del Acetato de Ciproterona.

III.2.2.1.- Administración del fármaco y recogida de muestras

Se administró una dosis de 4 mg/kg de acetato de ciproterona, a partir de una solución de propilenglicol con una concentración de 10 mg/ml.

Los volúmenes de solución administrada a los animales oscilaban entre 0,6 y 0,8 ml, en función de los pesos de los mismos, ya que se partía siempre de una misma solución madre.

La administración se realizaba a las 10 horas, por la vena marginal de la oreja, de forma rápida (< 1 min) y la obtención de muestras de sangre se efectuaba a través del catéter colocado en la vena marginal de la oreja opuesta.

Las muestras de sangre (1 ml) se tomaban en jeringas heparinizadas a los siguientes tiempos post-administración: 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 360 minutos. Posteriormente, la sangre se centrifugaba a 1000 g, durante 10 minutos, para separar el plasma, que era mantenido a -20°C hasta su análisis (< 15 días). Las muestras de plasma conservadas se descongelaban lentamente a temperatura ambiente (25°C) para ser analizadas.

Debido a diferentes problemas durante la administración y extracción de muestras, se eligieron los datos de 5 animales por lote para la comparación de

resultados, excepto en el lote 6 (horas de luz: 20 a 8h) donde sólo se aprovecharon los datos de 4 animales.

III.2.2.2.- Análisis de las Muestras.**Preparación de las Muestras.**

Para detectar el Acetato de Ciproterona en plasma se utilizó un método específico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), descrito por Cannell y col. (1981) y modificado por nosotros.

A 0,25 ml de plasma se le añadían 50 μ l de una solución de 17 α -Hidroprogesterona (75 μ g/ml) como patrón interno (P.I.), 0,25 ml de Hidróxido de Sodio (0,25 M) y 5 ml de Acetato de Etilo. Se agitaba la mezcla durante 5 minutos y se sometía a centrifugación durante 5 minutos a 1000 g. Se extraían 4 ml de sobrenadante y se evaporaban a 40°C en atmósfera de nitrógeno. Las muestras desecadas se reconstituían en 0,20 ml de fase móvil (Acetonitrilo/Agua, 60/40) y se procedía a la inyección en el cromatógrafo.

Análisis Cromatográfico.

Las muestras fueron analizadas en el HPLC, bajo las siguientes condiciones de trabajo:

- Columna C18 SPHERI-5 RP-8 5 Micron 250 x 4,6 mm.
- Elución Isocrática.
- Fase Móvil : acetonitrilo:agua (60:40).
- Flujo : 1,5 ml/min..
- Longitud de onda: 283 nm.
- Atenuación: 32.
- Desgasificación con helio.

La longitud de onda se eligió sometiendo a espectrofotometría una muestra de Acetato de Ciproterona solubilizada en metanol.

La fase móvil era preparada diariamente y sometida a filtración en el equipo MILLIPORE con un filtro G.V. 0,22 μm

En estas condiciones experimentales se estudia:

- Límite de detección alcanzado en el proceso cromatográfico para el Acetato

de Ciproterona, que se calcula con un margen de confianza de 3 veces la desviación típica de las soluciones patrón blancas, según la fórmula:

$$LD = K DT / m$$

donde:

LD: límite de detección (concentración mínima detectable).

K: margen de seguridad (3).

DT: desviación típica de la solución patrón blanca.

m: pendiente de la recta de regresión.

- Linealidad:

. Acetato de Ciproterona; el estudio se hizo en un rango de concentraciones que oscilaban entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de metanol (n=36) (K=6).

. 17 α -hidróxiprogesterona (P.I.); el rango de concentraciones utilizados oscilaba entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de metanol (n=24) (K=4).

Los datos de concentraciones y áreas bajo la curva (ABC) se ajustaron a una recta por regresión lineal.

- Recuperabilidad: se calculó a partir de muestras de plasma de conejo a las que se añadía un pequeño volumen (< 1% de volumen total) de solución concentrada

de Acetato de Ciproterona, para conseguir concentraciones en plasma de 0,1; 1; 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ ($n=24$), y de 17α -hidróxiprogesterona (P.I.), para conseguir concentraciones en plasma de 10, 30 y 50 $\mu\text{g/ml}$ ($n=24$). Las muestras se sometían al procedimiento analítico mencionado. Los valores obtenidos de ABC se comparaban con los obtenidos en solución metanólica y se calculaba el porcentaje de recuperación. Las medias de las 6 recuperaciones obtenidas con cada concentración se sometieron a un test de comparación de medias muestrales.

- Reproducibilidad del ABC cromatográfica: se estudió realizando 6 preparaciones de cada una de las concentraciones elegidas, 2 de cada día, para poder evaluar las variaciones interdía; así mismo, los resultados se sometieron a un test de comparación de medias muestrales.

- Recta de Calibrado: se elaboró a partir del cociente entre el ABC del Acetato de Ciproterona y el P.I. (17α -hidroxiprogesterona), frente a concentraciones de Acetato de Ciproterona en plasma.

Los valores utilizados de Acetato de Ciproterona fueron 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ ($n=36$, $k=6$) y de patrón interno de 30 $\mu\text{g/ml}$.

La cuantificación de los resultados se realizó por interpolación de la recta de calibrado.

III.2.2.3.- Tratamiento Cronofarmacocinético.

Los datos de concentración plasmática del Acetato de Ciproterona obtenidos se ajustaron matemáticamente a ecuaciones poliexponenciales de 1, 2, y 3 exponentes mediante el programa PKCALC (SHUMAKER, 1986).

En primer lugar se trataban los datos de cada conejo por separado. A continuación se obtenía la media y el E.S.M de cada parámetro cinético entre los conejos que componían cada lote.

Los valores de las medias servían como parámetros representativos de los diferentes horarios (0; 4; 8; 12; 16; 20) que a su vez eran comparadas entre sí para observar las posibles diferencias.

Se sometían a un estudio cronobiológico, con objeto de estudiar su posible ajuste a un tipo de ritmo determinado. Se realizaba un ajuste polinomial triexponencial para determinar la existencia de una periodicidad y con el método COSENOR (HALBERG, 1969) se intentaba ajustar a un ritmo circadiano.

III.2.2.4.- Tratamiento estadístico.

Las diferentes pruebas de linealidad del fármaco y del patrón interno y el calibrado de la recta se realizó por ajuste mediante regresión lineal de los datos por mínimos cuadrados.

Todos los resultados se han expresado como media aritmética \pm E.S.M. Para comparar los resultados obtenidos en las distintas pruebas se ha utilizado un test de comparación independiente de medias muestrales, tomando siempre valores de significación $p < 0,05$, y una comparación no paramétrica por la prueba de Mann-Whitney, tomando como límite teórico de U $p < 0,05$.

Los cálculos se realizaron con ayuda de los programas informáticos SIGMA, STAT WORK y COSENOR.

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

IV.1. ESTUDIO CRONOTOXICOLOGICO

IV.1.1.- CALCULO DE LA DL₅₀.

La DL₅₀ obtenida fue de 1,023,72 mg/Kg P.V. (Rangos 917,61 - 1,142,11). La DL₁₆ fue de 903,5 mg/kg y la DL₈₄ fue de 1,159,94 mg/kg de P.V. (FIGURA IV.1)

IV.1.2.- ESTUDIO CRONOBIOLOGICO

El resultados obtenidos tras la administración de la DL₅₀ a los animales de las diferentes cámaras cronobiológicas aparecen en la FIGURA IV.2A.

Los datos se ajustaban de forma significativa ($p < 0,004$) a un ritmo circadiano. La acrofase (ϕ) es de -4 rad (-229°), que corresponde a las 15h 28 minutos. El mesor (M) es de $38,9 \pm 0,13$ y la amplitud (A) de $14,2 \pm 0,18$ (FIGURA IV.2B)

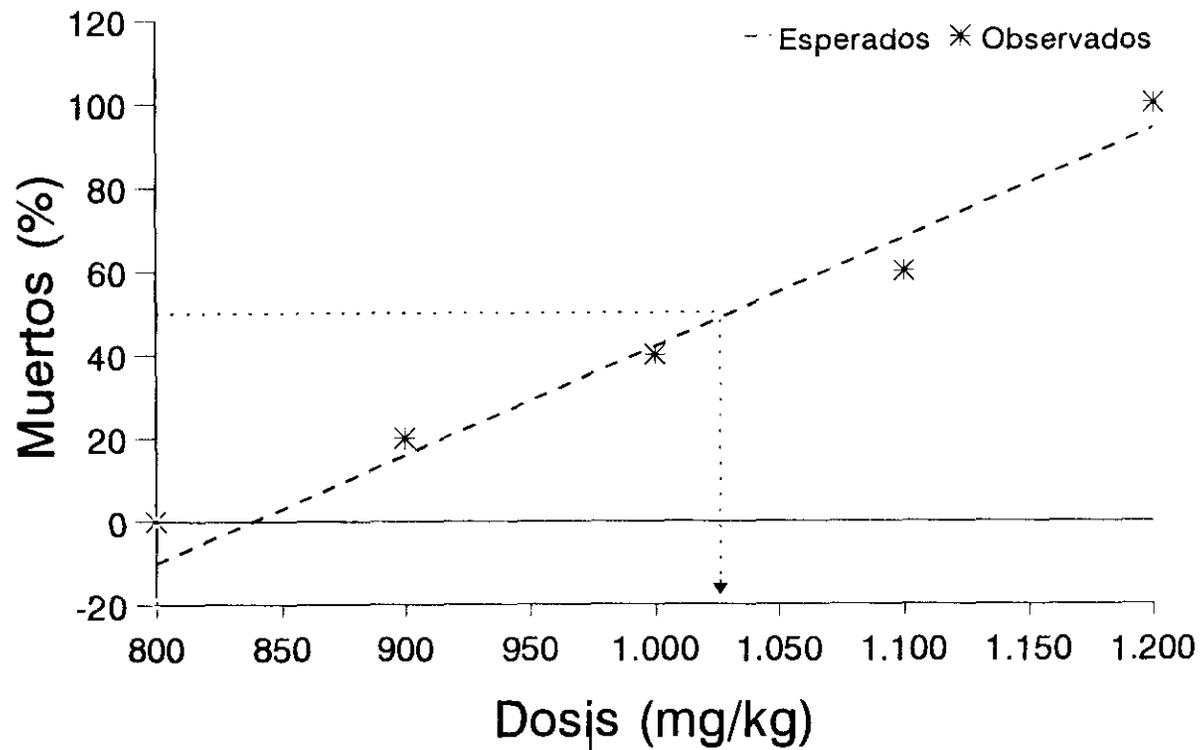


FIGURA IV.1.- Representación del porcentaje de animales muertos en función de la dosis (mg/kg) de acetato de ciproterona. Cálculo de la dosis letal 50 (LITCHFIELD y WILCOXON, 1949).

Tiempo (h)	nº animales muertos	% animales muertos
0	3	30
4	3	30
8	4	40
12	6	60
16	5	50
20	4	40

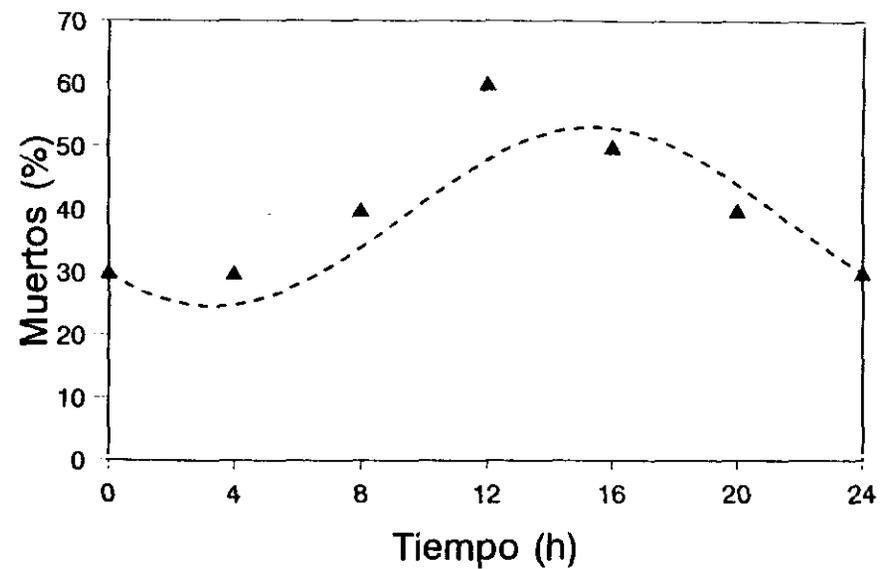


FIGURA IV.2.- Representación del porcentaje de animales muertos en función del tiempo de administración de la DL_{50} (1023,72 mg/kg) de acetato de ciproterona. Ajuste mediante ecuación cosenoidal a un ritmo circadiano (COSINOR).

IV.2.- ESTUDIO CRONOFARMACOCINÉTICO

IV.2.1.- METODO ANALITICO

Con el método cromatográfico utilizado, la 17 α -Hidróxiprogesterona (P.I.) y el Acetato de Ciproterona presentaban un tiempo de retención de $3,55 \pm 0,15$ min y de $4,05 \pm 0,20$ min respectivamente. No interferían entre sí, con los picos de los solventes, ni con los frentes de las muestras biológicas (FIGURA IV.3).

La reproducibilidad del método calculada mediante un estudio estadístico dió como resultado una variación interdía del 4,4%. Los resultados de dicha variación no presentaban diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones testadas ($p < 0,05$).

El límite de detección del Acetato de Ciproterona en plasma, calculado con un coeficiente de seguridad de tres veces la desviación standard del blanco, era de 71 ng/ml .

La recuperabilidad del Acetato de Ciproterona y del patrón interno a partir de muestras de plasma de conejo, utilizando el proceso descrito en el apartado del método, fueron de $80,33 \pm 0,61$ y de $91,09 \pm 1,04$ respectivamente (TABLA IV.1 y IV.2).

Linealidad: en solución metanólica el Acetato de Ciproterona demostró mantener una relación directa y proporcional entre concentración y área bajo la curva entre valores de 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Con los valores de estos parámetros se realizó un ajuste mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, resultando la siguiente ecuación:

$$y = 33469,19 x + 285,54$$

$$y = \text{ABC}$$

$$x = \text{CC}$$

$$r^2 = 0,9978 \quad (p < 0,001) \quad (\text{FIGURA IV.4}).$$

El patrón interno también demostró, en solución metanólica, mantener una relación directa y proporcional entre concentración y área bajo la curva entre valores de 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Con los valores de estos parámetros se realizó un ajuste mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, resultando la siguiente ecuación:

$$y = 1796,87 x + 2016,94$$

$$y = \text{ABC}$$

$$x = \text{CC}$$

$$r^2 = 0,9942 \quad (p < 0,001) \quad (\text{FIGURA DE IV.5}).$$

La recta de calibrado elaborada según el proceso descrito en el apartado del método, resultó tener la siguiente ecuación:

$$y = 0,51 x + 0,02$$

$$y = ABC_{AC}/ABC_{PI}$$

$$x = CC$$

$$r^2 = 0,9788 \text{ (} p < 0,001 \text{) (TABLA IV.3; FIGURA IV.6)}$$

La longitud de onda a la que presentaba la máxima absorbancia, obtenida por espectrofotometría fue de 283 nm (FIGURA IV.7).

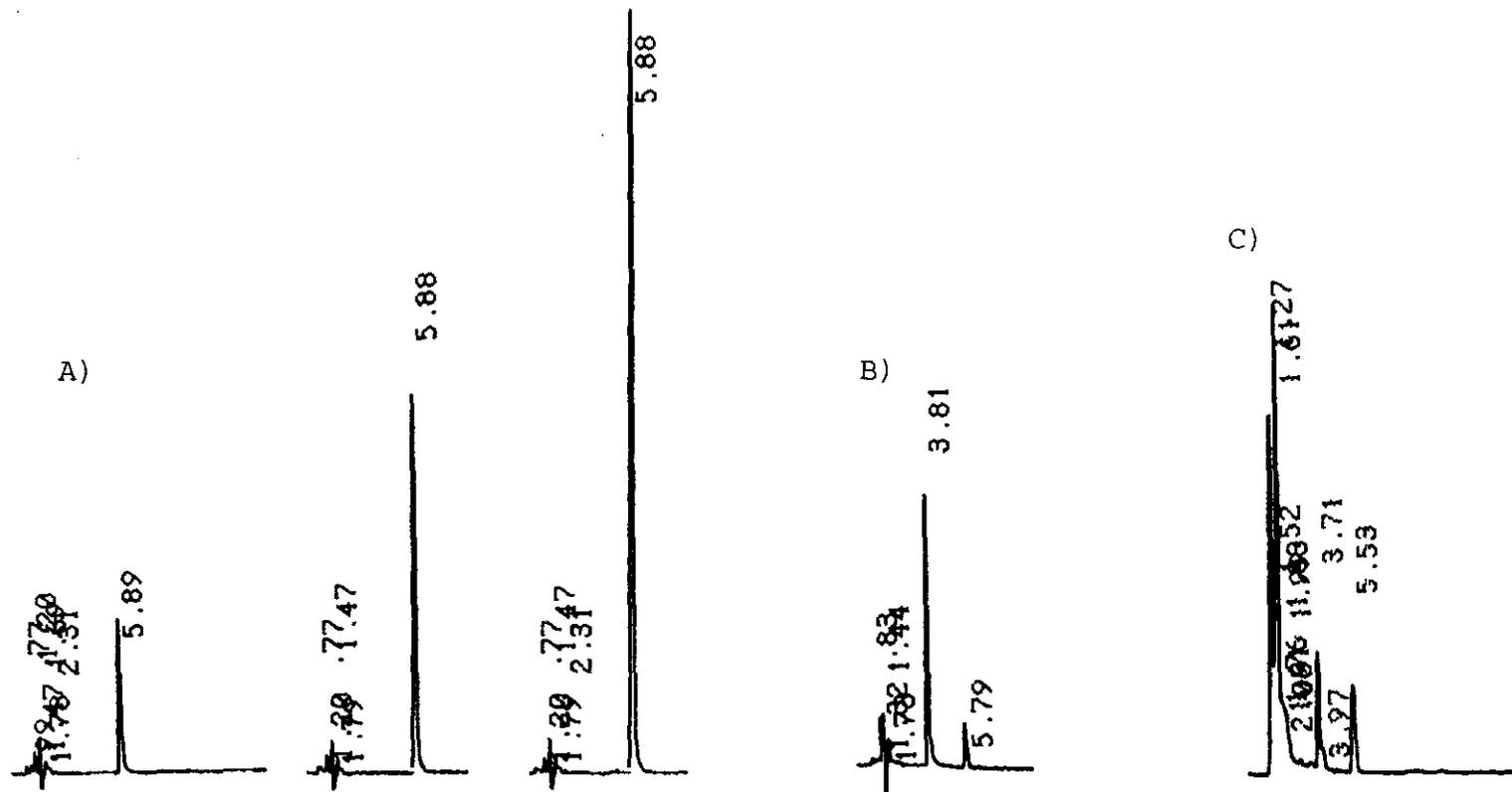


FIGURA IV.3.- Cromatogramas de acetato de ciproterona obtenidos por el método analítico descrito. A) Acetato de ciproterona en solución metanólica (2, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$). B) Acetato de ciproterona (0,5 $\mu\text{g/ml}$) con patrón interno (50 $\mu\text{g/ml}$) en solución metanólica. C) Acetato de ciproterona (1 $\mu\text{g/ml}$) con patrón interno (30 $\mu\text{g/ml}$) en plasma de conejo.

Recuperación de Acetato de Ciproterona (%)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	$\bar{x} \pm \text{E.S.M.}$
0,1	84,33	75,71	80,75	76,38	82,16	80,19	$79,92 \pm 1,35$
1,0	79,64	75,33	80,95	81,13	78,31	82,66	$79,67 \pm 1,05$
5,0	82,72	80,15	83,41	79,39	82,64	80,17	$81,41 \pm 0,69$
					$\bar{x} \pm \text{E.S.M.}$		$80,33 \pm 0,61$

TABLA IV.1.- Recuperación de acetato de ciproterona (%) a partir de plasma de conejo para distintas concentraciones plasmáticas del fármaco (0,1-5,0 $\mu\text{g/ml}$) (Valores individuales, separados por días; media \pm E.S.M.).

Recuperación de 17 α -hidroxiprogesterona (%)							
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	$\bar{x} \pm \text{E.S.M.}$
10	99,63	88,12	94,39	87,94	95,63	93,27	93,16 \pm 1,84
30	94,16	85,23	87,67	91,63	90,21	89,07	89,66 \pm 1,26
50	100,30	91,34	90,63	88,17	85,10	87,28	90,47 \pm 2,17
					$\bar{X} \pm \text{E.S.M.}$		91,09 \pm 1,04

TABLA IV.2.- Recuperación de 17 α -hidroxiprogesterona (%) a partir de plasma de conejo para distintas concentraciones plasmáticas del fármaco (10-50 $\mu\text{g/ml}$) (Valores individuales, separados por días; media \pm E.S.M.).

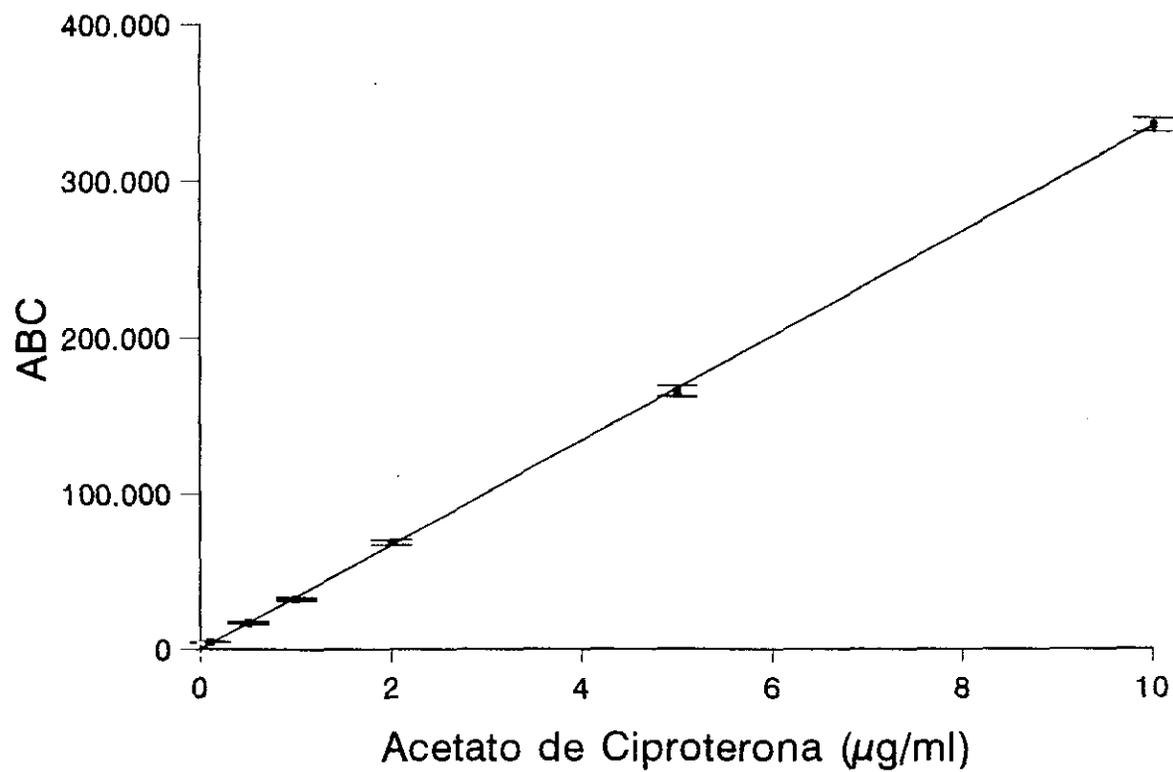


FIGURA IV.4.- Recta de calibración mediante ajuste lineal del área bajo curva (ABC) de soluciones metanólicas de acetato de ciproterona frente a la concentración (0,1-10 µg/ml) ($r^2=0,9978$).

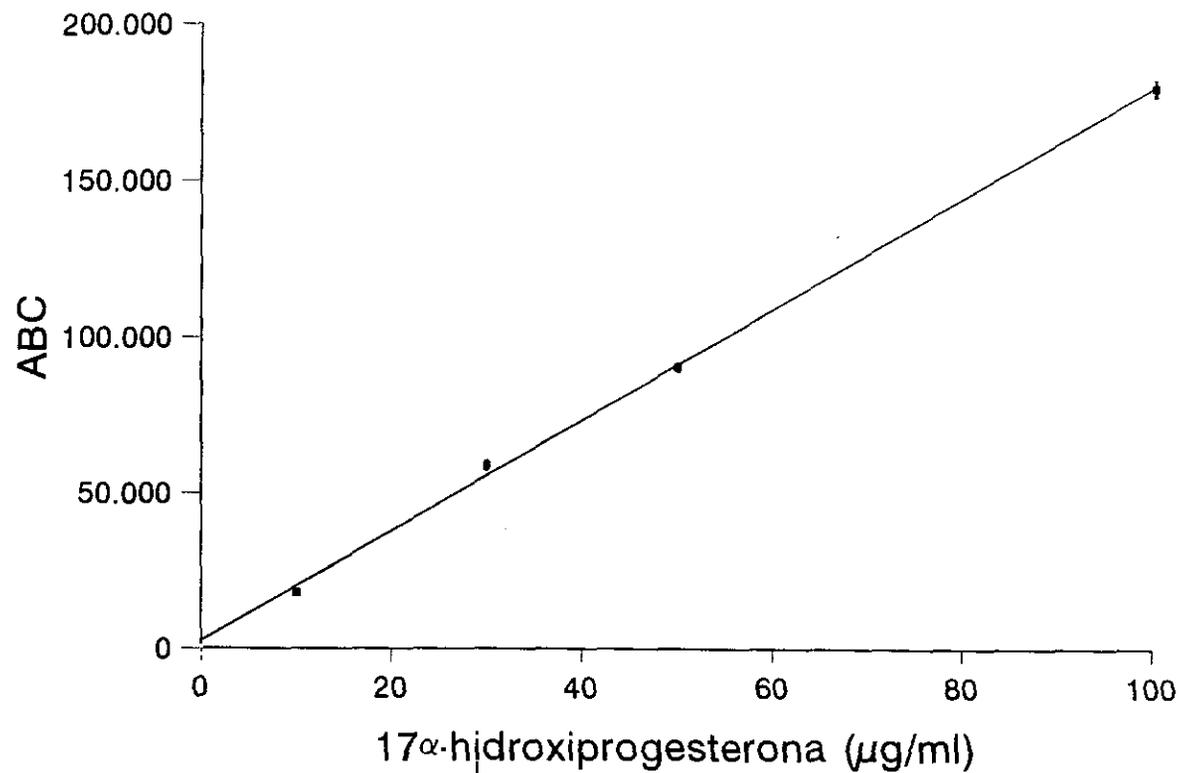


FIGURA IV.5.- Recta de calibración mediante ajuste lineal del área bajo curva (ABC) de soluciones metanólicas de 17 α -dihidroprogesterona (patrón interno) frente a la concentración (10-100 $\mu\text{g/ml}$) ($r^2=0,9942$).

		ABC A.C./ABC P.I.						
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	$\bar{x} \pm \text{E.S.M.}$	
0,1	0,065	0,049	0,065	0,067	0,046	0,055	$0,057 \pm 0,003$	
	0,070	0,051	0,080	0,049	0,045	0,047		
0,2	0,129	0,071	0,134	0,108	0,116	0,104	$0,109 \pm 0,006$	
	0,120	0,068	0,123	0,110	0,113	0,107		
0,5	0,253	0,200	0,280	0,230	0,260	0,274	$0,257 \pm 0,010$	
	0,270	0,195	0,257	0,274	0,300	0,290		
1,0	0,562	0,364	0,585	0,564	0,583	0,520	$0,529 \pm 0,023$	
	0,572	0,386	0,645	0,538	0,513	0,513		
2,0	1,161	0,956	1,318	1,128	1,173	0,979	$1,190 \pm 0,071$	
	1,074	0,981	1,460	1,097	1,037	0,912		
5,0	2,689	2,278	2,697	2,488	2,946	2,382	$2,562 \pm 0,077$	
	2,620	2,151	2,837	2,339	2,939	2,379		

TABLA IV.3.- Cocientes entre las áreas bajo curva de acetato de ciproterona y de patrón interno para distintas concentraciones de acetato de ciproterona (0,1-5,0 $\mu\text{g/ml}$) (Valores individuales, separados por días; media \pm E.S.M., para cada concentración).

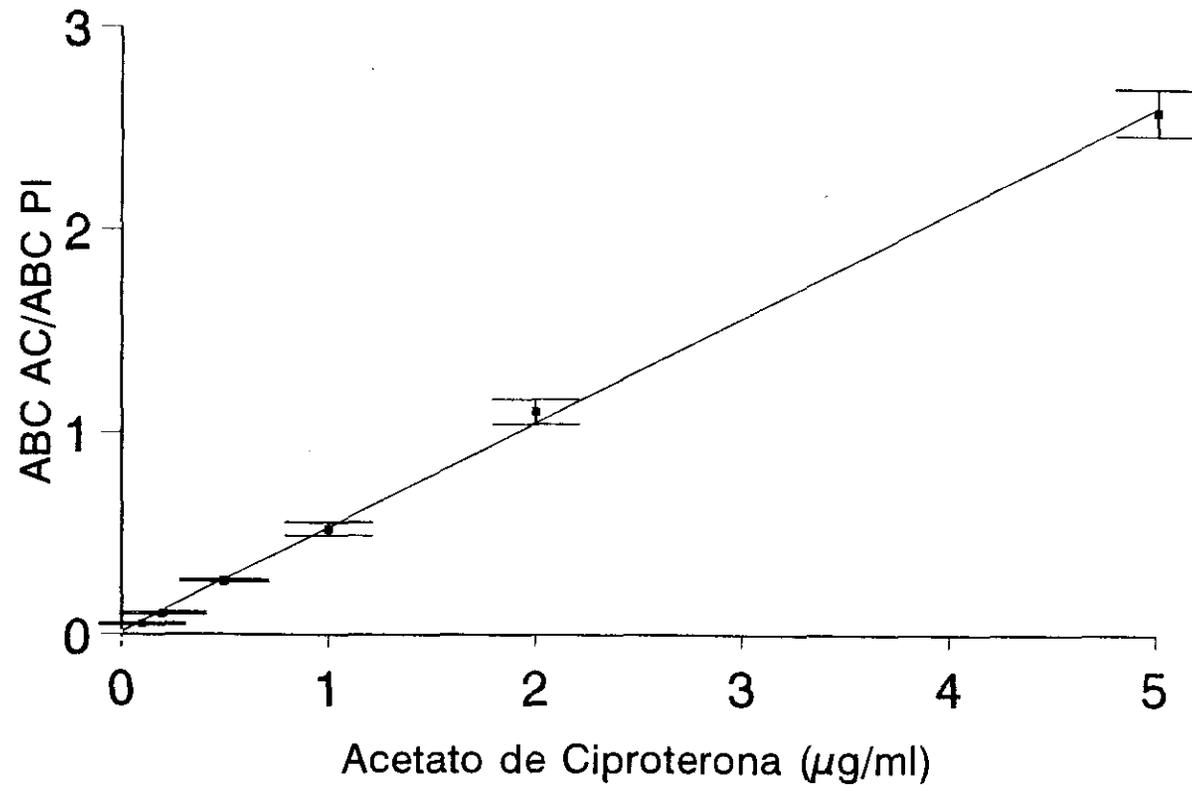


FIGURA IV.6.- Recta de calibración mediante ajuste lineal del cociente entre las áreas bajo curva de acetato de ciproterona y el patrón interno frente a la concentración de acetato de ciproterona (0,1-5 µg/ml) ($r^2=0,9788$).

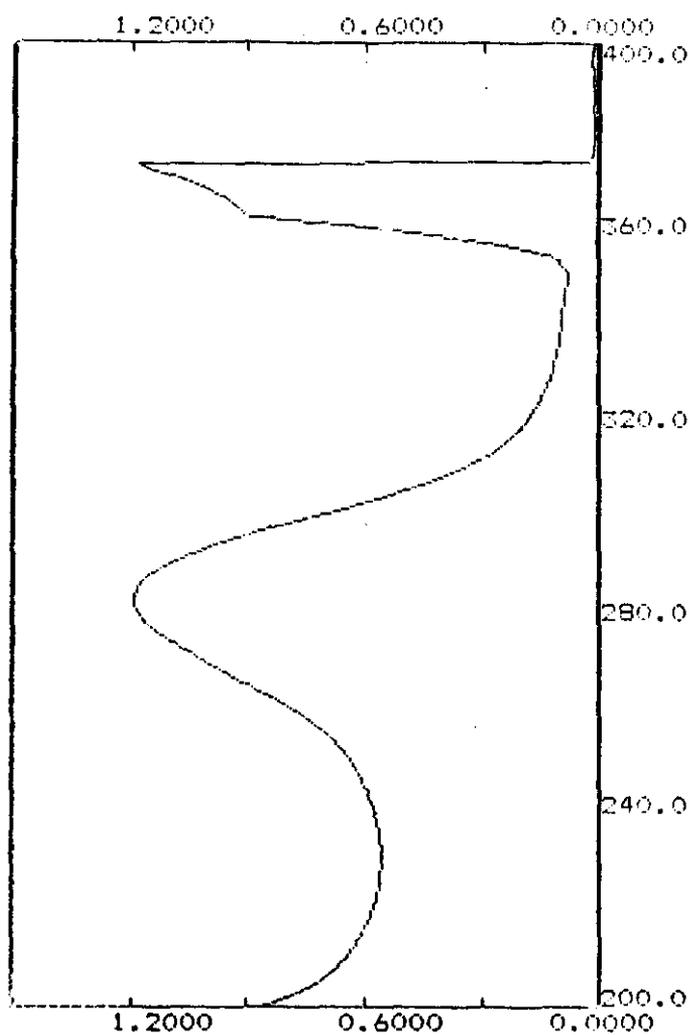


FIGURA IV.7.- Espectrofotograma de acetato de ciproterona (1 mg/ml) e metanol (velocidad: 750 nm/min; rango de longitud de onda: 200-400 nm).

IV.2.2.- CRONOFARMACOCINETICA

Los valores de concentración plasmática del Acetato de Ciproterona tras la administración endovenosa rápida en todos los conejos de los diferentes horarios, junto a las medias y E.S.M. aparecen en las TABLAS IV.4; IV.5; IV.6; IV.7; IV.8 y IV.9 y representados en las FIGURAS IV.8; IV.9; IV.10; IV.11; IV.12; IV.13 y IV.14.

El ajuste de las curvas de concentración plasmática frente al tiempo, se efectuó en todos los individuos a ecuaciones biexponenciales según la fórmula general:

$$CC = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$$

Los coeficientes (A y B), exponentes (α y β), $t_{1/2}$ de α y β , la K_{21} , la K_{12} , la k_{10} , el ABC, el Vdc, el Cl, el MRT y la r^2 aparecen en las TABLAS IV.10; IV.11; IV.12; IV.13; IV.14 y IV.15.

De los diferentes parámetros farmacocinéticos, los elegidos para el estudio cronobiológico fueron α , β , $t_{1/2}$ α , $t_{1/2}$ β , K_{21} , K_{12} , K_{10} , ABC, Vdc y Cl. A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

. α :

COSENOR (C): ϕ -2 rad (7:38 h); M 0,064; A 0,015; $p < 0,126$;

Pr 65 %

POLINOMIO TRIEXPONENCIAL (P.T.):

$$y = 0,0479 + 0,0084x - 7,344e^{4x^2} + 1,624e^{-5x^3}$$

R = 0,79 (FIGURA IV.15)

. β :

C: ϕ -2 rad (7:38 h); M 0,004; A 0,001; $p < 0,442$; Pr 35 %.

$$P.T.: y = 0,002 + 2,272e^{-4x} - 3,269e^{-5x^2} + 9,666e^{-7x^3}$$

R = 0,62 (FIGURA IV.16)

. $t_{1/2}\alpha$:

C: ϕ -6 rad (22:55 h); M 24,47; A 2,24; $P < 0,184$; Pr 57 %.

$$P.T.: y = 14,7152 - 1,2358x + 0,0996x^2 - 0,002x^3$$

R = 0,79 (FIGURA IV.17)

. $t_{1/2}\beta$:

C: ϕ -5 rad (19:05 h); M 3361,68; A 13,36; $P < 0,229$; Pr 45 %.

$$P.T.: y = 175,6898 - 13,284x + 1,8674x^2 - 0,0547x^3$$

R = 0,70 (FIGURA IV.18)

. K_{21} :

C: ϕ -2 rad (7:38 h); M 0,036; A 0,002; $p < 0,601$; Pr 22 %.

P.T.: $y = 0,0332 + 9,087e^{-4x} - 9,159e^{-5x^2} + 2,322e^{-6x^3}$

R = 0,40 (FIGURA IV.19)

. K_{10} :

C: ϕ -2 rad (7:38 h); M 0,007; A 0,002; $p < 0,005$; Pr 93 %.

P.T.: $y = 0,006 + 0,0012x - 1,198e^{-4x^2} + 2,995e^{-6x^3}$

R = 0,90 (FIGURA IV.20)

. K_{12} :

C: ϕ -2 rad (7:38 h); M 0,024; A 0,014; $p < 0,052$; Pr 77 %.

P.T.: $y = 0,0121 + 0,0075x - 6,724e^{-4x^2} + 1,512e^{-5x^3}$

R = 0,86 (FIGURA IV.21)

. **Vdc:**

C: ϕ -6 rad (22:55 h); M 3923; A 800; $p < 0,001$; Pr 98%.

P.T.: $y = 2293,2966 - 401,9938x + 35,063x^2 - 0,7642x^3$

R = 0,93 (FIGURA IV.22)

. **ABC:**

C: ϕ -4 rad (15:28 h); M 1794622; A 28813; $p < 0,146$; Pr 62%.

P.T.: $y = 1,978e^{+5} - 2773,6056x + 941,8527x^2 - 34,3222x^3$

R = 0,89 (FIGURA IV.23)

. **CI:**

C: ϕ -1 rad (3:48 h); M 0,366, A 2,344; $p < 0,155$; Pr 61%.

P.T.: $y = 20,6098 + 0,1025x - 0,0664x^2 + 0,0026x^3$

R = 0,89 (FIGURA IV.24)

0-12 h		Concentración plasmática (ng/ml)					
Tiempo (min)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$	
5	1286	1091	1215	1156	1102	1170 \pm 6,42	
15	1071	960	921	-	948	975 \pm 33,02	
30	880	903	815	771	827	839 \pm 23,58	
60	702	668	705	616	673	672 \pm 16,02	
90	554	609	589	574	584	582 \pm 9,02	
120	441	450	432	401	371	429 \pm 19,41	
180	352	-	412	377	264	351 \pm 31,57	
240	269	311	340	271	231	234 \pm 18,79	
360	-	219	250	-	158	209 \pm 27,02	

TABLA IV.4.- Concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona tras administración endovenosa a las 10 h (4 mg/kg) a conejos con horario de luz de 0-12 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

4-16 h	Concentración plasmática (ng/ml)						
	Tiempo (min)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
	5	1508	1413	1337	1635	1581	1494 \pm 54,24
	15	954	886	1032	986	1003	972 \pm 24,97
	30	933	647	929	921	868	859 \pm 54,42
	60	571	452	772	775	720	658 \pm 63,45
	90	561	451	640	637	658	589 \pm 38,40
	120	504	363	558	514	480	483 \pm 32,73
	180	306	-	375	337	316	333 \pm 15,26
	240	252	297	-	315	248	278 \pm 16,59
	360	200	192	234	193	-	204 \pm 09,91

TABLA IV.5.- Concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona tras administración endovenosa a las 10 h (4 mg/kg) a conejos con horario de luz de 4-16 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

8-20 h	Concentración plasmática (ng/ml)						
	Tiempo (min)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
	5	1897	1855	1676	1529	1545	1700 \pm 76,30
	15	1252	1325	1412	1076	1319	1276 \pm 56,20
	30	851	941	918	830	862	880 \pm 21,00
	60	708	830	892	757	694	776 \pm 37,40
	90	627	711	558	695	654	649 \pm 27,10
	120	-	474	472	513	504	490 \pm 10,40
	180	454	-	427	414	-	431 \pm 11,76
	240	330	323	331	368	314	333 \pm 09,20
	360	211	245	286	200	187	225 \pm 17,80

TABLA IV.6.- Concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona tras administración endovenosa a las 10 h (4 mg/kg) a conejos con horario de luz de 8-20 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

12-0 h	Concentración plasmática (ng/ml)						
	Tiempo (min)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
	5	1582	1496	1673	1602	1910	1652 \pm 70,26
	15	1269	1357	1318	1375	1297	1323 \pm 19,33
	30	949	862	823	885	-	879 \pm 26,39
	60	779	833	-	738	765	778 \pm 19,98
	90	715	654	711	693	-	693 \pm 13,93
	120	526	440	543	580	498	517 \pm 23,46
	180	522	409	357	437	446	434 \pm 26,88
	240	405	313	283	328	379	341 \pm 22,19
	360	210	109	187	129	197	166 \pm 19,94

TABLA IV.7.- Concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona tras administración endovenosa a las 10 h (4 mg/kg) a conejos con horario de luz de 12-0 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

16-4 h	Concentración Plasmática (ng/ml)						
	Tiempo (min)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
	5	1324	1320	1481	1409	1384	1383 \pm 29,77
	15	1112	1018	1007	984	952	1014 \pm 26,84
	30	861	845	865	847	882	860 \pm 06,72
	60	752	726	725	770	704	735 \pm 11,52
	90	-	459	529	623	597	552 \pm 36,79
	120	575	-	471	520	561	531 \pm 23,37
	180	393	432	418	426	509	435 \pm 19,51
	240	335	375	346	-	382	359 \pm 11,26
	360	223	306	276	252	296	270 \pm 15,06

TABLA IV.8.- Concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona tras administración endovenosa a las 10 h (4 mg/kg) a conejos con horario de luz de 16-4 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

20-8 h	Concentración plasmática (ng/ml)					
	Tiempo (min)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	$\bar{x} \pm E.S.M.$
	5	985	1083	1149	1001	1054 \pm 38,11
	15	861	845	876	896	869 \pm 10,86
	30	843	727	794	747	778 \pm 25,88
	60	651	627	774	647	675 \pm 33,49
	90	-	455	586	406	482 \pm 53,70
	120	494	411	456	457	454 \pm 16,98
	180	347	367	331	377	355 \pm 10,27
	240	-	361	291	217	287 \pm 41,57
	360	308	302	259	-	290 \pm 15,43

TABLA IV.9.- Concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona tras administración endovenosa a las 10 h (4 mg/kg) a conejos con horario de luz de 20-8 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=4).

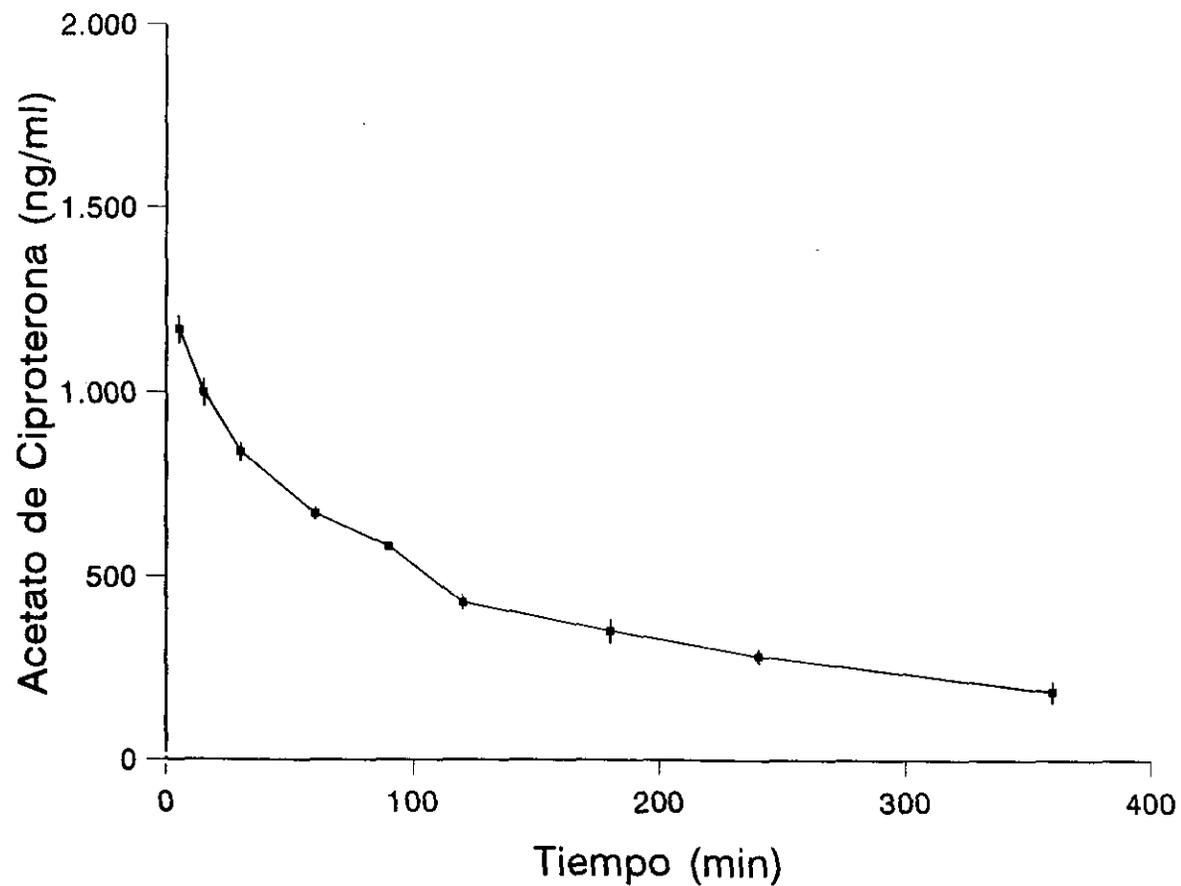


FIGURA IV.8.- Representación de la concentración plasmática de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, manteniendo a los animales en horario de luz de 0-12 h (MEDIA \pm E.S.M.; n=5).

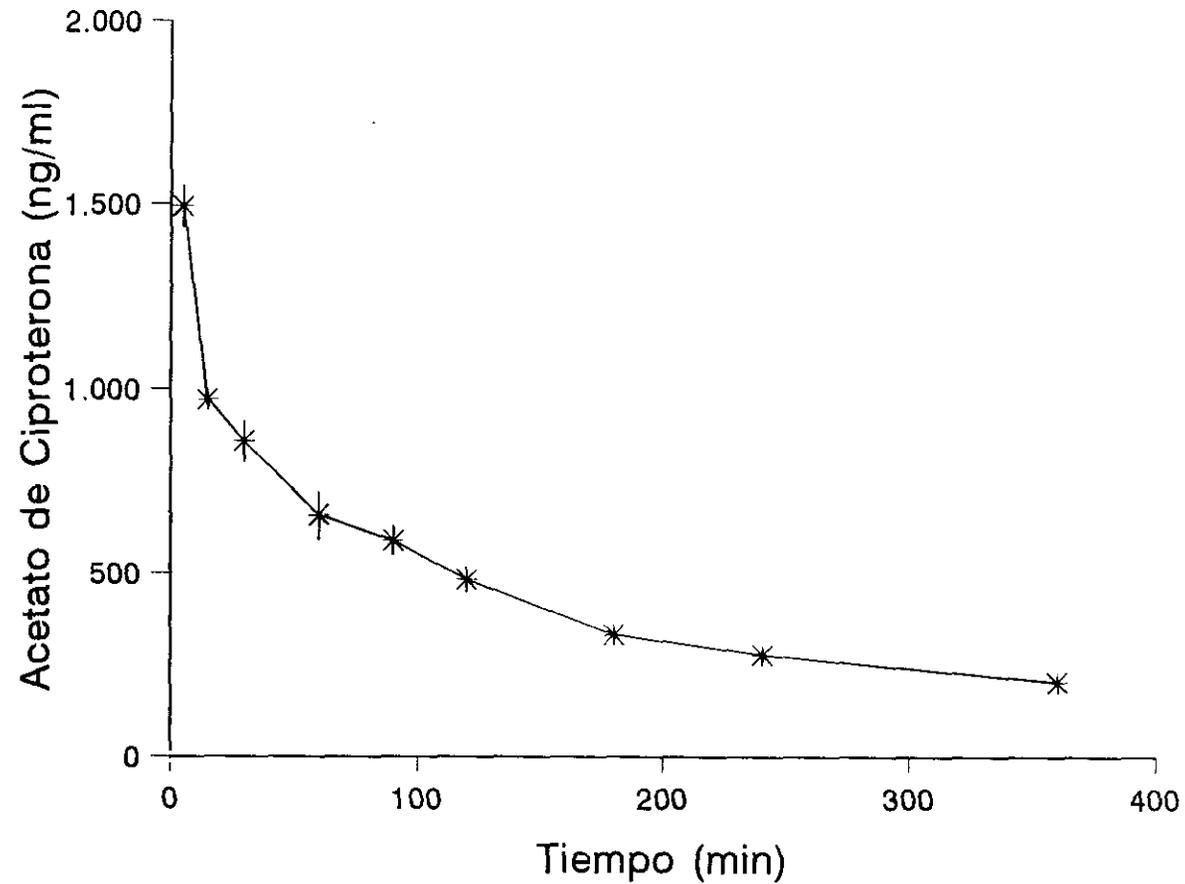


FIGURA IV.9.- Representación de la concentración plasmática de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, manteniendo a los animales en horario de luz de 4-16 h (MEDIA \pm E.S.M.; n=5).

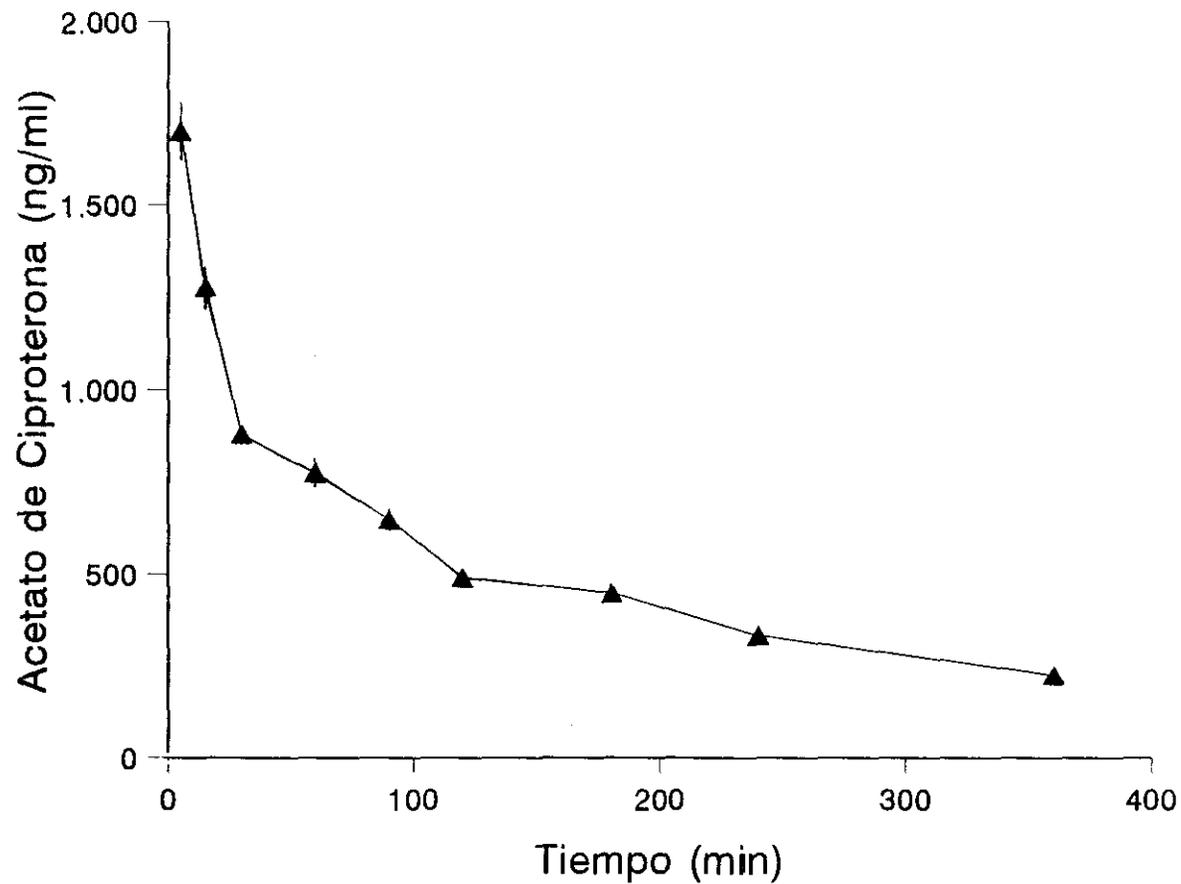


FIGURA IV.10.- Representación de la concentración plasmática de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, manteniendo a los animales en horario de luz de 8-20 h (MEDIA \pm E.S.M.; n=5).

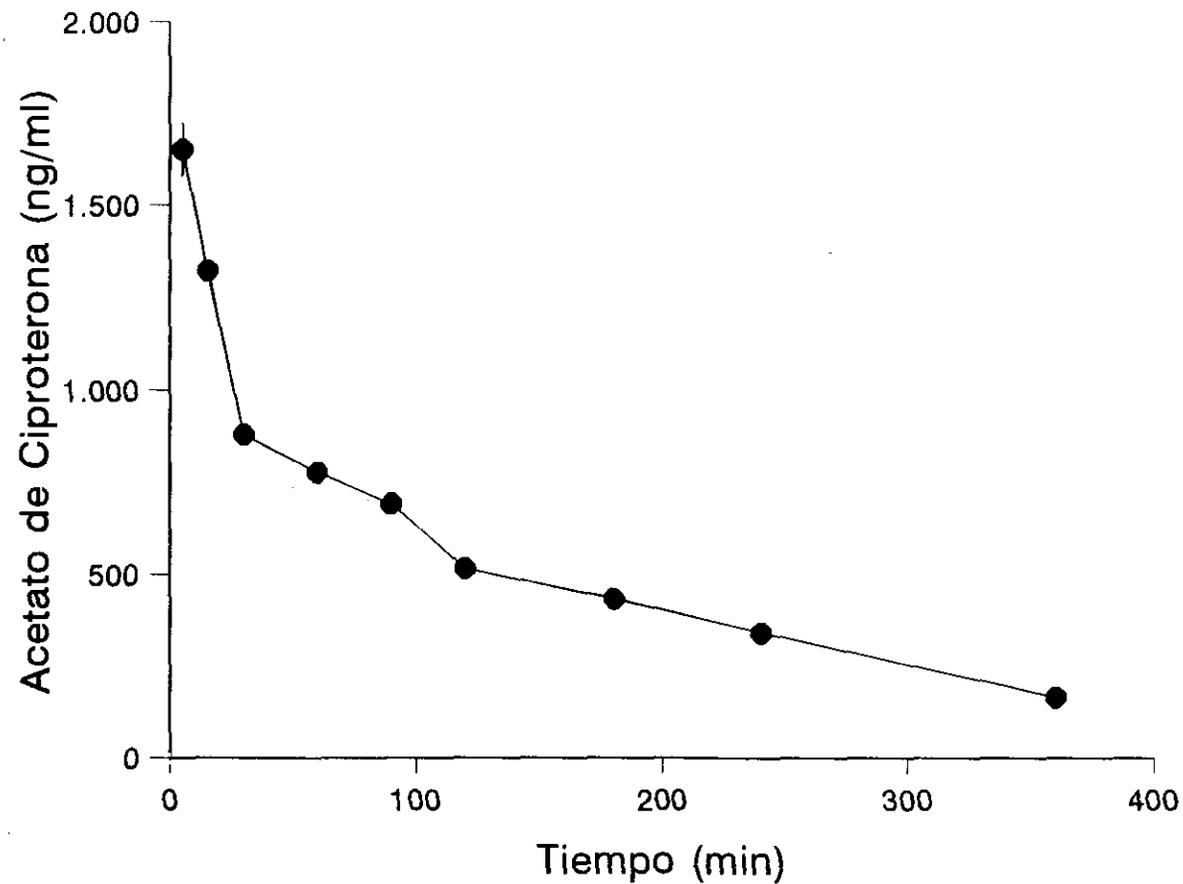


FIGURA IV.11.- Representación de la concentración plasmática de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, manteniendo a los animales en horario de luz de 12-0 h (MEDIA \pm E.S.M.; n=5).

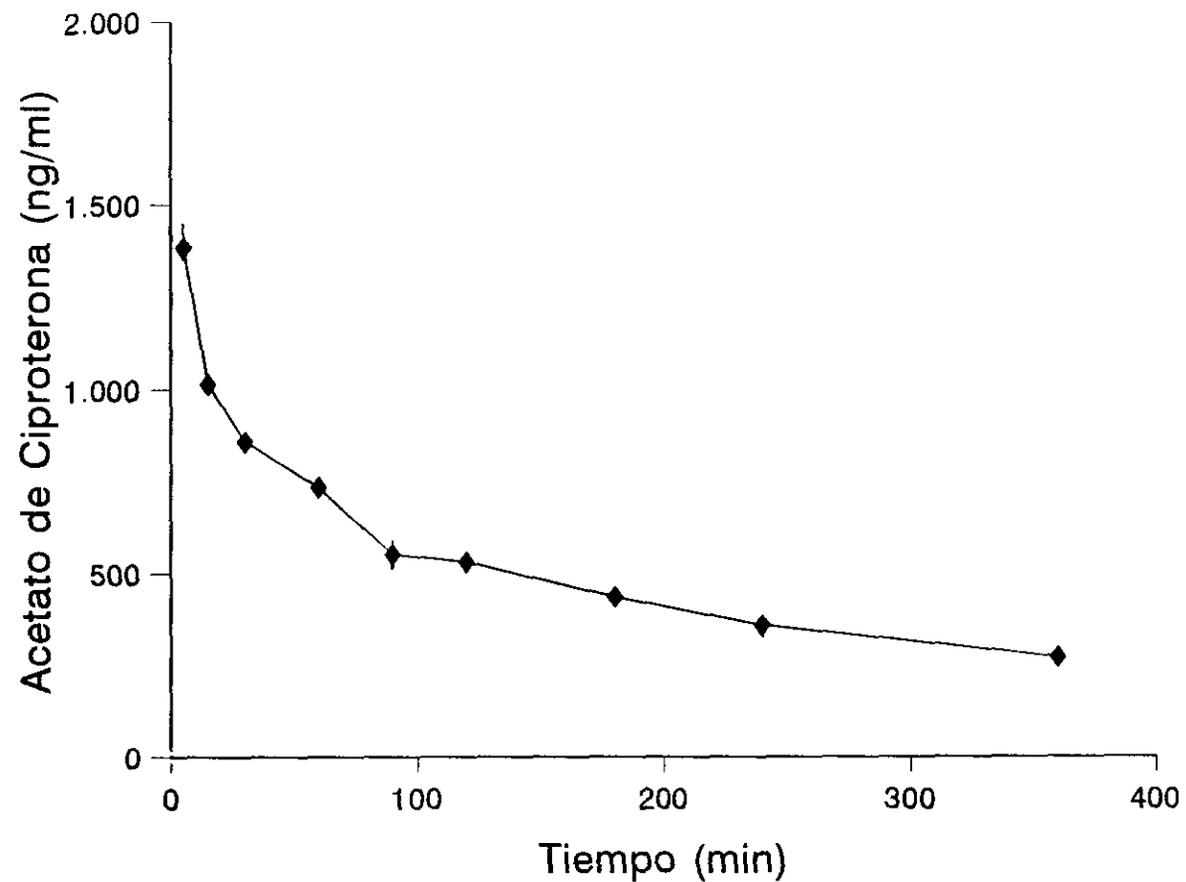


FIGURA IV.12.- Representación de la concentración plasmática de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, manteniendo a los animales en horario de luz de 16-4 h (MEDIA \pm E.S.M.; n=5).

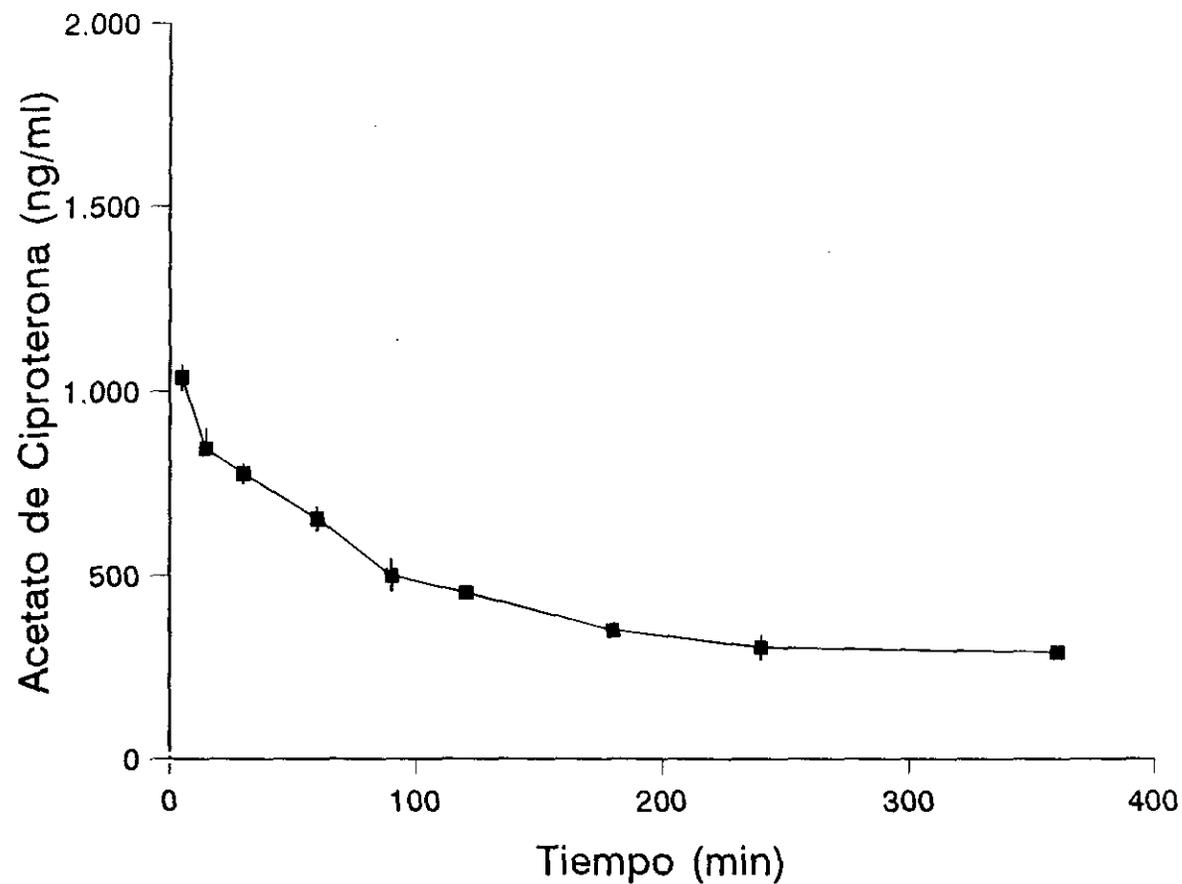


FIGURA IV.13.- Representación de la concentración plasmática de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, manteniendo a los animales en horario de luz de 20-8 h (MEDIA \pm E.S.M.; n=4).

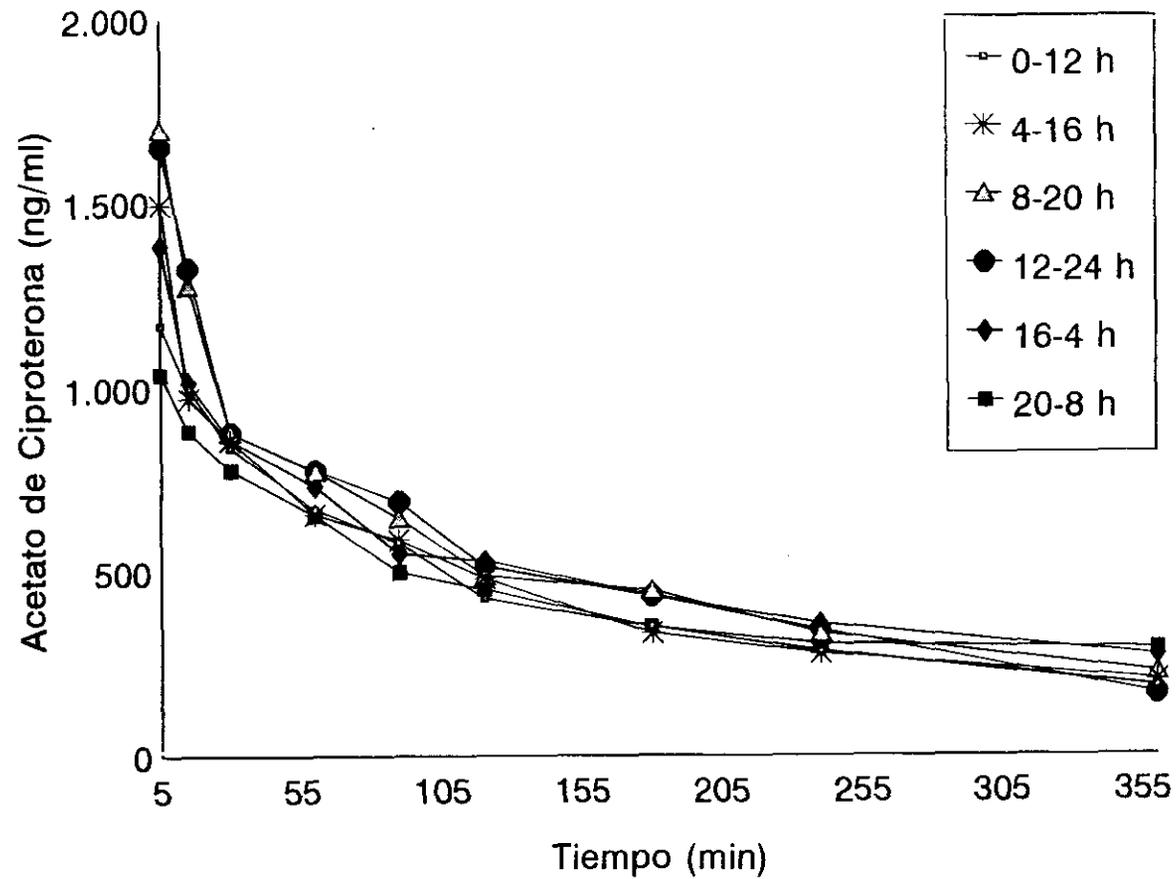


FIGURA IV.14.- Comparación entre las concentraciones plasmáticas de acetato de ciproterona frente al tiempo en conejos tras administración endovenosa de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, en distintos horarios luz-oscuridad (MEDIA) .

0-12 h

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
A (ng/ml)	533,78	307,96	502,70	518,01	383,75	449,24 \pm 44,14
α (10^{-2})(1/min)	5,10	5,24	5,44	6,41	3,13	5,06 \pm 0,53
B (ng/ml)	888,91	862,64	780,55	788,39	772,78	818,65 \pm 23,81
β (10^{-3})(1/min)	5,13	4,06	3,32	4,47	4,80	4,43 \pm 0,31
$t_{1/2\alpha}$ (min)	13,59	13,21	12,73	10,81	22,13	14,49 \pm 1,96
$t_{1/2\beta}$ (min)	135,10	170,57	208,75	155,15	144,32	162,76 \pm 12,91
K12 (10^{-2})(1/min)	1,46	1,14	1,82	2,10	0,69	1,44 \pm 0,25
K21 (10^{-2})(1/min)	3,37	3,98	3,43	4,04	2,25	3,41 \pm 0,32
K10 (10^{-3})(1/min)	7,75	5,36	5,26	7,01	6,69	6,46 \pm 0,47
Vdc (ml)	2804,59	3390,42	3101,81	3037,65	3439,77	3154,70 \pm 117,44
ABC (ng*min/ml)	177012,30	209939,3	238087,20	181012,30	169378,60	195085,94 \pm 12757,98
Cl (ml/min)	22,59	19,05	16,80	22,09	23,61	20,83 \pm 1,26
MRT (min)	190,66	245,27	296,29	219,81	213,66	233,13 \pm 18,02
r^2	0,9974	0,9820	0,9874	0,9883	0,9845	----

TABLA IV.10.- Parámetros cinéticos obtenidos tras la administración endovenosa a conejos de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, con horario de luz de 0-12 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

4-16 h

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
A (ng/ml)	727,78	1164,44	497,70	685,39	788,39	772,74 \pm 109,30
α (10^{-2})(1/min)	3,74	7,34	4,74	6,77	7,34	5,99 \pm 0,74
B (ng/ml)	727,78	555,57	888,91	915,98	897,84	797,21 \pm 69,22
β (10^{-3})(1/min)	3,91	2,89	3,91	4,53	5,50	4,15 \pm 0,43
$t_{1/2\alpha}$ (min)	18,51	9,43	14,61	10,23	9,43	12,44 \pm 1,79
$t_{1/2\beta}$ (min)	177,40	239,32	177,39	152,99	125,90	174,60 \pm 18,76
K ₁₂ (10^{-2})(1/min)	1,36	4,23	1,36	2,40	2,75	2,42 \pm 0,53
K ₂₁ (10^{-2})(1/min)	2,06	2,57	3,18	4,07	4,17	3,21 \pm 0,41
K ₁₀ (10^{-3})(1/min)	7,08	8,28	5,81	7,54	9,68	7,68 \pm 0,64
V _{dc} (ml)	2739,94	2313,46	2872,13	2487,50	2365,03	2555,59 \pm 108,10
ABC (ng*min/ml)	195889,00	202206,40	230123,40	206610,90	173078,40	201581,62 \pm 9179,20
Cl (ml/min)	20,41	19,78	17,38	19,36	23,11	20,00 \pm 0,92
MRT (min)	241,77	329,48	248,67	215,06	174,10	241,80 \pm 25,52
r^2	0,9517	0,9945	0,9859	0,9580	0,9710	----

TABLA IV.11.- Parámetros cinéticos obtenidos tras la administración endovenosa a conejos de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, con horario de luz de 4-16 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

8-20 h

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
A (ng/ml)	1587,63	1495,17	1366,48	1074,91	1326,10	1370,05 \pm 87,19
α (10^{-2})(1/min)	9,60	8,49	6,55	11,94	9,64	9,24 \pm 0,87
B (ng/ml)	925,19	925,19	812,40	953,36	906,87	904,60 \pm 24,21
β (10^{-3})(1/min)	4,16	3,97	3,29	4,32	4,42	4,03 \pm 0,20
$t_{1/2\alpha}$ (min)	7,22	8,15	10,58	5,80	7,18	7,78 \pm 0,79
$t_{1/2\beta}$ (min)	166,32	174,44	210,78	160,50	156,61	173,73 \pm 9,73
K12 (10^{-2})(1/min)	5,16	4,43	3,41	5,65	4,89	4,71 \pm 0,38
K21 (10^{-2})(1/min)	3,81	3,50	2,65	5,84	4,17	3,99 \pm 0,52
K10 (10^{-3})(1/min)	10,50	9,64	8,11	8,82	10,22	9,46 \pm 0,44
Vdc (ml)	1585,49	1646,32	1827,23	1966,44	1778,19	1760,69 \pm 67,38
ABC (ng*min/ml)	229424,10	238357,90	260183,30	223187,10	212653,00	232761,06 \pm 8032,50
Cl (ml/min)	17,43	16,78	15,37	17,92	18,81	17,26 \pm 0,57
MRT (min)	232,17	241,34	288,74	229,60	216,58	241,68 \pm 12,41
r^2	0,9983	0,9874	0,9601	0,9934	0,9682	----

TABLA IV.12.- Parámetros cinéticos obtenidos tras la administración endovenosa a conejos de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, con horario de luz de 8-20 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

12-0 h

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
A (ng/ml)	1074,91	533,78	953,36	584,05	1525,38	934,29 \pm 180,63
α (10^{-2})(1/min)	9,44	3,58	5,57	4,20	8,66	6,29 \pm 1,17
B (ng/ml)	1002,20	1107,65	962,94	1152,85	934,48	1032,02 \pm 42,12
β (10^{-3})(1/min)	4,18	6,12	4,81	5,80	4,21	5,02 \pm 0,40
$t_{1/2\alpha}$ (min)	7,34	19,37	12,44	16,46	8,00	12,72 \pm 2,34
$t_{1/2\beta}$ (min)	165,67	113,29	144,08	119,45	164,65	141,42 \pm 10,90
K12 (10^{-2})(1/min)	4,25	0,74	2,13	0,98	4,50	2,52 \pm 0,79
K21 (10^{-2})(1/min)	4,79	2,61	3,03	2,99	3,55	3,39 \pm 0,38
K10 (10^{-3})(1/min)	8,25	8,36	8,82	8,17	10,27	8,78 \pm 0,39
Vdc (ml)	1917,80	2427,32	2073,01	2290,11	1621,07	2065,80 \pm 141,50
ABC (ng*min/ml)	247537,20	187630,20	205896,00	202368,50	236861,10	216058,60 \pm 11230,50
Cl (ml/min)	16,15	21,31	19,42	19,76	16,88	18,70 \pm 0,95
MRT (min)	234,69	163,00	200,50	172,91	224,03	199,02 \pm 13,90
r^2	0,9872	0,9818	0,9776	0,9649	0,9969	----

TABLA IV.13.- Parámetros cinéticos obtenidos tras la administración endovenosa a conejos de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, con horario de luz de 12-0 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

16-4 h

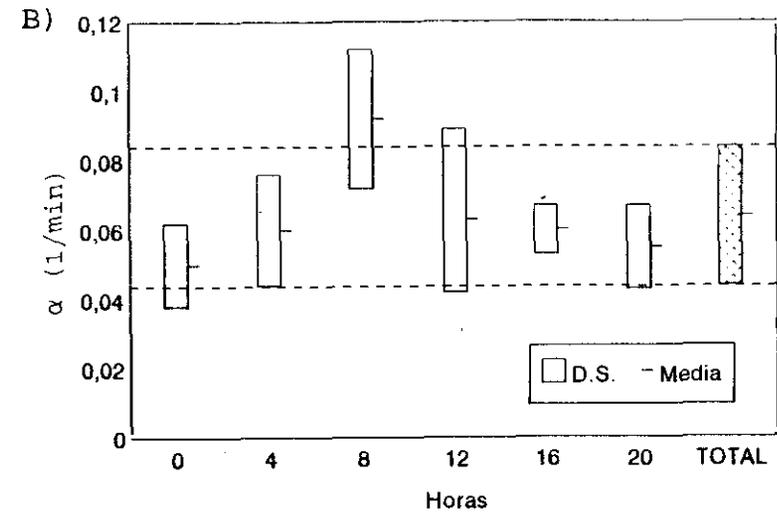
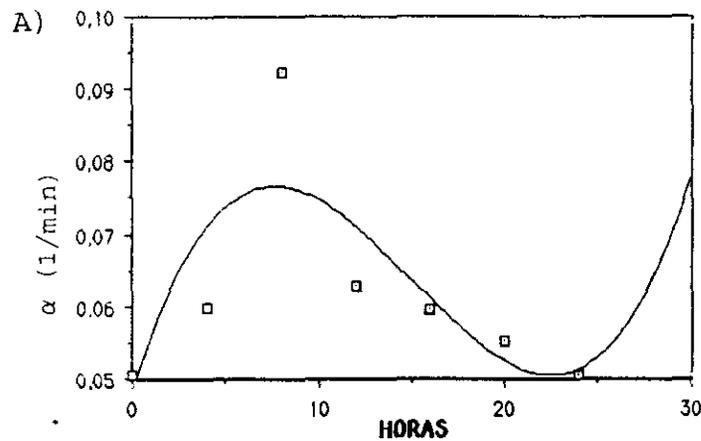
Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	$\bar{x} \pm E.S.M.$
A (ng/ml)	713,35	788,39	854,05	735,09	607,89	739,75 \pm 40,94
α (10^{-2})(1/min)	6,16	7,00	5,23	6,12	5,29	5,96 \pm 0,32
B (ng/ml)	837,14	772,78	727,78	788,39	736,31	772,48 \pm 19,67
β (10^{-3})(1/min)	3,77	2,84	2,89	3,21	2,83	3,11 \pm 0,18
$t_{1/2\alpha}$ (min)	11,24	9,87	13,25	11,32	13,09	11,75 \pm 0,63
$t_{1/2\beta}$ (min)	183,67	243,53	239,85	215,51	245,11	225,53 \pm 11,75
K ₁₂ (10^{-2})(1/min)	2,38	3,17	2,37	2,54	1,97	2,48 \pm 0,19
K ₂₁ (10^{-2})(1/min)	3,50	3,61	2,56	3,31	3,13	3,22 \pm 0,18
K ₁₀ (10^{-3})(1/min)	6,65	5,52	5,91	5,94	4,78	5,76 \pm 0,30
V _{dc} (ml)	2561,19	2556,64	2519,20	2612,82	2837,80	2617,40 \pm 57,07
ABC (ng*min/ml)	232747,90	269772,50	260189,30	254512,80	288008,30	261046,10 \pm 9075,50
Cl (ml/min)	17,18	14,82	15,37	15,71	13,88	15,39 \pm 0,54
MRT (min)	254,22	350,51	334,28	297,74	346,98	316,74 \pm 18,20
r^2	0,9924	0,9704	0,9788	0,9783	0,9725	----

TABLA IV.14.- Parámetros cinéticos obtenidos tras la administración endovenosa a conejos de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, con horario de luz de 16-4 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=5).

20-8 h

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	$\bar{x} \pm E.S.M.$
A (ng/ml)	311,06	626,40	424,11	428,37	447,48 \pm 65,53
α (10^{-2})(1/min)	5,98	6,95	5,16	4,03	5,53 \pm 0,62
B (ng/ml)	757,48	645,48	765,09	665,14	708,29 \pm 30,89
β (10^{-3})(1/min)	2,91	2,43	3,51	2,52	2,84 \pm 0,24
$t_{1/2\alpha}$ (min)	12,05	9,96	13,43	17,20	13,16 \pm 1,52
$t_{1/2\beta}$ (min)	238,46	284,69	197,28	274,70	248,78 \pm 19,83
K ₁₂ (10^{-2})(1/min)	1,48	3,09	1,54	1,33	1,64 \pm 0,28
K ₂₁ (10^{-2})(1/min)	4,16	3,65	3,44	2,55	3,45 \pm 0,33
K ₁₀ (10^{-3})(1/min)	4,01	4,64	5,26	3,98	4,48 \pm 0,30
V _{dc} (ml)	3724,18	3135,83	3345,11	3633,43	3459,60 \pm 134,83
ABC (ng*min/ml)	255005,70	266509,80	219258,50	268676,00	252375,00 \pm 11436,10
Cl (ml/min)	15,68	15,00	18,24	14,88	15,93 \pm 0,78
MRT (min)	346,50	408,16	280,28	390,43	356,33 \pm 28,47
r^2	0,9499	0,9675	0,9769	0,9869	---

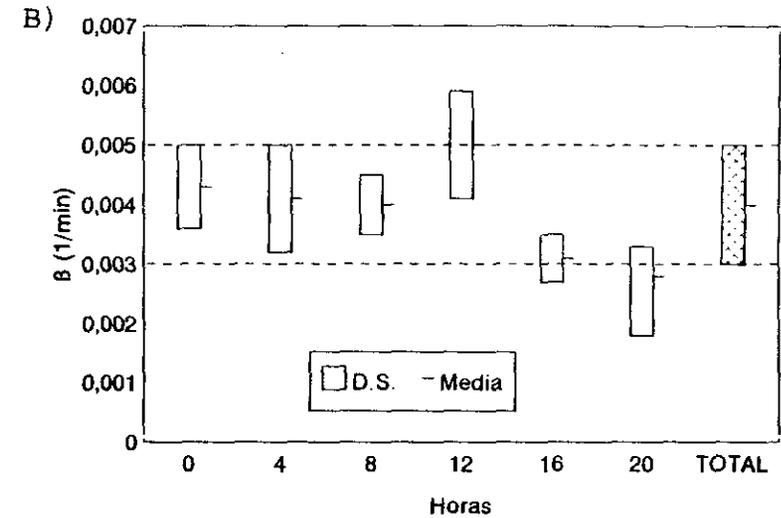
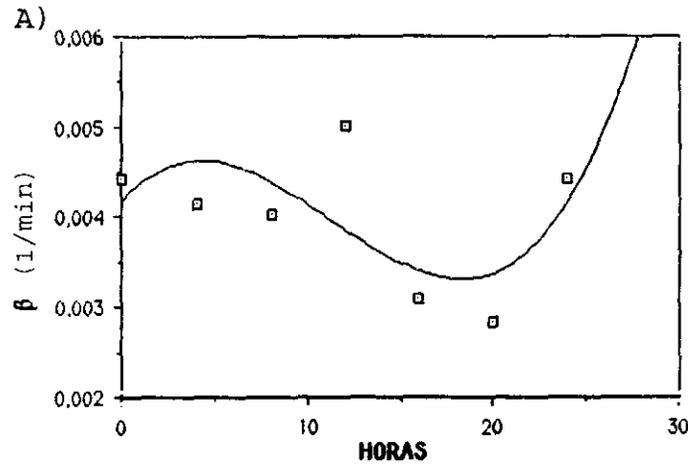
TABLA IV.15.- Parámetros cinéticos obtenidos tras la administración endovenosa a conejos de acetato de ciproterona (4 mg/kg) a las 10 h, con horario de luz de 20-8 h (Valores individuales; media \pm E.S.M.; n=4).



C)

α					
0-12 h	0-12 h				
4-16 h	N.S.	4-16 h			
8-20 h	N.S.	S.	8-20 h		
12-0 h	N.S.	N.S.	N.S.	12-0 h	
16-4 h	N.S.	N.S.	S.	N.S.	16-4 h
20-8 h	N.S.	N.S.	S.	N.S.	N.S.

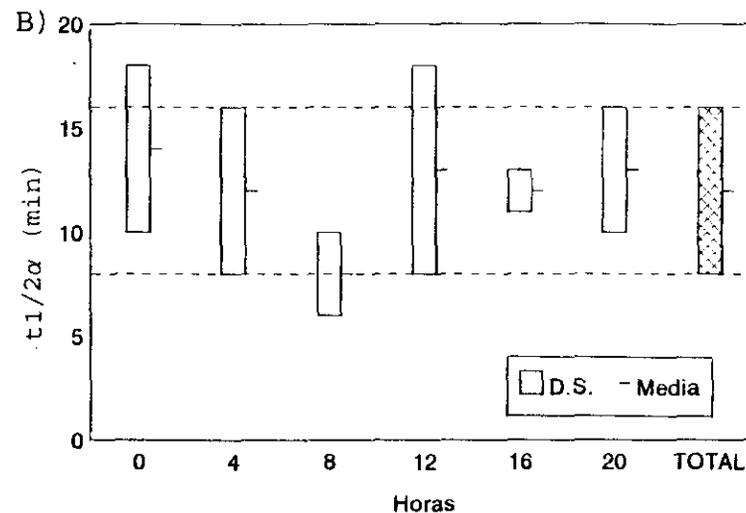
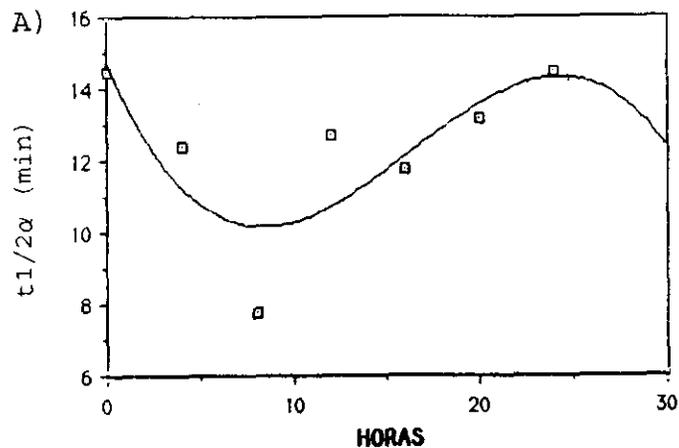
FIGURA IV.15.- Estudio cronobiológico de α en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de las medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

B							
0-12 h	0-12 h						
4-16 h	N.S.	4-16 h					
8-20 h	N.S.	N.S.	8-20 h				
12-0 h	N.S.	N.S.	N.S.	12-0 h			
16-4 h	S.	N.S.	S.	S.	16-4 h		
20-8 h	S.	S.	S.	S.	N.S.		

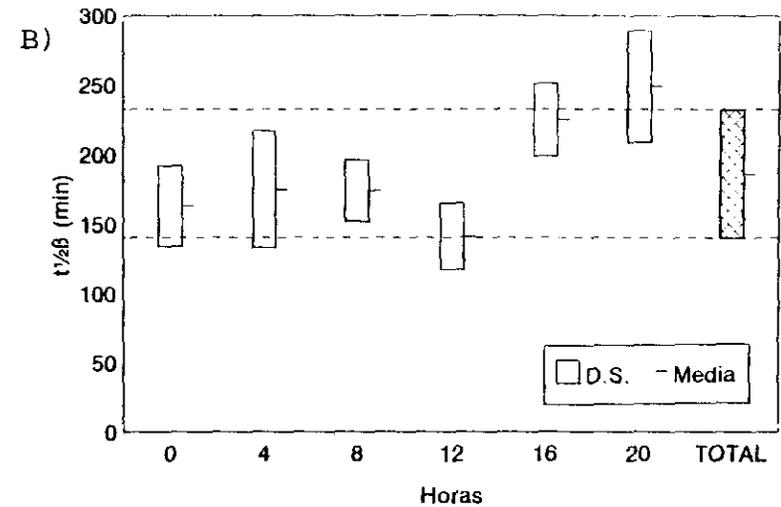
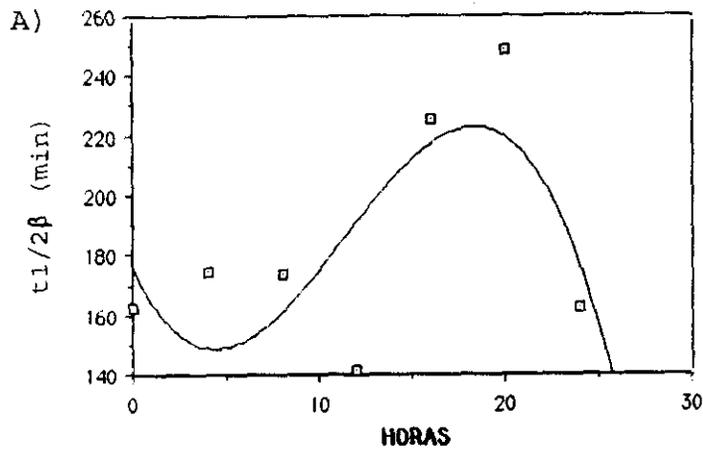
FIGURA IV.16.- Estudio cronobiológico de β en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

$t_{1/2\alpha}$					
0-12 h	0-12 h				
4-16 h	N.S.	4-16 h			
8-20 h	S.	N.S.	8-20 h		
12-0 h	N.S.	N.S.	N.S.	12-0 h	
16-4 h	N.S.	N.S.	S.	N.S.	16-4 h
20-8 h	N.S.	N.S.	S.	N.S.	N.S.

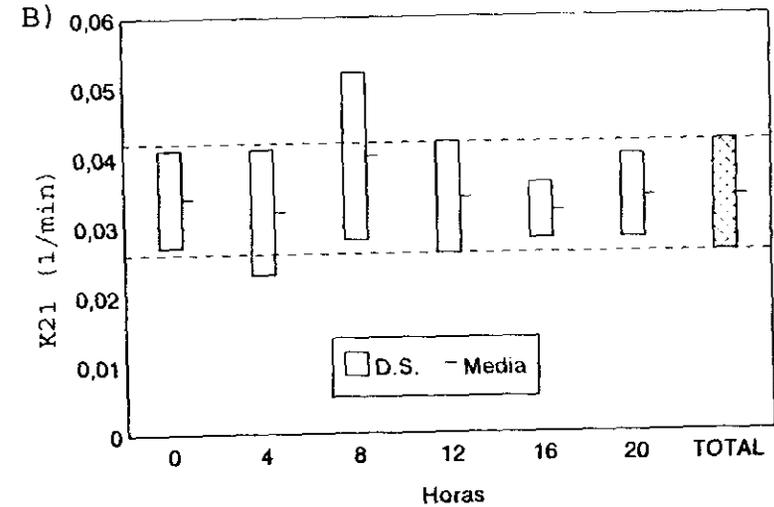
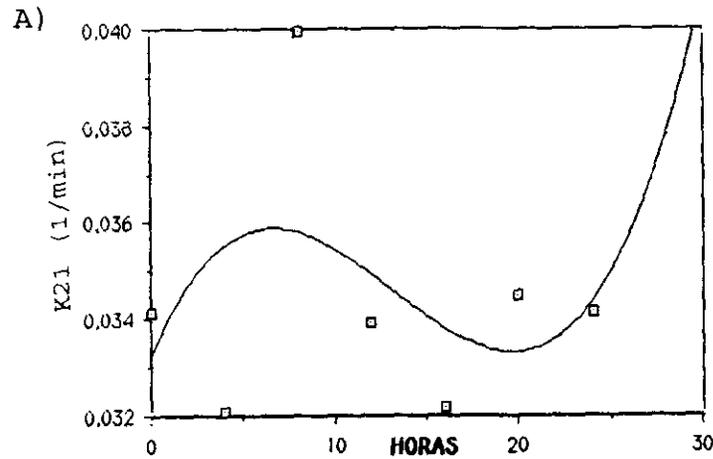
FIGURA IV.17.- Estudio cronobiológico de $t_{1/2\alpha}$ en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de las medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

$t_{1/2\beta}$					
0-12 h	0-12 h				
4-16 h	N.S.	4-16 h			
8-20 h	N.S.	N.S.	8-20 h		
12-0 h	N.S.	N.S.	N.S.	12-0 h	
16-4 h	S.	N.S.	S.	S.	16-4 h
20-8 h	S.	S.	S.	S.	N.S.

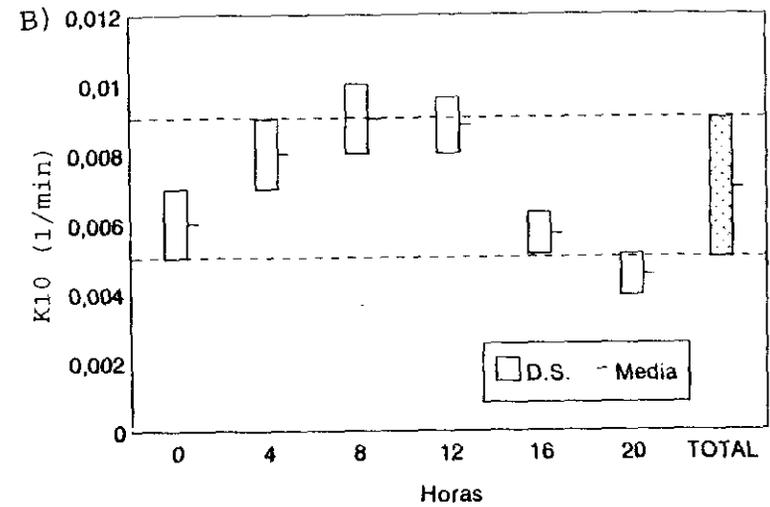
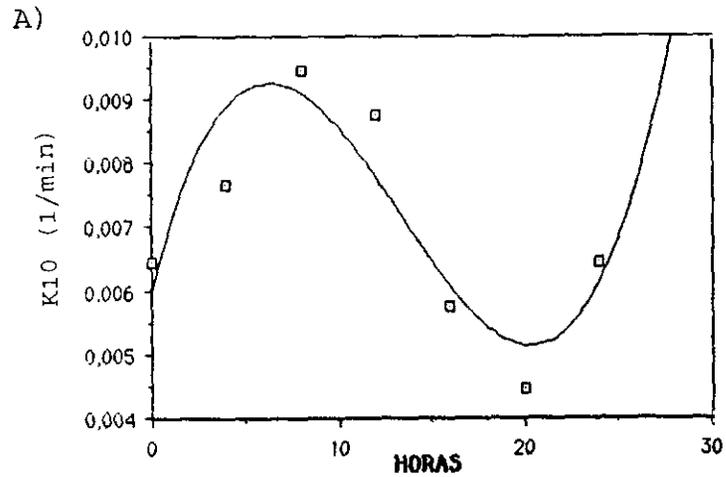
FIGURA IV.18.- Estudio cronobiológico de $t_{1/2\beta}$ en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

K ₂₁	0-12 h		4-16 h		8-20 h		12-0 h		16-4 h	
0-12 h	0-12 h									
4-16 h	N.S.		4-16 h							
8-20 h	N.S.		N.S.		8-20 h					
12-0 h	N.S.		N.S.		N.S.		12-0 h			
16-4 h	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		16-4 h	
20-8 h	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	20-8 h

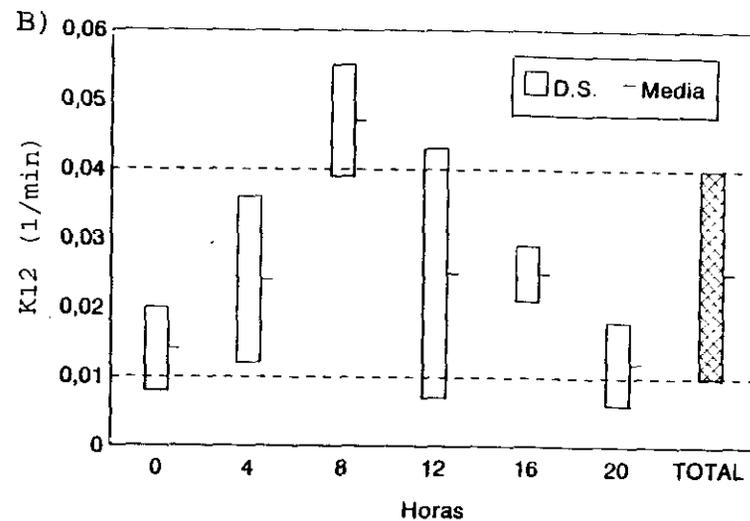
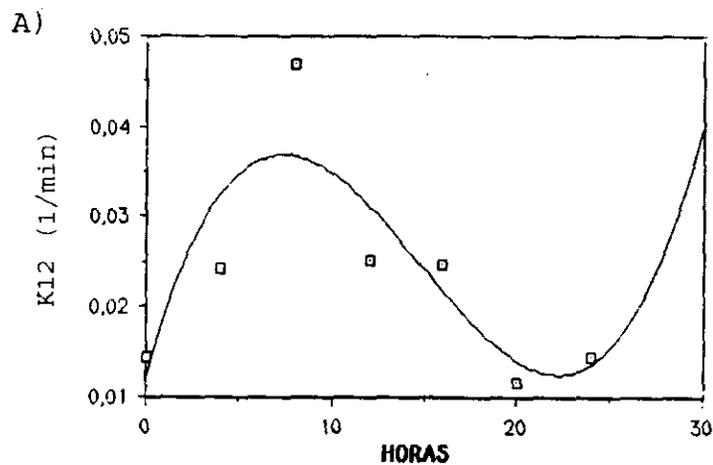
FIGURA IV.19.- Estudio cronobiológico de K_{21} en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

K10							
0-12 h	0-12 h						
4-16 h	N.S.	4-16 h					
8-20 h	S.	N.S.	8-20 h				
12-0 h	S.	N.S.	N.S.	12-0 h			
16-4 h	N.S.	N.S.	S.	S.	16-4 h		
20-8 h	S.	S.	S.	S.	S.		

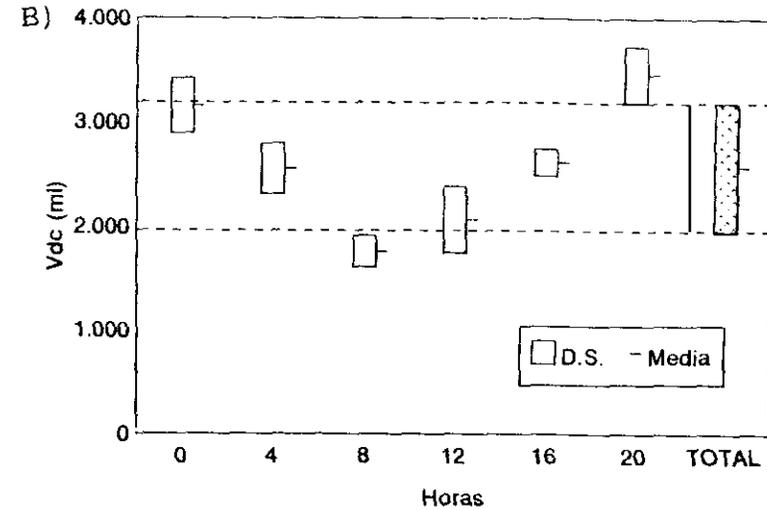
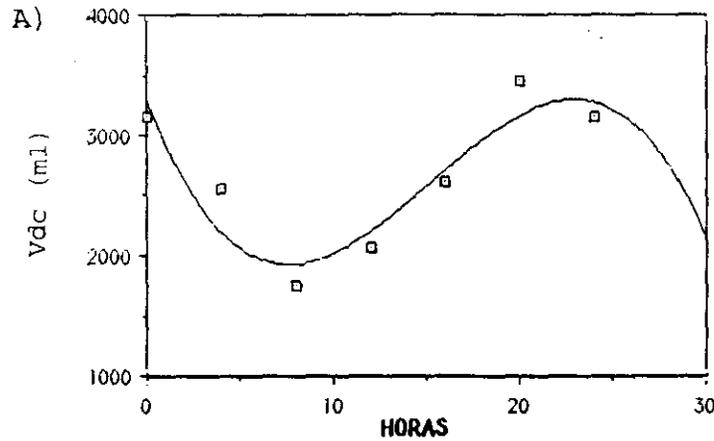
FIGURA IV.20.- Estudio cronobiológico de K_{10} en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

K12						
0-12 h	0-12 h					
4-16 h	ns.	4-16 h				
8-20 h	s.	s.	8-20 h			
12-0 h	ns.	ns.	s.	12-0 h		
16-4 h	s.	ns.	s.	ns.	16-4 h	
20-8 h	ns.	ns.	s.	ns.	s.	

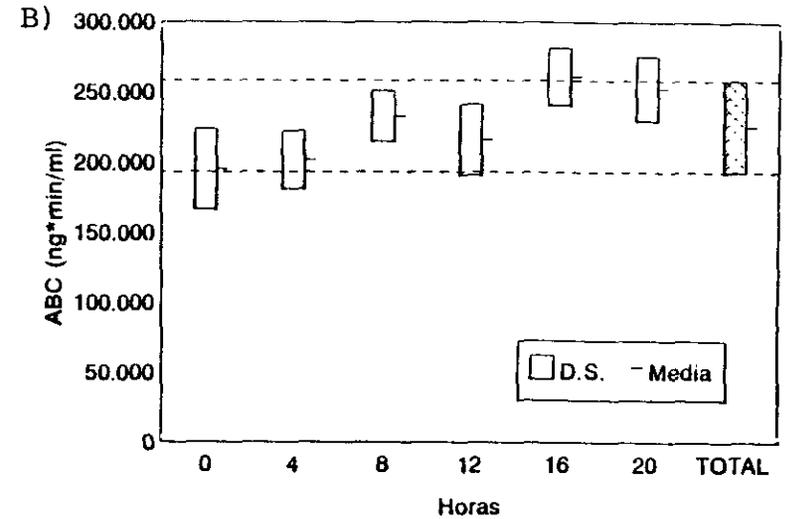
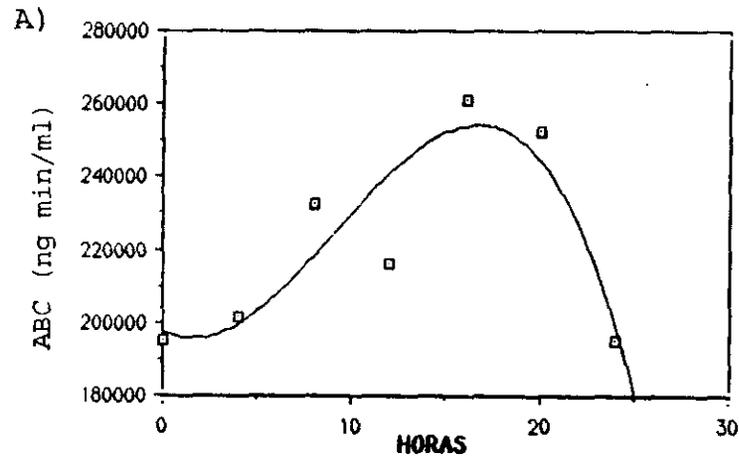
FIGURA IV.21.- Estudio cronobiológico de K_{12} en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

Vdc							
0-12 h	s.	0-12 h					
4-16 h	s.	4-16 h					
8-20 h	s.	s.	8-20 h				
12-0 h	s.	N.S.	N.S.	12-0 h			
16-4 h	s.	N.S.	s.	s.	16-4 h		
20-8 h	N.S.	N.S.	s.	s.	s.		

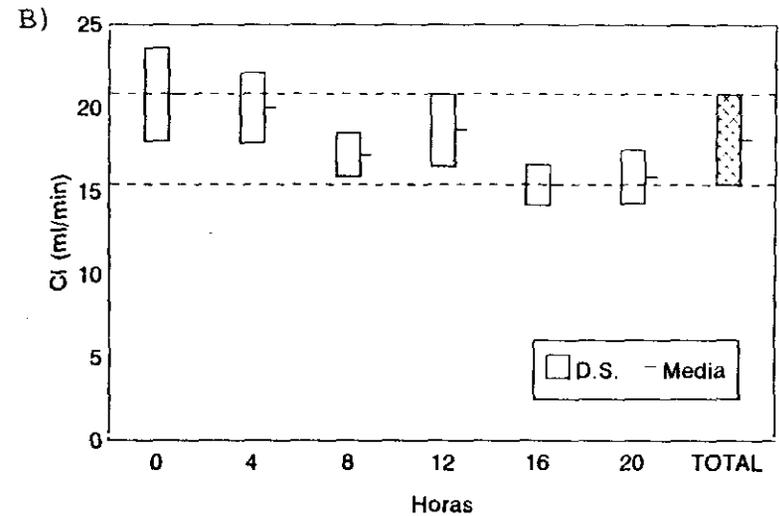
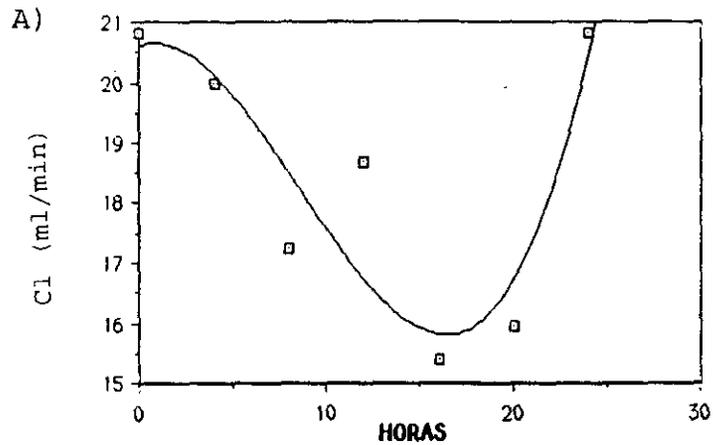
FIGURA IV.22.- Estudio cronobiológico de V_{dc} en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total ($n=29$). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

ABC						
0-12 h	0-12 h					
4-16 h	N.S.	4-16 h				
8-20 h	S.	S.	8-20 h			
12-0 h	N.S.	N.S.	N.S.	12-0 h		
16-4 h	S.	S.	S.	S.	16-4 h	
20-8 h	S.	S.	N.S.	N.S.	N.S.	

FIGURA IV.23.- Estudio cronobiológico de ABC en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total (n=29). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).



C)

CI								
0-12 h	0-12 h							
4-16 h	N.S.	4-16 h						
8-20 h	N.S.	N.S.	8-20 h					
12-0 h	N.S.	N.S.	N.S.	12-0 h				
16-4 h	S.	S.	N.S.	N.S.	16-4 h			
20-8 h	S.	S.	N.S.	N.S.	N.S.			

FIGURA IV.24.- Estudio cronobiológico de Cl en los distintos horarios de luz: A) Ajuste de los valores medios a un polinomio triexponencial. B) Desviación de la medias del parámetro respecto a la media total (n=29). C) Comparación estadística de las medias del parámetro entre los distintos periodos de luz mediante la prueba de Mann-Whitney (S. = diferencia significativa; N.S. = diferencia no significativa).

V.- DISCUSSION

V.- DISCUSION

V.1.- ESTUDIO CRONOTOXICOLOGICO

El motivo de realizar este estudio previo, fue comprobar el comportamiento del Acetato de Ciproterona, administrado a horas diferentes, mediante un sistema de resultados absolutos (vida-muerte), para proseguir con estudios más profundos, si el resultado era adecuado a nuestros propósitos.

Antes de realizar el estudio cronotoxicológico, fue necesario calcular la DL_{50} del Acetato de Ciproterona para ratones homocigóticos C57BL/6, ya que las referencias previas en otras especies o cepas mostraban variaciones que oscilaban entre 100 y 4.000 mg/Kg P.V. por vía intraperitoneal (GÜNZEL, 1971).

Una vez obtenida la DL_{50} de 1023 mg/kg P.V. por vía intraperitoneal, se sometieron los diferentes lotes de ratones a un período de adaptación al nuevo horario de 15 días. Tiempo que consideramos suficiente para modificar su reloj biológico, coincidiendo con los datos aportados por SILVAN y col. (1990) e ILLERA y col.(1992), aunque algunos autores sostienen que este tiempo tiene que ser mayor (HILFENHAUS, 1976; PHILIPPENS, 1976).

El período LO 12-12h, temperatura 25°C y humedad 50-55 % coinciden con

los valores de un día tipo medio en nuestra latitud (primavera-otoño en Madrid). Otros autores indican que los períodos de LO más idóneos son de 10-14h (NEUBERT y col., 1976; SILVAN y col., 1990), pero no hacen referencia ni a la temperatura ni a la humedad. Existen trabajos en los que se modifican los horarios y mantienen fija la temperatura y la humedad, observando como influyen estos factores sobre la liberación de hormonas (SILVAN y col., 1990). Consideramos que los tres se deben tratar en conjunto para que se asemeje lo más posible a las condiciones reales y sobre todo para estandarizar las pruebas.

Los resultados de nuestro estudio cronotoxicológico muestran un claro comportamiento rítmico, algo que era de esperar debido a las variaciones horarias que los niveles de testosterona presentan en el organismo (MONSALTVAJE, 1981) y en consecuencia, las posibles modificaciones en el comportamiento de éste frente al metabolismo o bloqueo de la hormona.

La acrofase (momento de mayor mortalidad) se produce a las 15h 28 min, que para un animal nocturno como el ratón, es cuando sus constantes orgánicas se encuentran más deprimidas (MITRUKA y col., 1977).

Aunque cualquier extrapolación es siempre arriesgada y faltan muchas pruebas por realizar, creemos que estos resultados abren nuevas expectativas, para adaptar los actuales tratamientos existentes en medicina humana, a unas pautas

cronoterapéuticas que permitan modificar las dosis terapéuticas, disminuyendo de esta forma los efectos secundarios, sin perder eficacia.

Para ello decidimos profundizar en las posibles variaciones farmacocinéticas que presenta este compuesto en función del horario de administración.

V.2.- ESTUDIO CRONOFARMACOCINETICO

V.2.1.- Método

Para la detección y cuantificación de las concentraciones de AC en plasma, se ha utilizado un método analítico que consideramos válido, teniendo en cuenta los resultados de las pruebas control. La linealidad (entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$), la reproducibilidad ($< 5\%$) y el límite de detección ($< 0,1 \mu\text{g/ml}$) son apropiados, teniendo en cuenta los niveles plasmáticos esperados del fármaco (0,1-2 $\mu\text{g/ml}$).

El método descrito permite separar claramente el frente de picos cromatográficos debidos a los componentes plasmáticos, al patrón interno y al AC. La proporción de fase móvil 60:40 de acetonitrilo:agua, coincide con la de SCOTT y col. (1987), quienes determinaron el compuesto a partir de tabletas comercializadas. En cambio, otros autores que, al igual que nosotros, detectaban el fármaco en plasma utilizaban acetonitrilo:agua (65:35) (FRITH y col., 1985) y metanol:agua (70:30) (CANNELL y col., 1981).

La recuperación a partir del plasma es del 81% para el AC y del 91% para el patrón interno. Estos porcentajes son más elevados que los conseguidos por FRITH y col.(1985) de 78% para el AC y 84% para el patrón interno (Propionato de Ciproterona) y no llegan a los valores de CANNELL y col (1981) de 88% para

el AC y 95% para el 17 α -Hidroxiprogesterona. No obstante, al intentar reproducir este último método no obtuvimos los mismos resultados que describen estos autores. Debemos indicar que el método elegido por nosotros para analizar el AC en plasma es suficientemente válido y no conlleva la complejidad que representaba el método descrito por CANNELL y col., (1981).

Las muestras de plasma podían mantenerse en congelación (-20°C), sin que se alterase la concentración del fármaco durante al menos 15 días, lo que permitió realizar las pruebas con un amplio margen de tiempo y de confianza.

La longitud de onda a la que el AC muestra una máxima absorbancia ($\lambda = 283\text{nm}$) es igual a la señalada por FRITH y col. (1985) y CANNELL y col. (1981).

El patrón interno elegido fue la 17 α -hidroxiprogesterona utilizada por CANNELL y col.(1981). Las diferentes pruebas realizadas (tiempo de retención, resolución, linealidad, recuperabilidad, etc.) hacen que este compuesto, con la fase móvil utilizada en nuestro método, cumpla con el fin asignado y de esta forma valide el trabajo de procesado (HAEFELFINGER, 1981).

El procesado de las muestras se basó en la desproteinización mediante una solución alcalina (OHNa 2,5M) y una extracción con acetato de etilo. Este método se diferencia del descrito por CANNELL y col. (1981) en la no utilización de la

cromatografía en columnas de silicagel. A pesar de ello, los frentes biológicos no interferían en ningún caso con los picos del P.I. y del Acetato de Ciproterona.

V.2.2.- Acondicionamiento de los animales y toma de muestras

Al introducir a los animales en cámaras cronobiológicas y producirles un desfase de 4 horas entre los lotes, buscábamos facilitar la toma de muestras, puesto que después del período de adaptación, se tenía a los animales en "distintas horas" en un mismo instante.

Pero no sólo es importante el cambio de horario, sino que desde el punto de vista de estandarización, conseguíamos que todos los animales estuvieran en las mismas condiciones de temperatura, humedad, alimentación, manejo, etc..., disminuyendo de esta forma la influencia de otros factores que podrían modificar el ritmo (MAYERSBACH, 1976). Siendo inicialmente las diferencias individuales de los animales y el horario, los responsables de las variaciones que se pueden dar en los diferentes parámetros farmacocinéticos.

Para realizar el estudio cronofarmacocinético de un fármaco, se pueden elegir varias modalidades de acuerdo con los diferentes autores: 2 administraciones en horarios opuestos (con un intervalo de 12 horas) (LESKA y col., 1980; NAKANO y col., 1982 y 1984; LEVI y col., 1985; RUSSELL y col., 1988), 3 administraciones (con un intervalo de 8 horas) (Altmayer y col., 1979; HRUSHESKY y col., 1982; GUISSOU y col., 1987), 4 administraciones (con un intervalo de 6 horas) (OLLANGNIER y col., 1987) o 6 con intervalos de 4

horas(COSTAS,E., 1989). Nosotros elegimos este último sistema, porque ante la ausencia total de datos previos, cuantos más puntos se abarquen, consideramos que se podrían definir mejor las gráficas y en consecuencia el ritmo. Eligiendo pocos puntos se corría el riesgo de que los mismos no fueran valores extremos y no demostraríamos el posible comportamiento cronobiológico.

Para la adaptación al nuevo horario, hemos utilizado un período de 15 días, tiempo que ha sido considerado adecuado por diferentes autores (SILVAN y col., 1990; ILLERA y col., 1992). Aunque otros indican que este tiempo debe ser mayor (HILFENHAUS, 1976; PHILIPPENS, 1976). Si bien es cierto que a mayor tiempo mayor adaptación, consideramos este periodo de 15 días suficiente para conseguir un cambio eficaz del reloj biológico, variando notablemente según las especies.

El período LO de 12/12, temperatura 25°C y humedad 50-55% son semejantes a los valores de un día tipo medio en nuestra latitud (primavera-otoño en Madrid). Consideramos que los tres factores se deben tratar en conjunto para reproducir más fidedignamente las condiciones reales y sobre todo estandarizar las pruebas.

En distintos trabajos se han probado horarios LO diferentes (10/14, 12/12, 14/10, 16/8, etc...) con una humedad y una temperatura constantes, indicando cual de ellos es el considerado como más adecuado (MAYERSBARCH, 1976;

NEUBERT y col., 1976; SILVAN y col., 1990; ILLERA y col., 1992), pero ya hemos indicado en varias ocasiones que nuestro propósito es estandarizar y por esto trabajamos bajo las condiciones previamente descritas.

V.2.3.- Influencia del tiempo sobre los procesos farmacocinéticos

En cronobiología existen dos escuelas; la primera llamada de las leyes de transmisión, en la que pusieron a punto un programa, con funciones matemáticas cosenoidales (COSENOR), que sometía a todas las constantes biológicas a este método, de tal manera que las que se ajustaban a este procedimiento se podía afirmar, que presentaban variaciones periódicas influenciadas por el tiempo, mientras que en las que no se ajustaban el tiempo no influía (HALBERG, 1969; REINBERG y HALBERG, 1971; REINBERG, 1992).

La segunda escuela, denominada de base molecular, aplica una estadística clásica. Sometía a los diferentes organismos a desfases de luz, posteriormente sacaba las constantes estudiadas y las medias de cada horario, comparandolas con la "gran media". Si esta última tenía un desviación típica muy grande, podríamos afirmar que el tiempo modifica las constantes estudiadas. En pasos posteriores las someten a diferentes estudios matemáticos -fourier, espectral, series temporales- incluso el COSENOR para establecer si esas variaciones debidas al tiempo, tienen o no un comportamiento periódico y rítmico (EDMUNDS, 1983).

Desde el punto de vista farmacológico lo más importante es la modificación del comportamiento de los diferentes parámetros farmacocinéticos en función del tiempo, no intentar ajustarlos a un determinado ritmo, por ejemplo el circadiano.

Debido fundamentalmente a que cada uno de los parámetros estudiados dependen a su vez de distintos procesos: unión a proteínas, procesos metabólicos, activación o inactivación enzimática, variación en las concentraciones, niveles hormonales, etc..., que a su vez se rigen por diferentes ritmos (circadianos, ultradianos e infradianos) (REINBERG y HALBERG, 1971; REINBERG, 1992).

Por estas razones en orden de importancia, lo primero es ver si se modifican los procesos con el tiempo, después comprobar si son periódicos, y por último intentar ajustarlos a un ritmo.

V.2.4.- Farmacocinética

La cinética que realizamos no fue completa, la elección de 6 horas se debió a que no teníamos intención de realizar una farmacocinética en el sentido estricto de la palabra, sino una comparación de parámetros.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de pruebas previas realizadas por nosotros en conejos, y el estudio farmacocinético en otras especies (HÜMPEL y col., 1980; BECKER y col., 1980; DÜSTERBERG y col. 1981 y 1984), la semivida del fármaco es superior a 24 horas. Sí nosotros hubieramos tenido que utilizar todo este tiempo, se nos habrían presentado problemas de manejo que nos inducirían un fuerte estres que podría alterar el reloj biológico del animal, con la consecuente adición de factores que influirían en los ritmos (MAYERSBASCH, 1976).

De hecho, tres de los siete conejos descartados, murieron en las últimas horas del período de extracción, por lo que decidimos retirar sus datos, ya que el fuerte estres que habían sufrido es causa suficiente para alterar los resultados.

V.2.5.- Elección de parámetros

Los parámetros obtenidos fueron: A, B, α , β , $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, K_{21} , K_{12} , K_{10} , MRT, Vdc, ABC y Cl, de los cuales elegimos para el estudio cronobiológico: α , β , $t_{1/2}$ de α y β , K_{21} , K_{12} , K_{10} , Vdc, ABC y Cl.

Los parámetros seleccionados son los utilizados normalmente por los diferentes autores que trabajan en cronofarmacocinética (NAKANO y col., 1982 y 1984; LEVI y col., 1985; GUISSOU y col., 1987; RACKLEY y col., 1988).

Los coeficientes A y B no se eligieron puesto que dependen directamente de α y β , es decir son datos extrapolados de estos y sus modificaciones son directamente proporcionales a α y β (WAGNER, 1983; PLA y col., 1982).

El MRT se descartó porque realizamos durante 6 horas la obtención de muestras y para la validación de este parámetro es necesario realizar una farmacocinética completa.

El primer paso, según la teoría de Edmunds (1983), fue comprobar si los distintos parámetros variaban en función del tiempo, por lo que se hicieron para cada uno de ellos comparaciones paramétricas (t de Student) y no paramétricas (U de Mann-Whitney); estableciendo así, si las diferencias eran o no estadísticamente

significativas.

La existencia de estas diferencias, nos condujo a realizar un estudio mediante el ajuste a una ecuación polinomial triexponencial de las medias de los parámetros, para confirmar si las variaciones en función del tiempo eran periódicas. *Debemos aclarar que para una mayor precisión de este método tendríamos que haber valorado dos ciclos seguidos, pero en farmacocinética supondría repetir toda la experimentación, pues cada ciclo supone una cinética y no era éste el objetivo fundamental.*

Por último se intentaron ajustar las medias de los parámetros a un ritmo circadiano por el método COSENER (HALBERG, 1969).

Como aparece en el apartado de resultados, unos parámetros se ajustan mejor que otros a cada una de estas funciones, por lo que hemos realizado una discusión pormenorizada de cada uno de ellos, para finalmente desarrollar una idea de conjunto.

V.2.6.- Estudio individualizado de los parámetros

α : observamos que en los animales con período de luz de 8 a 20 horas, considerados como los que más se asemejan a los animales que se encuentran en condiciones ambientales naturales, presentan diferencias estadísticamente significativas con los lotes de luz de 4 a 16 h, 16 a 4 h y 20 a 8 h. El ajuste polinomial es del 79% y el COSENOR del 65%.

Este parámetro al estar relacionado con la fase de eliminación rápida, no se ve afectado por la duración de la farmacocinética (6 horas) y reflejaría de forma válida las modificaciones reales sufridas por esta constante de eliminación según la hora de inyección.

El tipo de curva es semejante al de los otros procesos de eliminación (β , K_{12} , K_{10}), presentando un máximo a las 7:30 horas y un mínimo prácticamente en horario opuesto a este.

Las pequeñas diferencias pueden estar basadas, en que esta constante de eliminación se produce antes de alcanzar el equilibrio de las concentraciones entre los compartimentos. Existiendo un exceso de fármaco en el compartimento central (WAGNER, 1983).

El hecho de tener un 79 % de ajuste polinomial reflejaría un buen comportamiento periódico y el 20% dependería de factores externos como sistemas de procesado, variaciones interindividuales, etc...

El 65% de ajuste al método COSENOR, también implica un ritmo circadiano aceptable.

β : tiene el mismo tipo de diseño que α en el ajuste polinomial, aunque un poco más bajo (70%), demostrando una periodicidad aceptable. En cambio, el COSENOR presenta un mal ajuste (35%), pudiendo ser debido a que el ritmo a que se adapta sea ultra o infradiano.

No obstante, β es un parámetro que puede estar mal definido, teniendo en cuenta que la cinética no fue completa, y esta constante de eliminación queda definida a partir del momento que se alcanza el equilibrio entre los compartimentos. Los puntos utilizados para definir la curva, la pueden separar de su valor real; no obstante, al cometerse el mismo error para todas, la comparación es válida. Esta comparación pone de manifiesto la diferencias entre los lotes con luz de 16 a 4 hs y de 20 a 8 hs, entre sí y con el resto de los grupos, volviendo a quedar patente la influencia del factor tiempo.

Los $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ presentan un comportamiento opuesto a α y β , puesto que

son inversamente proporcionales a estas últimas:

$$t_{1/2\alpha} = \text{Dosis}/\alpha \quad t_{1/2\beta} = \text{Dosis}/\beta$$

Los $t_{1/2}$ presentan una acrofase diferente que para α es de -5 rad (19:05 h) y para β es de -6 rad (22:55 h). Sin embargo, las acrofase de las constantes α y β son iguales, -2 rad (7:38 h). Esto podría ser debido al tipo de ajuste realizado, que hace que no estén totalmente ajustados a los valores, sobre todo si tenemos en cuenta los índice de probabilidad ($t_{1/2\alpha}$ 57% y $t_{1/2\beta}$ 45%) obtenidos con el COSENOR. En cuanto a las representaciones polinomiales, practicamente están invertidas, pues el ajuste es el mismo para cada constante de eliminación.

K_{10} : es una constante de eliminación del compartimento central al exterior. Los lotes con luz de 20 a 8 h y de 16 a 4 h presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a casi todos los demás lotes. El grupo de 0 a 12 h presenta diferencias con el de 8 a 20 h y con el de 12 a 0 h. En general, los lotes con más separación horaria presentan mayores diferencias que los más próximos.

El ajuste tanto polinomial (90%) como COSENOR (93%) es elevado. Esto indica la existencia de una influencia importante de la luz y además la presencia de un ritmo circadiano, siendo la acrofase o momento de mayor eliminación de -2 rad (7:38 h).

Los procesos de eliminación dependen de la fracción de fármaco libre, y por

tanto de la capacidad de unión a proteínas. También influyen los procesos de metabolización hepática y la filtración glomerular (PLA y col., 1982). En todos estos procesos se ha demostrado previamente la existencia de ritmos circadianos (VETMATSU y col., 1986; CLENCJ y col., 1981; NAKANO y col., 1984; RACKLEY y col., 1988; TAYLOR y col., 1983 y 1984). Estos hechos determinan en gran medida los valores que hemos obtenido.

En trabajos que describen las modificaciones farmacocinéticas en administración vía oral, indican que los procesos de absorción intestinal están modificados no sólo por la hora en que se toma el alimento, sino por el flujo de sangre de la región intestinal en un momento dado (ritmos cardiacos, tensión arterial, pH sanguíneo y urinario, temperatura, etc...) (Altmayer y col., 1979; CAVALLANI y col., 1987; KABASAKALIAN y col., 1970). En un proceso de eliminación sucede lo mismo con la sangre que llega al glomérulo renal (PLA y col., 1982; GUISSOU y col., 1987; WOOD y GARRETTSON, 1983).

K_{12} : tiene un diseño similar a la K_{10} ; está influenciada por los mismos procesos, pero en lugar de ser una eliminación hacia el exterior es hacia el compartimento periférico.

El lote con horas de luz de 8 a 20 h posee diferencias estadísticamente significativas con los demás. El ajuste polinomial es del 86%, y el COSEÑOR del

77%, con la acrofase a las 7:38 h.

Lo explicado para la constante anterior se podría aplicar a este parámetro, excepto lo referente a los procesos de eliminación renal.

K_{21} : es una constante de absorción del compartimento periférico al central. Al no presentar diferencias estadísticamente significativas entre los lotes, no sería necesario ver el tipo de periodicidad. No obstante, al realizarlo se comprueba la falta de ajuste por cualquier de los métodos utilizados.

No disponemos de otra constante de absorción para comparar con ella y saber si las mismas presentaban un comportamiento periódico con ritmos ultra, infradianos o circadianos, como se ha descrito en otros trabajos (ALTMAYER y col., 1979; CLENCH y col., 1981; WOOD y GARRETTSON, 1983). Por ello, consideramos que la falta de periodicidad se debe exclusivamente a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas.

CI : por ser un proceso de eliminación está intimamente ligado a las K_{10} y K_{12} . Los lotes de horas de luz de 0 a 12 h y de 4 a 16 h presentan diferencias significativas con el de 16 a 4 h y con el de 20 a 8 h. El ajuste polinomial del 89%, implica un gran periodicidad, que es del mismo grado que la descrita para la K_{10} y K_{12} . De igual forma el COSENOR presenta una probabilidad del 61%, que es

inferior a las obtenidas para las constantes mencionadas. Esto podría ser debido a que influyen un mayor número de factores sobre esta constante de eliminación y por lo tanto que no se debe exclusivamente al tiempo.

También podría atribuirse a que es un valor sesgado, que se aleja de la realidad. Como ya hemos indicado anteriormente la comparación entre ellos es válida. Desde el valor mínimo ($Cl = 15,39$ ml/min del lote de 16-4 h) al máximo ($Cl = 20,83$ ml/min del lote de 0-12 h) hay una diferencia del 26,11%, dejando patente que la cantidad de fármaco eliminado va a tener una clara influencia del factor tiempo.

ABC: es un valor inverso a la constante de eliminación (Cl), como podemos observar tanto en la representación gráfica como en los valores de dos ajustes realizados. Los datos que nos aporta habitualmente este parámetro no son objeto de nuestro estudio.

Vdc: de todos los valores descritos hasta el momento, es el que mejor se ajusta tanto por el método polinomial (93%), como el COSENOR (98%). Quedando de manifiesto no sólo la periodicidad, sino su ritmo circadiano. Sus valores son opuestos a los procesos de eliminación (RACKLEY y col., 1988; CHAUWAN y col., 1986; GUISSOU y col., 1987).

Si comparamos los valores mínimos y máximos observamos, que desde el lote de 8-20 h con un valor de 1760 ml, al lote de 20-8 h con un valor de 3459 ml, hay una diferencia del 49,12 %. Por tanto existe una diferencia de un 50 % aproximadamente entre estos dos sistemas horarios opuestos.

Resultados obtenidos en trabajos previos realizados con Teofilina en distintas especies, indican que la relación aparente entre volúmenes de distribución de día y de noche, es apenas de un 10%, siendo notablemente inferior a la variación que experimenta la concentración en equilibrio, que oscila entre el 20% y el 30% (TAYLOR y col., 1984; RACKLEY y col., 1985).

Clench (1981) indica que para la Indometacina las concentraciones plasmáticas se reducen a la mitad cuando la hora de administración difiere en 12 h.

Diversos autores describen marcadas diferencias entre los niveles plasmáticos de teofilina, según la hora de comienzo de la perfusión endovenosa, después de 24 h de administración, cuando se suponen constantes los niveles (TAYLOR y col., 1984; RACKLEY y col., 1985); evitando de esta forma la influencia de factores distintos al tiempo.

En nuestros resultados queda igualmente patente la influencia del factor "tiempo de administración". Además de la gran diferencia de valores entre horarios

opuestos, que sería suficiente para manifestar su importancia, hay que destacar que tanto para el ajuste polinomial (periodicidad) como para el COSENOR (ritmo circadiano), tan sólo un 7% y un 2% respectivamente puede atribuirse a causas no temporales.

V.2.7.- Estudio global de los procesos cinéticos

Basandonos en los resultados obtenidos, la influencia del tiempo es patente en los procesos cinéticos del Acetato de Ciproterona.

En los estudios previos del cálculo de la DL_{50} , y su posterior ajuste a ritmos circadianos por el método COSENOT, se puso de manifiesto la gran influencia del tiempo sobre los efectos de dicho fármaco en el organismo. El hecho de utilizar ratones homocigóticos con mínimas diferencias interindividuales, y el término absoluto "muerte-vida" hizo que fuera más fácil precisar esta influencia.

En cambio en los parámetros farmacocinéticos, los resultados obtenidos de un 90% en cualquiera de los procesos de ajuste polinomial o cosenoidal, deja un escaso margen de influencia a los factores interindividuales y a otros tipos de hechos concomitantes: extracciones, manipulaciones, interacción entre diferentes procesos con ritmos iguales o distintos, etc.

En aquellos parámetros en los que la probabilidad es alrededor del 60%, los factores individuales tienen una mayor incidencia, pero sigue siendo importante la influencia del tiempo.

En todos los procesos biológicos son muchos los factores que quedan sin

controlar, por mucho que pretendamos estandarizar las pruebas. Concretamente en los procesos farmacocinéticos la implicación que tienen numerosos procesos concomitantes (ritmos cardiacos, tensión arterial, rutas metabólicas, actividad enzimática, número de proteínas plasmáticas, temperatura, pH sanguíneo y urinario, etc...). Cada uno de ellos tiene ritmos propios, esto hace que resulte muy difícil analizar el porcentaje de responsabilidad de cada uno sobre el resultado final. A pesar de ello, nuestros resultados demuestran que en mayor o menor grado los organismos responden de forma muy diferente pero predecible, según el momento en el que se encuentra su reloj biológico.

Todo ello nos induce a compartir el pensamiento de Fernández-Rañada, que opina que los sistemas dinámicos tienen, a la vez, comportamientos regulares y caóticos, la nueva visión que emerge hoy es la de un mundo probabilista, en la que se imbrican y entreveran cadenas causales deterministas que terminan cuando se destruye totalmente la cantidad de información sobre el estado inicial. La manera de evitar esta pérdida de la información sería tener una cantidad infinita de datos; pero, siendo los hombres criaturas finitas, esto es imposible. Por eso dice Prigogine que estamos condenados a ver el mundo a través de una ventana temporal. De este modo, orden y caos, determinismo y probabilidades se juntan y complementan en un mundo que resulta así más complejo y rico que la visión fría del mecanicismo y cuyo comportamiento se sigue de la acción intimamente ligada de azar y necesidad (FERNANDEZ-RAÑADA, 1990).

VI.-CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- La DL_{50} del Acetato de Ciproterona administrado por vía intraperitoneal a ratones homocigóticos C57BL/6 es de 1023,7 mg/kg P.V. y se ajusta a un ritmo circadiano ($p < 0,04$) con la acrofase a las 15h 28 min.

- 2.- Las constantes de eliminación K_{10} , K_{12} y el aclaramiento se ajustan a ritmos circadianos en diferentes proporciones (93%, 77% y 61%, respectivamente) y todas ellas presentan un elevado porcentaje de periodicidad (90%, 86% y 89%, respectivamente), que pone de manifiesto las variaciones en la capacidad de eliminación orgánica según la hora de administración.

- 3.- El volumen de distribución central presenta valores extremos entre los lotes de luz 8-20 h (1760 ml) y 20-8 h (3459 ml), con una diferencia próxima al 50% entre ellos. Este parámetro se ajusta a ritmos circadianos ($p < 0,001$) con la acrofase a las 22h 55min.

- 4.- Los parámetros β , $t_{1/2\beta}$ y $t_{1/2\alpha}$ demuestran un alto grado de periodicidad (62%, 70% y 79%, respectivamente) pero no se ajustan a ritmos circadianos.

5.- El Acetato de Ciproterona presenta variaciones en su comportamiento cinético (I.V. en conejo), dependiendo de la hora de administración. Este factor se debe tener en cuenta en el tratamiento de los diferentes procesos en los que se utilice.

VII.- RESUMEN

VII.- RESUMEN

Se ha realizado un estudio para ver la influencia del factor "tiempo de administración" sobre la Farmacocinética del Acetato de Ciproterona en conejos por vía endovenosa.

En primer lugar se determinaron la DL_{50} en ratones homocigóticos C57BL/6 (1023,7 mg/kg) y la modificación de la misma según la hora de inyección, en 6 lotes diferentes, con una diferencia horaria de 4 h entre lotes, con resultados que ponen de manifiesto esta influencia.

A continuación se realizó una cinética endovenosa (4mg/kg) de Acetato de Ciproterona sobre 36 conejos, en 6 lotes. Cada lote se consideraba como un valor individualizado de hora (0-12, 4-16, 8-20, 12-0, 16-4 y 20-8) con el fin de compararlos entre sí.

Las muestras de sangre se procesaron para su posterior análisis por HPLC, utilizando como P.I. la 17 α -hidroxiprogesterona. Los datos plasmáticos se ajustaron a ecuaciones biexponenciales (PKCALC).

Los resultados obtenidos de α , β , $t^{1/2}\alpha$, $t^{1/2}\beta$, K_{10} , K_{12} , K_{21} , ABC, Vdc y Cl, se sometieron a un análisis estadístico con comparaciones paramétricas (t de Student)

y no paramétricas (U de Mann-Whitney) y a un ajuste por los métodos polinomial triexponencial y COSENOR, poniendo de manifiesto el mayor o menor grado de influencia del tiempo de administración sobre estos parámetros.

En todos los casos hubo claro índice de periodicidad (del 62% para β al 93% para V_{dc} , excepto K_{21} , 40%). El ajuste a ritmos circadianos no se produjo en todos los casos (K_{21} , 22% y β , 35%), posiblemente debido a la falta de diferencia estadísticamente significativa. En otros casos, la influencia de factores no controlados llegó a ser del 20-35% (α , K_{12} , ABC y CI) y en el V_{dc} y K_{10} el comportamiento fue claramente rítmico (98% y 93%, respectivamente).

En conjunto, el Acetato de Ciproterona está fuertemente influenciado por el factor "tiempo de administración" en su comportamiento farmacocinético endovenoso en conejos.

SUMMARY

A study about the influence of "administration time" on the endovenous pharmacokinetics of the Cyproterone acetate in rabbits has been made.

First, LD₅₀ in homozygotic C57BL/6 mice was calculated (1023.7 mg/kg). Modifications of LD₅₀ due to the administration time was studied, too. Six different groups of mice, with 4 hours differences were used. The obtained data show that influence.

Afterwards, a endovenously administration (4 mg/kg) of Cyproterone acetate was made. Rabbits (n=36) were distributed in six groups; each group was considered as a single value of time (0-12, 4-16, 8-20, 12-0, 16-4 and 20-8). So, pharmacokinetic parameters can be comparing between couples of them.

Blood samples were processing for HPLC analysis. 17 α -Hydroxyprogesterone was used as Internal Standard. Plasmatic data were fitted to a biexponential equation (PKCALC).

Parametric (Student's t) and non parametric (Mann Whitney's U) test were used to compare the obtained data for α , β , $t^{1/2}\alpha$, $t^{1/2}\beta$, K_{10} , K_{12} , K_{21} , AUC, Vdc and Cl. Triexponential polynomial and cosinoidal (COSINOR) fittings were made

to discover the degree of influence of the administration time on these parameters.

All of them showed a clear periodicity index (from 62% for β to 93% for V_{dc} , excepting K_{21} , 40%). Some parameters can not fit to a circadian rhythm (K_{21} , 22% and β , 35%). It may be due to the absence of statistical differences. In other instances, the non controlled factors influence was about 20-35% (α , AUC and CI), in another ones (V_{dc} and K_{10}) rhythmic behaviour was shown (98% and 93%, respectively).

Finally, the pharmacokinetics behaviour of the Cyproterone acetate by endovenous administration in rabbits is greatly affected by the "administration time" factor.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- ALTMAYER,V.; GROTERATH,E.; LÜCKER,P.; MAYER,D.; MAYERSBACH,V.; RINDT,W. y WETZELSBERGER,K. (1979).Zirkadiane Schwankungen pharmakokinetischer Parameter nach oraler Gabe von Hexobarbital¹⁾. **Arzneim. Forsch.** 29 1922-1929.

- AMER,M.; RAMADAN,A. y ABDEL MONEM,A. (1985). Anti-androgens in treatment of acne vulgaris. **Int. J. Dermatol.** 24 (8): 533-534.

- ANDRIOLE,G.; RITTMASER,R. y LORIAUX,D. (1987). The effect of 4 AM, a potent inhibitor of 5 α -reductase, on the growth of androgen-responsive human genitourinary tumors grown in athymic nude mice. **Prostate** 10: 187-198.

- AYDINLIK,S. (1987). Resultados de un amplio estudio abierto en fase III con Diane-35. **New developmets in Biosciencias** 3: 229-237.

- BABA,S.; MURAI,M. y JITSUUKAWA,S. (1978) Antiandrogenic effects of spironolactone: hormonal and ultrastructural studies in dogs and men. **J. Urol.** (119) 375-383.

- BANDYK,M.; SAWCZUK,I. y OLSSON,C. (1990). Characterization of the products of a gene expressed during androgen-programmed cell death and their potential use as a marker of urogenital injury. (1990). **J.Urol.** 143: 407-419.

- BECKER,H.; DUSTERBERG,B. y KLOSTERHALFEN,H. (1980). Biovetugbrkeit von cyproteron acetat nach oraler un intramuskularet applikation bei mannern. **Urologia Internationalis** 35: 381-385.

-
- BELANGER, P.; LABRECQUE, G. y DORE, F. (1982). Chronopharmacocinetique des agents anti-inflammatoires non-steroidiens chez le rat. **Tribune Medicale. Suppl. 1:** 14-20.
- BINGHAM, C.; ARBUGAST, C.; CORNELISSEN, G.; LEE, J. y HALBERG, F. (1982). Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. **Chronobiologia** 9: 397-439.
- BINGHAM, C.; CORNELISSEN, G.; HALBERG, E. y HALBERG, F. (1984). Testing period for single cosinor: extent of human 24 H cardiovascular synchronization on ordinary routine. **Chronobiologia** 11: 263-274.
- BHIWGADE, D, A; MENON, S. y AVARI, K. (1990). Effect of cyproterone acetate on testis of albino rats: ultrastructural and biochemical approach. **Indian J. Exp. Biol.** 28(3): 201-207
- BROWN, T.; ROTHWELL, S.; SULTAN, C. y MIGEON, C. (1981). Inhibition of androgen binding in human foreskin fibroblast by antiandrogens. **Steroids** 37: 635-648.
- BRUCHOVSKY, N.; RENNIE, P. y COLDMAN, A. (1990). Effects of androgen withdrawal on the stem cell composition of the Shionogi carcinoma. **Cancer Res.** 50: 2275-2291.
- BURTON, J.; LASCHET, U. y SHUSTER, S. (1973). Reduction of sebum excretion in man by antiandrogen, cyproterone acetate. **British Journal of Dermatology** 89: 487-490.
- CAL, J.; DORIAN, C. y CAMBAR, J. (1985). Circadian and circannual changes in
-

nephrotoxic effects of heavy metals and antibiotics. *Ann. Rev. Chronopharm.* 2: 143-176.

- CANNELL, G.R; MORTIMER, R y THOMAS, M. (1981). High-performance liquid chromatographic estimation of cyproterone acetate in human plasma. *Journal of Chromatography* 226: 492-497.

- CAPEN, C.C. y MARTIN, S.L. (1991). Glándula hipófisis. *En* *Endocrinología veterinaria y reproducción*. Ed. McDonald, L.E.. Interamericana-McGraw-Hill. (Mexico). pp.18-55.

- CADORNIGA, R. (1990). Cronofarmacocinética. Implicaciones Terapéuticas. *Anales Real Academia de Medicina Tomo CVII*: 185-214.

- CAVALLINI, M.; HALBERG, F.; SUTHERLAND, D.; CORNELISSEN, G.; HEIL, J. y NAJARIAN, J. (1987). Optimization by timing of oral cyclosporine to prevent acute kidney allograft rejection in dogs. *Transplantation*. 41: 654-657.

- CITRIN, D.; KIES, M. y WALLEMARK, C. (1985). A phase II study of high-dose estrogens (diethylstilbestrol diphosphate) in prostate cancer. *Cancer* 56: 457-463.

- CLENCH, J.; REINBERG, A.; DZIEWANOWSKA, Z.; GHATA, J. y SMOLENSKY, M. (1981). Circadian changes in the bioavailability and effects of indomethacin in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 20: 359-369.

- CONSU, F. (1979). Etude des elements chronologiques du centre Anti-poisons de Paris relations possibles avec chronobiologie et chronotoxicite. *Actualités toxicologiques* 111: 95-118.

-
- CORNELISSEN,G.; HALBERG,F.; STEBBINGS,J.; HALBERG,E.; CARANDENTE,F. y HSI,B. (1980). Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. **La Ricerca Clin. Lab.** 10: 333-385.

 - COSTAS,E. (1989). Cronobiología de las células oncógenas: modelos cronoterapéuticos. En Cronocancerología. Ed. Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer (Madrid).

 - CUNLIFFE,C. (1985). Acne vulgaris. The past, the present and the future. **Acta Derm. Venereol Suppl.** 120: 34-38.

 - CHANG,C.; CHODAK,G. y SARAC,E. (1989). Prostate androgen receptor: Inmuno histological localization and mRNA characterization. **J. Steroid Biochem.** 34: 311-332.

 - CHAUHAN,B.; DUSHI,B. y KULKARNI,R. (1986).Diurnal variation in the Pharmacokinetics of intravenous theophylline and etophylline in healthy subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 30: 635-636.

 - CHAUSSAIN,J.; COUPRIE,C.; LACAILLE,F.; SIMON,D. y JOB,J. (1988). Growth and precocious puberty. **Acta Paediatr. Scand Suppl.** 347: 38-43.

 - DALESIO,O. (1990). Complete androgen blockade in prostate cancer. Organizing an overview. **Cancer** 66 (5 suppl): 1080-1082.

 - DESCOVICH,G.; MONTALBETTI,N.; KUHLM,J.; RIMONDI,S.; HALBERG,F. y CEREDI,C. (1974). Age and catecholamine rhythms. **Chronobiologia** 1: 163-171.

 - DIAMOND,D. y BARRACK,E. (1984). The relationship of androgen receptor
-

levels to androgen responsiveness in the dunning R 3227 rat prostate tumor sublines. **J. Urol.** 132: 821-837.

- DORIAN,C.; CATROUX,P.; PATRIAT,C.; CAMBAR,J. (1987). Mise en evidence des antibiotiques aminoglycosidiques chez les rongeurs. **Actes de 112^o Congreso Societés Savantes Sciencies Fasc. III.**: 207-219.

- DÜSTERBERG,B. (1984). Plasma levels of levonorgestrel, gestodene, norethisterone and cyproterone acetate on single-dose subcutaneous administration in only solution in the rat, Beagle and Rhesus monkey. **Steroids** 43 (1): 43-56.

- DÜSTERBERG,B.; HÜMPEL,M. y SPECK,U. (1981). Terminal half-lives in plasma and bioavailability of norethisterone, levonorgestrel, cyproterone acetate and gestodene in rats, Beagles and Rhesus monkeys. **Contraception** 24 (6): 673-683.

- EATON,C.L. y GRIFFITHS,K. (1990). The role of endocrine therapy in prostatic cancer. **Baillieris Clin. Endocrinol. Metab.** 4 (1): 85-86.

- ERKOLA,R. (1990). Inhibidores de la ovulación con acetato de ciproterona o desogreltel en el tratamiento de síntomas hiperandrogénicos. **Acta Obsert. Gynecol. Scand.** 69: 61-65.

- FALSETTI,L.; DORDONI,D.; GASTALDI,C. y GASTALDI,A. (1986). A new association of ethynylestradio (0,035 mg) cyproterone acetate (2mg) in the therapy of polycystic ovary syndrome. **Acta Europea Fertilitatis** Vol.17, n.1.

- FLOREZ,J. y AMADO,J.A. (1992). Hormonas adenohipofisarias e hipotalámicas. En Farmacología humana. 2^a Ed. FLOREZ,J.; ARMIJO,J.A. y MEDIAVILLA,A. Masson-Salvat Medicina. (Barcelona). pp. 751-774.

- FERNANDEZ-RADAÑA, A. (1990). Orden y caos. Ed. Prensa Científica. (Barcelona). pp.3-8.

- FRITH, R. y PHILLIPOU, G. (1985). 15-Hydroxy cyproterone acetate and cyproterone acetate levels in plasma and urine. **Journal of Chromatography** 338: 179-186.

- FROHBERG, H. (1976). Introduction to the Symposium " What is the importance of chronobiology in toxicology and pharmacology". **Arch. toxicol.** 36: 181-184.

- FURR, B. (1989). "Casodex" (ICI 176,334) a new pure, peripherally selective antiandrogen: preclinical studies. **Horm. Res.** 32: 69-81.

- GAILLARD-MOGUILEWSKY, M. (1991). Pharmacology of antiandrogens and value of combining androgen suppression with antiandrogen therapy. **Urology** 37 (2 suppl.): 5-12.

- GELLER, J.; ALBERT, J. y YEN, S. (1978). Treatment of advanced cancer of prostate with megestrol acetate. **Urology** 21: 537-551.

- GELLER, J.; ALBERT, J. y NACHSTHEIM, D. (1984). Comparison of prostatic cancer tissue DHT levels at the time of relapse following orchiectomy or estrogen therapy. **J. Urol.** 132: 693-709.

- GELLER, J. y ALBERT, J. (1985). Adrenal androgen blockade in relapsed prostate cancer. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** 21(10): 1127-1131.

- GERVAIS, P. (1979). Les applications pratiques de la cronotoxicologie.

Actualités Toxicologiques. 111: 69-108.

- GIACONA,N.; ELVIN,A.; SLIGSOHN,E.; KAPUSNIK,J.; CWIK,M.; CURTIS,R. y FISCHER,J. (1983). Diurnal variation in theophylline elimination. **Drug Clin. Pharmacy.** 17 (6): 53-55.

- GIELEN,J.; VAN CANTORT,J. Y KREMER,P. (1976). Genetic and hormonal regulation of steroid hydroxylases and drug metabolizing enzymes in rat liver. **Arch. Toxicol.** 36:255-266.

- GUISSOU,P.; GUISINAUD,G.; LEGHEAND,J. y SASSARD,J. (1987). Chronopharmacokinetics of indometacin in rats. **Arznein-Forsch./ Drug Res.** 37 (II), N°9: 1034-1037.

- GIRARD,J.; BAUMAN,J. BÜHLER,U; ZUPPINGER,K, HAAS,H.; STAUB,J. y WYSS,H. (1978a). Cyproterone acetate and ACTH adrenal function. **Journal of Clinical Endocrinology and metabolism.** 47: 581-586.

- GIRARD,J.; HELGE,H.; MULENDAHL,V.; SCHWARTZ,K.; WEBER,D. y ZUPPINGER,B. (1978 b). Treatment of idiopathic precocious puberty with cyproterone acetate. **Hormone Research** 9: 301-312.

- GLODE,M.; SMITH,A. and LEUPROLIDE STUDY GROUP. (1987). Long term suppression of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone by daily administration of leuprolide. **J. Urol.** 137: 57-69.

- GOLDENBERG,S.L. (1991). Use of cyproterone acetate in prostate cancer. **Urol. Clin. North Am.** 18 (1): 111-122.

-
- GREENWOOD,R.; BRUMMITT,L.; BURKE,B. y CUNLIFFE,W. (1985). Acne: double blind clinical and laboratory trial of tetracycline oestrogen - cyproterone acetate, and combined treatment. **Br.Med. J. (Clin.Res.)** 2291 (6504) 1231-1235.
- GUISSON,P.; CUISINAUD,G.; LEGHEAND,J. y SASSARD,J. Chronopharmacokinetics of indometacin in rats. **Arzneim Forschen Drug. Res.** 9: 37-51.
- GÜNZEL,O. (1971). Datos sin publicar.
- HAEFELFINGER,P. (1981). Limits of the internal standard technique in chromatography. **J. Chromatography.** 218: 73-81.
- HALBERG,F. (1969). Cronobiology. **Ann. Rev. Physiol.** 31:675-725.
- HALBERG, F.; CARANDENTE,F.; CORNELISSEN,G. y KATINASS,G. (1977). Glossary of chronobiology. **Chronobiologia** 4 (supl.1): 1-189.
- HALBERG,F,; CORNELISSEN,G.; BINGHAM,C.; FUJII,S. y HALBERG,E. (1992). From experimental units to unique experiments. Chronobiologic pilots complement large trials. **In vivo** 6: 403-428.
- HALBERG,E. y HALBERG,F. (1980). Chronobiologic study design in everyday lif, clinic and laboratory. **Chronobiologia** 7: 95-120.
- HALBERG,F. y HALBERG,E. (1984). Chronopharmacology and further steps toward chronotherapy. En: Pharmacokinetics Basis for Drug Treatment. Raven Press. Nueva York.
-

-
- HAMMERSTEIN, J. (1980). Possibilities and limits of endocrine therapy. En: Androgenization in women. Acne, seborrhoe, androgenetic alopecia and hirsutism. Ed. Excerpta Medica. Amsterdam. 221-238.
- HARDIN, P.; HALL, J. y ROSBASH, M. (1990). Feedback of the drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA. **Nature**. 343: 536-540.
- HAUS, E.; HALBERG, F.; NELSON, W.; LAKATUA, D.; KAWASAKI, T.; VENO, M.; VEZONO, K. y OMAE, T. (1979). Age effects upon circadian amplitude on a concomitant study of 12 hormones in plasma of women. **Chronobiologia** 6: 266-278.
- HELGE, H. y KORTH-SCUTZ, W. (1980). Klinische anwendung von cyproteron acetat bei kindern. **Gynakologie** 13: 44-53.
- HILFENHAUS, M. (1976). Circadian rhythm of the renin-angiotensis-aldosterone system in the rat. **Arch. Toxicol.** 36: 305-316.
- HÜMPEL, M.; WENDT, P.; SCHULZE, G.; DOGS, G.; WEISS, C. y SPECK, U. (1977a). Bioavailability and pharmacokinetics of cyproterone acetate after oral administration of 2,0 mg Cyproterone Acetate in combination with 50 mg Ethinyloestradiol to 6 young women. **Contraception** 15 (5): 579-589.
- HÜMPEL, M.; WENDT, H.; DOGS, G.; WEIB, C.; RIETZ, S. y SPECK, U. (1977b). Intraindividual comparison of pharmacokinetic parameters of D-norgestrel, lynestrenol and cyproterone acetate in 6 women. **Contraception** 16 (2): 199-205.
- HUSMANN, D.; WILSON, C. y Mc PHAUL, M. (1990). Antipeptide antibodies to two distinct regions of the androgen receptor localize the receptor protein to the
-

nuclei of target cells in the rat and human prostate. **Endocrinology** 126: 2359-2381.

- ILLERA,J.; SILVAN,P.; LORENZO,A.; PORTELA,M.; ILLERA,M.J. e ILLERA,M. (1992). Variaciones fotoperiódicas de algunas constantes de la bioquímica sanguínea del conejo. **Rev. Española de Fisiología** 48(1): 7-12.

- IMAI,K.; WATANABE,K.; TAKAHASHI,O. y SHIMIZU,H. (1990). A study of the androgenic activity of anti-androgen. **Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi** 66(6): 597-606.

- ISAACS,J. y KYPRIANOU,N. (1987). Development of androgen independent tumor cells and their implication for the treatment of prostatic cancer. **Urol.Res.** 15:133-142.

- JUBELIRER,S. y HOGAN,T. (1989). High dose ketoconazole for the treatment of hormone refractory metastatic prostatic carcinoma: 16 cases and review of the literature. **J. Urol.** 142: 89-97.

- JURADO,R. (1989). Cronotoxicología y ritmos biológicos. **Actas de la Real Academia de Ciencias Veterinarias.** Vol.III: 243-259.

- KABASAKALIAN,P.; KATZ,M.; ROSENKRANTZ,B u TOWNLEY, E. (1970). Parameters affecting absorption of griseofulvin in a human subject using urinary metabolite excretion. **J. Pharm. Sci.** 59 (5): 596-600.

- KHANDEKAR,S. y DASH,R.J. (1990). Clinical and hormonal studies in precocious puberty. **Indian J. Pediatr.** 57(3): 411-419.

- KING,R.J. (1990). Receptors, growth factors and steroid insensitivity of tumors.

J. Endocrinol. 124: 179-193.

- KNUTH,U.; HAND,R. y NIESCHLAG,S. (1984). Effect of flutamide of cyproterone acetate on pituitary and testicular hormones in normal men. **J. CL. Endocr.and Metab.** 59: 963-969.

- KOZLOWSKI,J.: ELLIS,W. y GRAYHACK,J. (1991). Advanced prostatic carcinoma. Early versus late endocrine therapy. **Urol. Clin. North Am.** 18(1): 15-24.

- KÜHN,E.; NOUWEN,E.; SABBE,G. y NIEWBORG. (1980) Shift in acrophase of circadian prolactin plasma levels in adult female rats following neonate ovariectomy and estrogen treatment. **Neuroendocrinology** 31: 343-348.

_ LABRIE, F; DUPONT,A. y BELANGER, A. (1987). Flutamide eliminates the risk of disease flare in prostatic cancer patients treated with a luteinizing hormone - releasing hormone agonist. **J. Urol.** 138: 804 - 822

- LABRIE, C. y ZHAO, H. (1989). Caracterización of cDNAs for human estradiol 17-beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct s'termini in human placenta. **Mol. Endocrinol** 3: 1301- 1315.

- LAERUM, O. (1976). Posible influences of circadian rhythms in experimental carcinogénesis. **Arch. Toxicol.** 36: 247-254.

- LAGOGUEY, A. y REINBERG, A. (1981). Human pituitary hormones. Circadian and episodic variations. **Martinus Nijhoff Publ.** 261 - 278.

-
- LEVI, F. ; LELOVARN, C. y REINBERG, A. (1986). Timing optimizes sustained indomethasin treatment osteoarthritis. **Clin. Pharmacol. Ther.** 37: 77 - 84.
- LIN, A. y SHAIN, S. (1989). Androgen modulation of prostate cancer cell androgen receptor content is cell line specif. **Mol. Cell. Endocrinol.** 63: 75 - 91.
- LITCHFIELD, J. y WILCOXON, F. (1949). A simplifield method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 96:99-113.
- LOPEZ-CALDERON, J. (1992). Glándulas Suprarrenales. En: TRESGUERRES, J. Fisiología Humana. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill (Madrid).
- LUDERSHMIDT, CH. y PLEWIG, G. (1977). Effets of cyproterone and caboxilic acid derivates on the sebaceous glond of the Syrian hamster. **Archives of Dermatological Research.** 68: 219 - 227.
- MARCONDES, J.A.; WAJCHENBERG, B. y ABUJAMRA, A. (1990). Monthly cyproterone acetate in the treatment of hirsute women: clinical and laboratory effects. **Fertil Steril** 53(1): 40 - 44.
- MAYER, D. (1976). The circadian rhythm of synthesis and catabolism of cholesterol. **Arch. Toxicol.** 36: 267-276.
- MAYERSBACH, H. (1976). A key in experimental and practical medicine. **Arch. Toxicol.** 36: 185-216.
- Mc CONNELL, J.D. (1990a). Androgen ablation and blockade in the treatmen of bening prostatic hyperplasia. **Urol. Clin. North Am.** 17(3): 661 - 670
-

- Mc CONNELL, J.D.(1990b). Medical management of benign prostatic hyperplasia with androgen suppression. **Prostate Suppl.** 3: 49 - 59

- Mc CONNELL, J.D. (1991). Physiologic basis of endocrine therapy for prostatic cancer . **Urol. Clin. North Am.** 18 (1):1- 13.

- MIJAN ORTIZ, J.L.; ZULUAGA GOMEZ, A. y GARCIA VICTOR, F. (1990). Results of total androgenic blockade for the treatment of disseminated cancer of the prostate. **Actas Urol. Esp.** 14(5): 325 - 329.

- MONK,T. y FORT,A. (1983). Cosina: a cosine curve fitting program suitable for small computer. **Int. J. Chronobiology** 8:193-224.

- MONTSLVAJE, J. (1981). La cronobiología: su interés clínico y farmacoterapéutico. **Terapeutica y Veterinaria.** 55: 143 - 172.

- MURAD, F. y HAYNES, R. (1982). Estrógenos y progestágenos. En: "Las bases farmacológicas de la terapéutica". GOODMAN,L. y GILMAN,A. Ed. Medica Panamericana. Bs. As. 1380 - 1381.

- NAKANO,S.; WATANABE,H.; NAGAI,K. y OGAWA,N. (1984). Circadian stage-dependent changes in diazepam kinetics. **Clin. Pharmacol. Ther.** 36 (2): 271-277.

- NELSON, W.; BINGHAM, C.; HAUS, E.; LAKATUA, D.; KAWASAKI, T. y HALBERG, F. (1980). Rhythm - adjusted age effects in a concomitant study of 12 hormones in blood plasma of women. **J. Gerontol.** 85: 512 - 519

- NEUBERT,D. y RAUTEMBERG,M. (1976). Circadian fluctuations in the activity

of DNA-dependent RNA polymerases. **Arch. Toxicol.** 36: 217-234.

- NEUMANN, F. (1977). Pharmacology and potencial use of Cyproterone Acetate. **Hormo. Metab. Res.** 9: 1 - 13

- NEUMANN, F. (1987). Pharmacology and clinical uses of Cyproterone Acetate. **En**: Farmacology and clinical uses of inhibitors of hormone secretion and action - B.J.A. Furr y A.E. Wakeling. 123 - 159

- NEUMANN, F.; BORMACHER, K, y HABENICHT, V. (1990). Principles of androgen deprivation. **Proy. Clin. Biol. Res.** 359: 75 - 83

- NEUMANN, F.; ELGER, W. y KRAMER, M. (1966). Development of vagina in male rats by inhibiting androgen receptors with an anti-androgen during the critical phase of organogenesis. **Endocrinology.** 78: 628-632.

- NEUMANN, F.; HABERNICHT, V. y EL ETREBY, M. (1985). Principles of endocrine manipulation in the treatment of prostatic cancer. **Symposium on treatment of advanced prostatic cancer.**

- NEUMANN, F.; HÜMPEL, N. y SENGE, T. (1982). Cyproterone Acetate : Biochemical ad biological basis for treatment of prostatic cancer. **En**: Prostate cancer. Eds: JACOBI, G; HOHENFELLNER, R. 269 - 305.

- NEUMANN, F. y TÖPERT, M. (1986). Pharmacology of antian- drogens. **J. Steroid. Biochem.** 25. 5B.: 885 - 895

- NIELSEN, D.R. (1985). Hirsutism treated with Cyproterone Acetate and ethinyl estradiol. Influence on androgens in the serum and urine and on urinary cortisol.

Ugeskr Laeyer. 12.147 (33): 2589 - 2593.

- OLLANGNIER, M.; DECOUSUS, M.; CHERRAH, Y.; LEVY, F.; MECHROURI, M.; QUENEAN, P. y REINBERG, A. (1987). Circadian changes in the pharmacokinetics of oral ketoprofen. **Clin. Pharmacol.** 12(5): 367 -377.

- PEDERSEN, I.M.; NIELSEN, D.; LARSEN, J. y STARUP, J. (1985). Hirsutism treated with Cyproterone Acetate and ethinyl estradiol. Evolution of the clinical effect. **Ugeskr Laeger.** 12.147(33): 2594 - 2596.

- PHILIPPENS, K. (1976). The manipulation of circadian rhythms. **Arch. Toxicol.** 36: 277-304.

- PLA, J. y OBACH, R. (1982). Farmacocinética (1ª Parte) **En Farmacología general. Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico.** Vol III. ESPLUGUES, J. Ed. Fundación García-Muñoz. Valencia. 19-54.

- PLEWIG, G. (1974). Acne vulgaris: proliferative cells in sebaceous glands. **British Journal of Dermatology.** 90: 623 - 630

- PLOWMAN, P.; PERRY, L. y CHARD, T. (1987). Androgen suppression by hydrocortisone without aminoglutethimide in orchietomised men with prostatic cancer. **Br. J. Urol.** 59: 255-264

- POCHI, P. y STRAUSS, J. (1974). Endocrinologic control of the development and activity of the human sebaceous gland. **Journal of Investigative Dermatology.** 62: 191-201

- PONT, A.; WILLIAMS, P. y AZHAR, S. (1982). Ketoconazole blocks testosterone synthesis. **Arch. Intern. Med.** 142: 2137-2149

-
- PREVELIC, M.; WÜRZBURGER, M.; BALINT-PERIC, L. y PUZIGACA, Z. (1989). Effects of a low-dose estrogen-antiandrogen combination (Diane-35) on clinical of androgenization, hormone profile and ovarian size in patients with polycystic syndrome. **Ginecol. Endocrinol.** 3: 269-280.
- PRELEVIC, G.M.; WÜRZBURGER, M. y TRPKOVIC, D. (1990). Effects of a low-dose estrogen-antiandrogen combination (Diane-35) on lipid and carbohydrate metabolism in patients with polycystic ovary syndrome. **Gynecol. Endocrinol.** 4(3): 157-158.
- QUARMBY, V.; YARBROUGH, W.C y LUBAHN, D. (1990). Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. **Mol. Endocrinol.** 4: 22-41.
- RABOCH, J.Jr.; STARKA, L. y RABOCH, J. (1990). The sexual life of hirsute women treated with antiandrogen. **Cesk Gynecol.** 55(8): 596-598.
- RACKLEY, R.; MEYER, M. y STRAUGHN, B. (1988). Circadianrhythm in theophylline disposition during a constant-rate intravenous infusion of aminophylline in the dog. **J. Pharm. Sci.** 77(8): 658-661.
- RAMSAY, I.D. y RUSHTON, D.H. (1990). Reduced serum vitamin B 12 levels during oral Cyproterone Acetate and ethinyl-oestradiol therapy in women with diffuse androgen-dependent alopecia. **Clin. Exp. Dermatol.** 15(4): 277-281.
- RASMUSSEN, F. (1990). Long-term treatment with antiandrogens. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 37(6): 917-919.
- RAYNAUD, J.; BONNE, C. y MOGUILLEWSKY, M. (1984). The pure
-

antiandrogen RU 23908 (Anandron) a candidate of choice for the combined antihormonas treatment of prostatic cancer -A review-**Prostate**. 5: 299-313.

- REINBERG,A. (1976). "New aspects of human chronopharmacology." **Arch. Toxicol.** 36: 327-339.

- REINBERG,A. (1979). La chronotoxicologie et la chronopharmacologie. **Actualités Toxicologiques** 111: 53-68.

- REINBERG, A.(1982). La Cronofarmacología. **Mundo Científico**. 2(15): 634-646.

- REINBERG,A. (1992). Concepts in chronopharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 32: 51-66.

- REINBERG,A. y HALBERG,F. (1971). Circadian chronopharmacology. **Annu. Rev. Pharmacol.** 11: 455-492.

- RITSCHER,W.(1984). Chronopharmacokinetics. **Pharmacy Internat.** 3: 116-122.

- ROSE,C.; PEDERSEN,L. y MOURIDSEN, H.(1985). Endocrine treatment with anti-estrogen, anti-androgen or progestagen of advanced malignant melanoma. Three consecutive phase II trials. **Eur J. Cancer Clinic. Oncol.** 21(10): 1171-1174.

- ROSENBERG, A.G. y Von ESCHENBACH, A.C.(1990). Hormonal therapy for prostate cancer. **Semin. Surg. Oncol.** 6(2): 71-76.

- SADI,M.; WALSH,P. y BARRAC, E.(1990).Can inmunocytochemical assay of androgen receptors (AR) predict androgen responsiveness of metastatic prostate

cancer. **J. Urol** 143:204 A.

- SANCHEZ DE LA PEÑA, S.; HALBERG, F.; UNGAR, F.; HAUS, E.; LAKATUA, D.; SHERING, L.; SANCHEZ, E. y VECSEI, P. (1983). Circadian pineal modulation of pituitary effect on murine corticosterone in vitro. **Brain. Res. Bull.** 10: 559-565.

- SCIARRA, F.; TOSCANO, V.; CONCOLINO, G. y DI SILVERIO, F. (1990). Antiandrogens: Clinical applications. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 37(3): 349-362.

- SCOTT, J. y SOLTER, R. (1987). HPLC method for the analysis of Cyproterone Acetate in tablets. **J. Chromatogh. Scin.** 25: 415-417.

- SCHINDLER, A.E. (1990). Anti-androgen therapy in the female. **Geburtshilfe Frauenheilkd.** 50(10): 749-753.

- SCHULTE - HERMANN, R. (1976). Fütterungs - rhythmien und die und die circadianen variationen der Zellproliferation bei pharmakologisch. induziertem leberwachstum. **Arch. Toxicol.** 36: 235-245.

- SCHRODER, F.H. (1990). Antiandrogenic sustances in the management of prostatic cancer. **Recent Results Cancer Res.** 118: 163-173.

- SCHULZE, H.; ISAACS, J. y SENGE, T. (1987). Inability of complete androgen blockade to increase survival of patients with advanced prostatic cancer as compared to standard hormonal therapy. **J. Urol.** 137: 909-927.

- SCHULZE, H. y SENGE, T. (1990). Influence of different types of antiandrogens

on luteinizing hormone-releasing hormone analogue-induced testosterone surge in patients with metastatic carcinoma of the prostate. **J. Urol.** 144(4): 934-941.

- SCHUURMANS, A.L. (1990). Stimulatory effects of antiandrogens on L N Ca P human prostate tumor cell growth, egf-receptor level and acid phosphatase secretion. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 37(6): 849-853.

- SHUMAKER, R.C. (1986). PKCALC: A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. **Drug Metabolism** 17:331-348.

- SIKES, R.A.; THOMSEN,S.; PETROW,V. y NEUBAUER, B. (1990). Inhibition of experimentally induced mouse prostatic hiperplasia by castration or steroid antagonist administration. **Biol. Reprod.** 43 (2): 353-362.

- SILVAN,G.; ILLERA,J.; MARTIN,J.; MANJON,R. e ILLERA,M. (1990). Variaciones fotoperiódicas de las concentraciones plasmáticas de testosterona en conejo. **Revista Española de Fisiología** 46 (2): 177-182.

- SILVERIO, F. DI; SCIARA,F. y D'ERAMO, G. (1990). Advanced prostatic cancer: clinical and hormonal response to flutamide in patients pretreated with LHRH analogue and Cyproterone Acetate. **Eur Urol.**18(1): 10-15.

- SMITH, P.; SUCIO,S. y ROBISON,M.(1986). A comparison of the effect of D.E.S. with low dose estramustine phosphate in the treatment of advanced prostatic cancer. **J. Urol.**136: 619-628.

- STEIMBACH,G.; HILHENHAUS,M.; MAYERSBACH,V. y PESCHE,W. (1976). Circadian influences on clinical values in man. **Arch. Toxicol.** 36: 317-327.

-
- STEEL,R.G.D. y TORRIE,I.H (1960). Principles and procedures of statistic. Ed. McGraw-Hill. (Londres).
- STUDER, U.E. and MUNCH,D. (1990). Hormonal therapy (Medical Orchiectomy) in prostatic carcinoma. schweiz Med Wochenschr. 120(24): 881-887.
- STULBERG,D.L. and CARUTHERS,B. (1990). Hirsutism a practical approach to improving physical and mental well-being. Postgrad Med. 87(8): 199-205, 208.
- TANAKA,T.; YOSHIZAWA,A.; TANAE,A. and HIBI,I. (1990). Relationships between puberty and growth hormone and of associated gonadal suppression therapy. Horm Res. 33(Suppl.): 102-105.
- TAYLOR,D.; DUFFIN,A.; KINNEY,C. and Mc DEVITT,D. (1983). Investigation of diurnal changes in the disposition of theophylline. Br.J. Clin. Pharmac. 16: 413-416.
- TAYLOR,D.; DUFFIN,A.; KINNEY,C. and Mc DEVITT,D.(1984). Circadian variation in plasma theophylline concentration during maintenance therapy with a sustaines-release preparation in patients with obstructive airways disease. Br. J. Clin. Pharmac. 18: 27-30.
- VALLOTON,M. (1985). Las glándulas endócrinas. En MEYER,P. Fisiología Humana. Ed. Salvat (Barcelona).
- VEMATSU,T.; FOLLATH,F y VOZEH,S. (1986). Circadian changes in the absorption an elimination of theophylline in patients with bronchial obstruction. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 30: 309-312.
-

- VERMEULEN,A. and RUBENS,R. (1988). Effects of cyproterone acetate plus ethinylestradiol low dose on plasma androgens and lipids. **Contraception** 38: 419-431.

- VOKAC,M. (1984). A comprehensive system of cosinor treatment programs written for the apple microcomputer. **Chronobiology International** 1: 87-92.

- VOOGT,H. DE; KLIJN,J.; STUDER,O. and DE PAUW,M. (1990). Orchiectomy versus buserelin in combination with cyproterone acetate, for 2 weeks or continuously, in the treatment of metastatic prostatic cancer. Preliminary results of eortc-trial 30843. **J. Steroid Biochem Mol. Biol.** 37 (6):965-968.

- WILLIAMS,G. (1990). Pituitary adrenal and gonadal endocrine suppression for the primary treatment of prostate cancer. **Br. J. Urol.** 65 (5): 504-508.

- WINNEKER,R.; WAGNER,M. and BATZOLD,F. (1990). Studies on the mechanism of Win 49596: a steroidal androgen receptor antagonist. **J. Steroid Biochem** 33: 1133-1147.

- YOUNG,M. (1992). Molecular genetics of biological rhythms. Ed. Marcel Dekker Inc. (Nueva York). pp.336.