



# FACULTAD DE FARMACIA

## Grado en Farmacia

Apoyo al estudio de investigación del comportamiento farmacocinético de fármacos antineoplásicos mediante administración intraperitoneal con hipertermia en un modelo experimental con rata Wistar

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2015

**Autor:** Mónica Ibáñez Rodríguez

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Amelia Ramón López

Ricardo Nalda Molina

## Agradecimientos

A mis tutores, Amelia y Ricardo, por darme la oportunidad de hacer este trabajo bajo su tutela, por lo que me han enseñado y por su ayuda.

A toda mi familia por hacerme la persona que soy y apoyarme en mis decisiones. A mi esposo, Anselmo, por la paciencia y el cariño que me has dado siempre, durante la carrera y la realización de este trabajo en especial, sé que ha sido duro, pero ya se ve el final del recorrido. A mi hijo, Adrián, por quererme de manera incondicional. Os quiero.

# Índice

Índice.....	3
Resumen.....	4
Antecedentes .....	5
Carcinomatosis Peritoneal e HIPEC .....	5
Farmacocinética .....	8
Mitomicina-C.....	8
Objetivos .....	11
Materiales y métodos .....	13
Implementación Técnica experimental.....	13
Búsquedas bibliográficas .....	13
Objetivo 2.....	13
Objetivo 3.....	15
Simulaciones farmacocinéticas.....	16
Resultados y discusión.....	18
Objetivo 1. Implementación Técnica Experimental .....	18
Anestesia y Analgesia.....	18
Cateterización .....	19
Procedimiento HIPEC .....	20
Desarrollo de la toma de muestras .....	22
Objetivo 2. Búsqueda bibliográfica técnica analítica de MMC .....	22
Objetivo 3. Simulaciones determinísticas .....	26
Conclusiones.....	29
Anexos .....	30
Anexo 1: Material utilizado para implementación de la técnica HIPEC.....	30
Material quirúrgico general.....	30
Material para la cateterización de la vena yugular .....	30
Material para el procedimiento HIPEC y toma de muestras.....	31

# Resumen

**Antecedentes:** La carcinomatosis peritoneal es una progresión en peritoneo de cánceres de origen digestivo o ginecológico, que puede ser tratado mediante cirugía resectiva radical seguida de quimioterapia intraperitoneal con hipertermia (HIPEC). La Mitomicina-C (MMC) es adecuada para este procedimiento, sin embargo no se ha estudiado su paso a circulación sistémica, por lo que es conveniente realizar ensayos preclínicos para estudiar su absorción sistémica mediante modelos farmacocinéticos.

**Objetivos:** 1) Facilitar apoyo para implementar la técnica experimental de HIPEC en un modelo animal de rata Wistar en el SEA (Servicio de Experimentación Animal, Universidad Miguel Hernández). 2) Obtener información sobre condiciones experimentales de cuantificación de MMC en plasma de rata mediante HPLC con detección en UV a través de búsqueda bibliográfica. 3) Estimar el límite inferior de cuantificación (LLQ) de MMC en un modelo animal de rata Wistar mediante simulaciones farmacocinéticas.

**Resultados:** Se obtuvieron 5 artículos con protocolos adecuados para detección de MMC y 1 artículo con un modelo farmacocinético adecuado. Se realizaron simulaciones farmacocinéticas basándose en parámetros compartimentales obtenidos en bibliografía, mediante las que se estimaron las concentraciones esperables durante la toma de muestras (8 horas). Las concentraciones se situaban por encima de los LLQ descritos en los protocolos de HPLC.

**Conclusiones:** El procedimiento quirúrgico para formación del coliseo con HIPEC resultó adecuado. Existen pocos protocolos de cuantificación de MMC en ratas. Los métodos analíticos para el análisis de MMC en plasma humano encontrados deben validarse para realizar futuros estudios preclínicos, aunque según los resultados de las simulaciones realizadas, son adecuados para detectar las mínimas concentraciones esperables.

# Antecedentes

## Carcinomatosis Peritoneal y HIPEC

La carcinomatosis peritoneal es un tipo de cáncer que se caracteriza por la diseminación de tumores en la capa serosa del peritoneo y órganos anexos. Es una progresión tardía de varios tipos de cánceres digestivos o ginecológicos, en los que células cancerosas se desprenden del tumor principal y se adhieren al tejido peritoneal y proliferan en forma de nódulos (*figura 1a*). Tradicionalmente esta progresión se categorizó como metástasis, y se consideraba una situación clínica terminal, con una esperanza de vida menor a un año y tratamiento quimioterápico de carácter paliativo.

Hace apenas dos décadas que este panorama cambió cuando Paul H. Sugarbaker implementó una técnica basándose en considerar la carcinomatosis peritoneal como cáncer localizado en la cavidad peritoneal (no metástasis) y, por tanto, candidato a tratamiento con intención curativa<sup>1</sup>. Están documentadas supervivencias de hasta 5 años en el 45-50% de los pacientes seleccionados según criterios concretos<sup>2</sup>.

La técnica consiste en realizar una cirugía resectiva con el objeto de eliminar los tumores macroscópicos (>3 mm) seguida de quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (HIPEC, del inglés *hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*), que disminuye la adherencia de las células cancerígenas desprendidas durante la resección de los tumores y actúa sobre los focos cancerosos microscópicos<sup>3</sup>.

El procedimiento completo comienza con una laparotomía (*figura 1b*) realizada desde la apófisis xifoides hasta la sínfisis púbica, para acceder al peritoneo y realizar, mediante electrobisturí, una resección radical de los tejidos enfermos

---

<sup>1</sup>Sugarbaker PH. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol.* 1998;14(3):254–61.

<sup>2</sup>Losa F, Barrios P, Salazar R, Torres-Melero J, Benavides M, Massuti T, et al. Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy for treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal origin. *Clin Transl Oncol.* 2013;16(2):128–40.

<sup>3</sup>Terzi C, Arslan NC, Canda AE. Peritoneal carcinomatosis of gastrointestinal tumors: where are we now? *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14371–80.

según los procedimientos de peritonectomías implementados por Sugarbaker, que puede incluir la resección de vísceras si están afectadas<sup>1</sup>.

A continuación se procede a realizar una expansión peritoneal para permitir la perfusión quimioterápica, siendo la “técnica del coliseo” o *Soup-bowl-like container* propuesta por el propio Sugarbaker la más utilizada y la que parece haber demostrado más ventajas<sup>4</sup>. Para ello, se fija mediante sutura un retractor transparente con forma ovalada a la incisión realizada en el abdomen, y el orificio resultante se cubre con una membrana de plástico que minimiza las

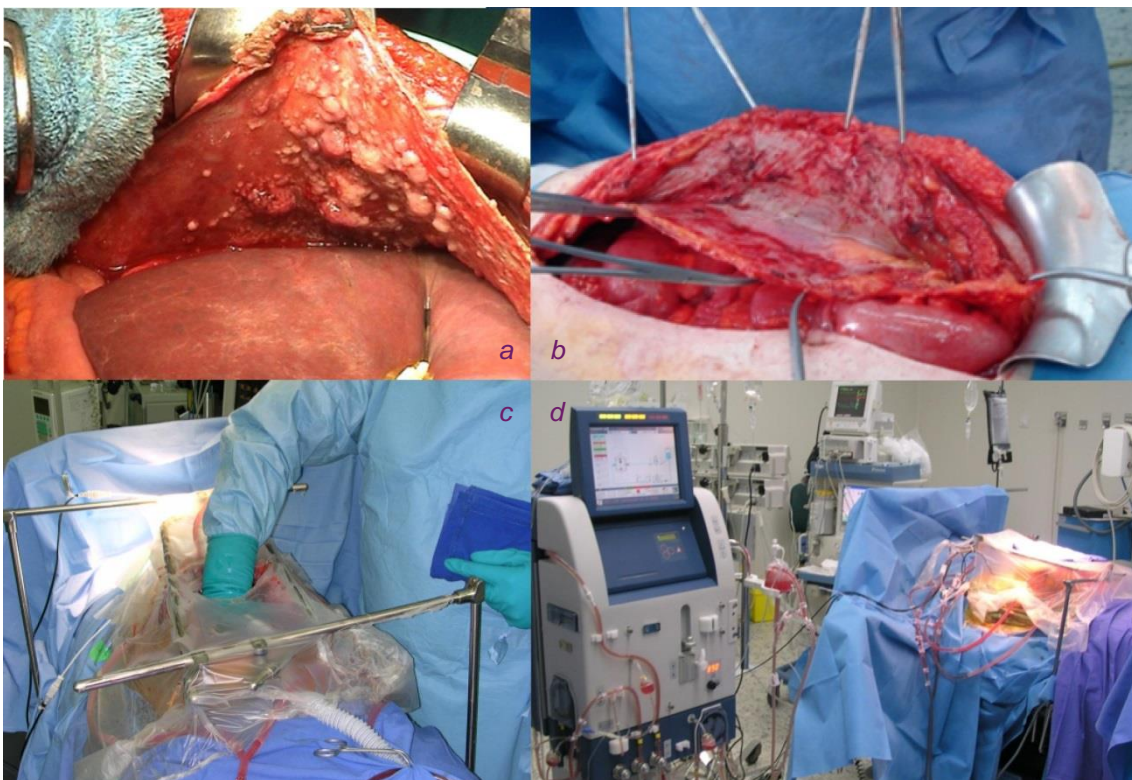


Figura 1

a) Nódulos cancerígenos en peritoneo b) Laparotomía c) Coliseo d) Bomba de recirculación para HIPEC

pérdidas de calor y la exposición del personal quirúrgico al fármaco. Se practica una abertura en el centro de la lámina plástica que permite al cirujano acceder a la cavidad peritoneal para uniformizar la temperatura de la solución quimioterápica (figura 1c). Una vez se ha establecido el coliseo, se procede a instilar la solución en circuito cerrado continuo mediante una bomba dotada de

---

<sup>4</sup>Glehen O, Mohamed F, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from digestive tract cancer: new management by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemohyperthermia. *Lancet Oncol.* 2004;5(4):219–28.

un intercambiador de calor (*figura 1d*), monitorizando la temperatura mediante sondas en el líquido perfundido y el paciente, que no debe superar 39,5°C.

Una vez ha transcurrido el tiempo de perfusión establecido, se drena la solución quimioterápica del abdomen, se retira el retractor utilizado para la formación del coliseo, se realizan las anastomosis necesarias para reparar los intestinos y/o las vísceras y se procede a cerrar el abdomen del paciente con procedimientos quirúrgicos estándar.

La hipertermia por sí misma tiene un efecto citotóxico pues disminuye la capacidad de reparación del ADN en las células tumorales, produce desnaturalización de las proteínas y favorece la síntesis de las proteínas de choque térmico, inducción de apoptosis e inhibición de la angiogénesis. Pero además se ha demostrado que existe sinergia entre algunos agentes quimioterápicos y la utilización de hipertermia que mejora los resultados de la quimioterapia intraperitoneal, aumentando la citotoxicidad del antitumoral y la penetración del mismo en el tejido canceroso<sup>5</sup>.

Es de remarcar que, a pesar de existir una declaración de consenso de los grupos más relevantes que realizan el procedimiento sobre aspectos importantes para la selección de pacientes candidatos a HIPEC y sobre el grado de resección conseguido tras la peritonectomía<sup>6</sup>, todavía no han sido estandarizadas variables como la matriz utilizada para la instilación del fármaco, el tiempo de instilación y la temperatura de la misma.

La meta final y el objetivo clínico deseado en este procedimiento es conseguir que todo el fármaco se mantenga en la cavidad peritoneal y no exista nada de absorción sistémica, es decir, que las concentraciones en plasma sean nulas o clínicamente irrelevantes. Sin embargo, la cavidad peritoneal presenta una superficie con una capacidad funcional de paso de fármacos, por lo que cierta absorción sistémica del fármaco es inevitable. En relación a este hecho, existen

---

<sup>5</sup>Witkamp AJ, de Bree E, Van Goethem R, Zoetmulder FA. Rationale and techniques of intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2001;27(6):365–74.

<sup>6</sup>Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, Yan TD, Alexander R, et al., Society of Surgical Oncology Annual Meeting. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. *Society of Surgical Oncology. Ann Surg Oncol.* 2007;14(1):128–33.

diversos parámetros del procedimiento HIPEC sobre los que no se ha estudiado su impacto en el grado de absorción, entre ellos están los mencionados anteriormente: matriz de instilación, temperatura del líquido de instilación, y tiempo de instilación.

Dado lo complejo del procedimiento y la gravedad de los efectos secundarios de estos fármacos, para el estudio de estos parámetros es necesario el uso de modelos experimentales animales que permitan acotar los futuros estudios clínicos.

## Farmacocinética

La farmacocinética estudia, mediante construcción de modelos matemáticos y estadísticos, los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos que se producen en el organismo. Para poder construir los modelos farmacocinéticos, se estudia la concentración que alcanza el fármaco objeto del estudio, o sus metabolitos, a diferentes tiempos en diferentes matrices biológicas, normalmente el plasma. Así se obtienen curvas de concentración plasmática frente a tiempo que sirven para estimar los parámetros que caracterizan la cinética del fármaco en cuestión<sup>7</sup>.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios farmacocinéticos preclínicos en modelos experimentales animales permiten un diseño de los ensayos clínicos en pacientes más racional y eficiente. En el caso particular del procedimiento HIPEC, permitirá estudiar de una manera más sistemática las variables que puedan tener un impacto en la absorción del fármaco, y reducir los ensayos clínicos en humanos a aquellas variables que hayan demostrado mayor significación estadística.

## Mitomicina-C

El fármaco ideal para la técnica descrita de HIPEC es aquel que reúne ciertas características que limitan su paso a circulación sistémica merced a la barrera

---

<sup>7</sup> Rowland M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications. 4th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2009.



plasma-peritoneo (elevado peso molecular, alta hidrosolubilidad), pudiendo emplearse altas concentraciones en el lugar de acción que aumentan su eficacia pero disminuyen de manera significativa la toxicidad sistémica en el paciente. En HIPEC han sido utilizados varios fármacos, bien solos o en combinación, como son: mitomicina-C MMC, oxaliplatino, irinotecán, carboplatino, cisplatino, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y melfalán, pero los más estudiados y utilizados en clínica son la MMC y los platinos. Además, con MMC se han descrito los mayores ratios de concentración máxima peritoneo-plasma en administración con HIPEC<sup>5</sup>. **El fármaco objeto de estudio en el presente trabajo es la MMC.**

Mitomicina-C es un antibiótico natural aziridínico producido por *Streptomyces caespitosus*. Se trata de un agente alquilante cuyo principal mecanismo de acción es producir enlaces covalentes inter e intracatenarios en el ADN, que impiden la replicación y la transcripción.

La molécula necesita ser activada por biorreducción, lo que le confiere especificidad en células hipóxicas, como ocurre en las células cancerosas, y protección con respecto a la toxicidad en células bajo condiciones aeróbicas<sup>8</sup>.

Se han descrito las ventajas del uso de MMC en perfusión intraperitoneal, debido a ciertas características que reúne: no es específica de ciclo y, por tanto, tiene efecto citotóxico directo en exposiciones cortas, su elevado peso molecular (334,33 Da) dificulta su paso a circulación sistémica manteniendo elevada la concentración en el peritoneo, su solubilidad en agua, su rápido aclaramiento de la circulación sistémica y la potenciación del efecto citotóxico mediante hipertermia<sup>9</sup>.

Dicho paso a circulación sistémica se monitoriza mediante la obtención de las curvas de concentración plasmática frente a tiempo, y para su realización es necesario el análisis cuantitativo de dichas concentraciones a partir de las muestras obtenidas a distintos tiempos, tal y como se describe en el epígrafe

---

<sup>8</sup> Tomasz M, Palom Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther.* 1997;76(1-3):73–87.

<sup>9</sup> Van Ruth S, Mathôt RAA, Sparidans RW, Beijnen JH, Verwaal VJ, Zoetmulder FAN. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of mitomycin during intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(2):131–43

anterior. Existen en bibliografía distintos métodos analíticos que permiten cuantificar la MMC mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC ) en plasma. Sin embargo, la implementación de cualquiera de estas técnicas requiere un proceso de validación previo en el laboratorio donde se va a realizar el estudio. Así mismo, se ha de elegir la técnica que permita alcanzar el límite inferior de cuantificación necesario para poder valorar las concentraciones plasmáticas que se prevén en las muestras obtenidas.

# Objetivos

Muy pocos grupos a nivel mundial tienen desarrollado un modelo animal experimental con la técnica de administración de fármacos en HIPEC<sup>10,11</sup>. Es por ello que se considera conveniente implementar dichos modelos experimentales para poder realizar estudios preclínicos en un modelo animal para analizar las mencionadas variables con mayor profundidad antes de iniciar un estudio clínico en pacientes.

Para iniciar el estudio preclínico de la MMC en ratas, y poder determinar el impacto de distintas variables del procedimiento HIPEC en la absorción del fármaco, se necesita por un lado adaptar dicho procedimiento a las condiciones experimentales del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche (SEA), y por otro lado, poner a punto una técnica analítica que permita cuantificar el fármaco para poder realizar el estudio farmacocinético. Es por ello que se plantearon los siguientes objetivos en este trabajo:

## Objetivo 1:

Facilitar apoyo para implementar la técnica experimental de HIPEC en un modelo animal de rata Wistar en el SEA.

## Objetivo 2:

Obtener información sobre condiciones experimentales de cuantificación de MMC en plasma de rata mediante técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con sistema de detección mediante espectroscopía de absorción en ultravioleta (UV) a través de búsqueda bibliográfica.

## Objetivo 3:

Determinar si los límites inferiores de cuantificación (LLQ) de MMC descritos en los artículos obtenidos en el objetivo 2 permitirían estimar las concentraciones

---

<sup>10</sup> Pelz JOW, Doerfer J, Hohenberger W, Meyer T. A new survival model for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in tumor-bearing rats in the treatment of peritoneal carcinomatosis. BMC Cancer. 2005;5:56.

<sup>11</sup> Pelz JOW, Doerfer J, Decker M, Dimmler A, Hohenberger W, Meyer T. Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) decrease wound strength of colonic anastomosis in a rat model. Int J Colorectal Dis. 2007;22(8):941-7.

plasmáticas de MMC en un modelo animal de rata Wistar. Para ello, se realizarán simulaciones determinísticas farmacocinéticas de acuerdo a los parámetros farmacocinéticos obtenidos por búsqueda bibliográfica.

# Materiales y métodos

## Implementación técnica experimental

Con el fin de implementar la técnica experimental del objetivo 1, se utilizó instrumental de uso habitual en un quirófano y utillaje de laboratorio estándar para la preparación de las distintas disoluciones utilizadas en el procedimiento. Por los requerimientos propios del procedimiento quirúrgico, se usó material más específico para la cateterización de la vena yugular, necesaria para la toma de muestras intravenosas, y para la técnica HIPEC, así como el material propio de la toma de muestras. El material utilizado se detalla en el anexo 1 de este trabajo.

## Búsquedas bibliográficas

El diseño del estudio realizado para los objetivos 2 y 3 fue descriptivo transversal sobre los trabajos recuperados en la revisión bibliográfica.

Todos los datos utilizados se obtuvieron de la consulta directa de la literatura científica recogida en la base de datos MEDLINE de la National Library of Medicine, vía PubMed, accesible en Internet a través de la URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

La búsqueda de los descriptores se realizó mediante consulta de las palabras claves en DeCS/Bireme (Descriptores en Ciencias de la Salud) que incluye los descriptores del tesoro de MEDLINE, *Medical Subject Headings* (MeSH), accesible a través de la URL <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>.

Se estudiaron los artículos publicados en cualquier país, publicados desde el inicio de la indización.

## Objetivo 2

La búsqueda realizada para llevar a cabo el objetivo 2 (artículos que detallaran protocolos de cuantificación de MMC en plasma de rata mediante HPLC con detección UV), se realizó durante los meses de mayo y junio de 2015 mediante

acceso a MEDLINE vía PubMed. Se consideró adecuado el uso de los Descriptores: "Mitomycin", "Chromatography, High Pressure Liquid", "Plasma" y "Rats". Así mismo, se utilizaron estos términos en los campos de título y resumen. Las ecuaciones de búsqueda que se desarrollaron para su uso en la base de datos MEDLINE, vía PubMed, mediante la utilización de conectores booleanos fueron:

- "Mitomycin"[MeSH] AND "Chromatography, High Pressure Liquid"[MeSH] AND "Rats"[MeSH] AND "Plasma"[MeSH]
- ("Mitomycin"[MeSH] OR "Mitomycin"[Title/Abstract]) AND "Chromatography, High Pressure Liquid"[MeSH] AND "Rat"[Title/Abstract] AND "Plasma"[Title/Abstract]
- ("Mitomycin"[MeSH]) OR ("Mitomycin"[Title]) AND ("HPLC"[Title/Abstract] OR Chromatograph\*[Title/Abstract] OR "Chromatography, High Pressure Liquid"[MeshSH]) AND "Plasma"[Title/Abstract]

La selección final de los artículos se realizó según el cumplimiento de los criterios de inclusión:

- Documentos publicados en revistas revisadas por pares. Seleccionados aquellos que fueron pertinentes cuyo texto completo pudo ser recuperado.
- Redactados en idioma inglés o español
- Detección mediante la absorción en el espectro del ultravioleta
- Protocolo detallado para permitir su reproducción en el laboratorio, que incluyera: características de las disoluciones utilizadas, almacenamiento de disoluciones y muestras, proceso de descongelación, extracción de las proteínas plasmáticas, concentración, composición de la fase móvil (eluyente), características de la fase estacionaria (columna), flujo de fase móvil, longitud de onda del detector, tiempo de retención, límite de detección, LLQ y volumen de inyección de muestra.

Además, como búsqueda secundaria y para reducir los posibles sesgos de publicación, se examinó la bibliografía de los artículos seleccionados en la búsqueda principal y la documentación disponible en el departamento, con el objeto de identificar estudios no detectados en esta revisión.

Se consideró adecuado realizar una tabla detallada con los resultados obtenidos en la búsqueda, según los ítems del cuarto criterio de inclusión. (Ver tabla 1)

### Objetivo 3

La búsqueda bibliográfica del objetivo 3 se realizó con el fin de obtener los parámetros farmacocinéticos necesarios para realizar simulaciones determinísticas. Se accedió a MEDLINE, vía PubMed, durante los meses de noviembre-diciembre de 2014 y mayo-junio de 2015. En este caso, se consideró apropiado el uso de los Descriptores “Hyperthermia, Induced”, “Mitomycin” con su Calificador de Materia (*Subheadings*) “Pharmacokinetics”, “Rats”, “Infusions, Parenteral” y “Chemotherapy, Cancer, Regional Perfusion”. Se consideró pertinente incluir los términos “Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy” e “HIPEC” que no tienen equivalencia exacta en Descriptores.

Así mismo, se utilizaron los términos en los campos de título y resumen. Las ecuaciones de búsqueda que se desarrollaron para su uso en la base de datos MEDLINE, vía PubMed, mediante la utilización de conectores booleanos fueron:

- "Mitomycin/pharmacokinetics"[MeSH] AND ("Hyperthermia, Induced"[MeSH] OR "HIPEC"[Title/Abstract]) AND ("Rats"[MeSH] OR "Rat"[Title/Abstract])
- "Mitomycin"[MeSH] AND ("HIPEC"[Title/Abstract] OR "Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy"[Title/Abstract]) AND "Pharmacokinetics"[Title/abstract] AND ("Rats"[MeSH] OR "Rat"[Title/Abstract])
- "Mitomycin/pharmacokinetics"[MeSH] AND ("Hyperthermia, Induced"[Mesh] OR "HIPEC"[Title/Abstract])

- "Mitomycin"[MeSH] AND ("HIPEC"[Title/Abstract] OR "Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy"[Title/Abstract]) AND "Pharmacokinetics"[Title/Abstract]

La selección final de los artículos se realizó según el cumplimiento de los criterios de inclusión:

- Documentos publicados en revistas revisadas por pares. Seleccionados aquellos que fueron pertinentes cuyo texto completo pudo ser recuperado.
- Redactados en idioma inglés o español
- Descripción del modelo farmacocinético de MMC mediante análisis compartimental
- Descripción de los parámetros farmacocinéticos resultado del estudio
- Utilización de técnica HIPEC
- Especie objeto del estudio: rata

Adicionalmente, se realizó una búsqueda secundaria como la descrita para el objetivo 2, para poder identificar estudios no detectados en esta revisión y de esta manera reducir posibles sesgos de publicación.

## Simulaciones farmacocinéticas

El modelo y los parámetros farmacocinéticos utilizados para el desarrollo de las simulaciones se obtuvieron a partir del trabajo de van Ruth *et al.*<sup>9</sup>. Dichos parámetros corresponden a un estudio en humanos, en el cual se concluyó que el modelo compartimental que mejor describió los datos fue un modelo bicompartimental, con eliminación y absorción de primer orden. Los parámetros utilizados en la simulación se pueden encontrar en la tabla 2.

Se realizó un escalado alométrico para adaptar los parámetros obtenidos a la especie objeto del estudio. El volumen central se escaló para la rata utilizando el peso como factor de escala, utilizando los valores de 70 kg como peso medio



en humanos y 0.25 kg como peso medio en rata. El resto de parámetros no se escalaron.

De acuerdo al modelo propuesto, se simuló, de manera determinística, el perfil de concentraciones plasmáticas que se obtendría al administrar, a través de una instilación en la cavidad peritoneal mediante HIPEC, una solución de 250 mL de MMC a una concentración de 2.5, 10 y 20 mg/L. Estas concentraciones abarcan el rango de concentraciones usadas en la mayoría de los protocolos preclínicos descritos en bibliografía<sup>12,13,14</sup>.

Para realizar las simulaciones determinísticas, se utilizó el programa NONMEM 7.3., en un procesador Intel Core i5, con sistema operativo Microsoft Windows 7. La línea de investigación dispone de licencia en vigor de todos los programas utilizados.

El resultado de las simulaciones se representa en la figura 8. En esta gráfica, además de los perfiles de concentración frente al tiempo, también se representaron los LLQ obtenidos en la búsqueda del método analítico de MMC con HPLC, para comprobar que las concentraciones esperadas estaban dentro del rango de detección de los protocolos de cuantificación (ver figura 8).

---

<sup>12</sup> Aarts F, Hendriks T, Boerman OC, Koppe MJ, Oyen WJG, Bleichrodt RP. A comparison between radioimmunotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for the treatment of peritoneal carcinomatosis of colonic origin in rats. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(11):3274–82.

<sup>13</sup> Aarts F, Bleichrodt RP, de Man B, Lomme R, Boerman OC, Hendriks T. The effects of adjuvant experimental radioimmunotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on intestinal and abdominal healing after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in the rat. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(11):3299–307.

<sup>14</sup> Gremontez F, Willaert W, Ceelen W. Intraperitoneal chemotherapy (IPC) for peritoneal carcinomatosis: review of animal models. *J Surg Oncol*. 2014;109(2):110–6.

# Resultados y discusión

## Objetivo 1. Implementación Técnica Experimental

### *Anestesia y Analgesia*

Se utilizó Isoflurano en solución para inhalación para la fase de inducción y mantenimiento de la anestesia. Es el fármaco de elección en cirugía veterinaria y se vaporiza con oxígeno mediante el equipo de anestesia provisto de un regulador Fluovac®. Para la inducción de la anestesia se utilizó una cámara de metacrilato que cuenta con un orificio de entrada del anestésico vaporizado. Una vez anestesiado el animal, se le dispuso en decúbito supino sobre una manta eléctrica para evitar una posible hipotermia por la anestesia y se le suministró isoflurano mediante mascarilla para mantener el plano de anestesia.

A continuación se inyectó subcutáneamente buprenorfina (Buprex® 0,3 mg/ml) a la dosis recomendada de 0,05 mg/kg en el Protocolo Normalizado de Trabajo 2.2.2.2 del SEA (documento de uso interno, no publicado). Para el peso de las ratas de 250-300 gramos la dosis a utilizar es de 0,0125-0,0150 mg, aproximadamente 0,5 mL de buprenorfina y el efecto analgésico se mantiene unas ocho horas. Se comprobó el plano de anestesia regularmente, mediante estimulación de puntos sensibles en el animal como los espacios interdigitales

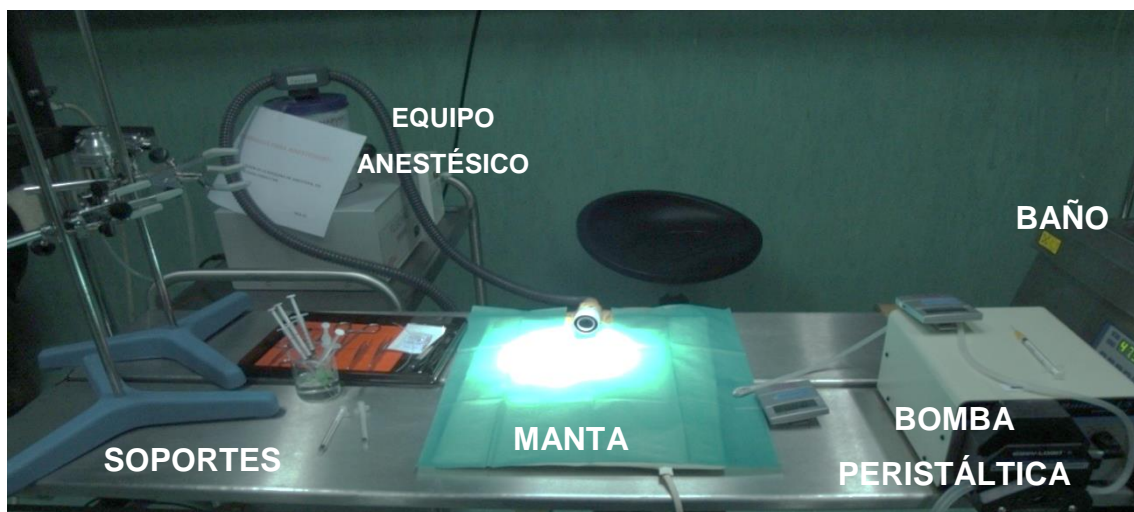


Figura 2. Mesa de cirugía con material necesario para HIPEC

y el extremo de la cola, de manera que si no resultó suficiente se aumentó el flujo del anestésico.

### Cateterización

Para realizar la cateterización de la vena yugular se siguió la técnica de Bardelmeijer *et al.*<sup>15</sup>. Se realizó una incisión en la intersección de las dos rectas imaginarias siguientes: de la oreja derecha a la pata izquierda y desde los incisivos hasta la pata derecha (*figura 3a*). A continuación, con la ayuda de una guía metálica curva, se condujo el catéter de manera subcutánea alrededor de la zona cervical hasta alcanzar la zona de exteriorización en la nuca, atravesando la piel del animal y quedando el catéter accesible para la toma de muestras, pero inaccesible para el animal una vez se despertó, ya que la toma de muestras se prolongó más allá de la duración de la anestesia (*figura 3b*). Después de separar la guía, se inyectó suero salino heparinizado 2 UI/mL en el catéter, para evitar la formación de trombos.

Se retiró el tejido subcutáneo y se localizó la vena yugular, donde se hizo una pequeña incisión con el fin de introducir el extremo del catéter hasta el hilo que previamente se había adherido a 2 cm de uno de los extremos del catéter. Se fijó dicho hilo al tejido muscular y se suturó el músculo y la piel, limpiando a continuación el catéter con suero salino heparinizado.

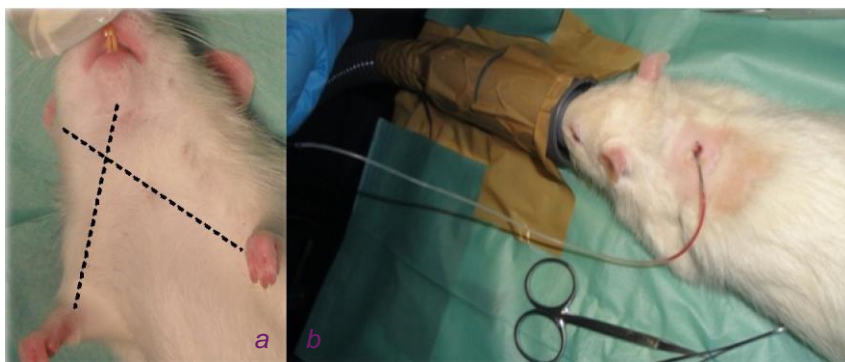


Figura 3 a) Localización vena yugular b) Exteriorización del catéter en nuca

---

<sup>15</sup> Bardelmeijer HA, Buckle T, Ouwehand M, Beijnen JH, Schellens JHM, Telling O van. Cannulation of the jugular vein in mice: a method for serial withdrawal of blood samples. *Lab Anim.* 2003 Jul 1;37(3):181–7.

## Procedimiento HIPEC

Para la realización de HIPEC, se utilizó el procedimiento descrito por Paul H. Sugarbaker mediante técnica abierta con la formación de un coliseo o *Soup bowl-like Container* que permite una distribución homogénea de la temperatura de la solución hipertérmica<sup>16</sup>. Para la consecución de este objetivo, no se incluyó MMC en la solución de instilación, ya que se pretendió simplemente el adaptar el procedimiento quirúrgico a las instalaciones del SEA.

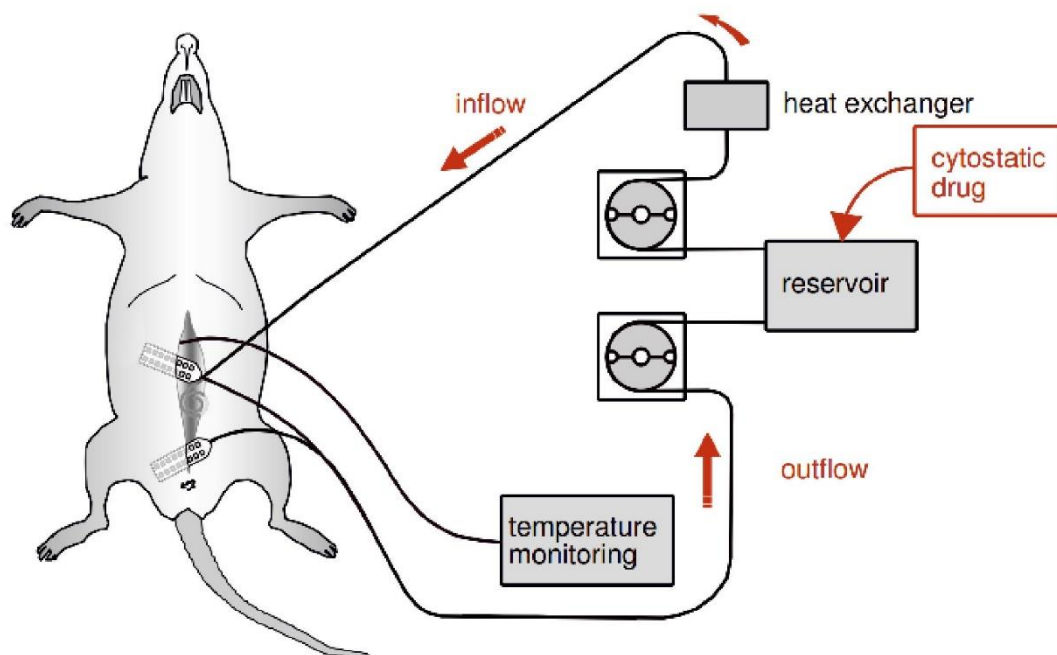


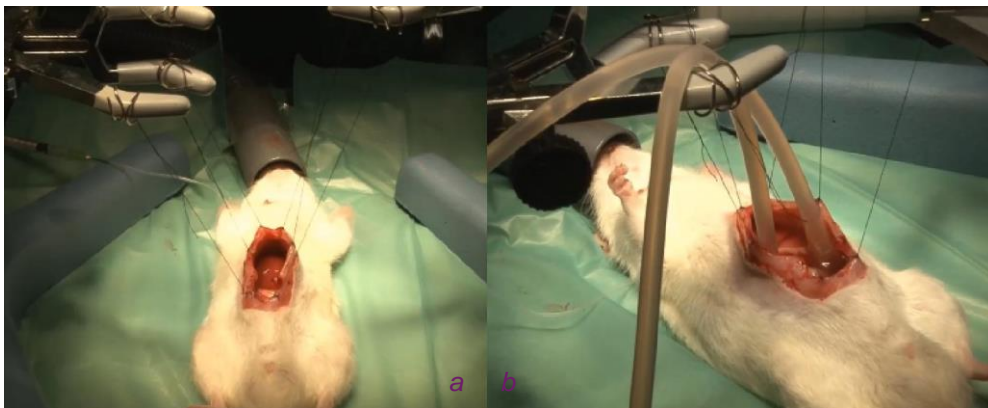
Figura 4 Diagrama del circuito HIPEC experimental (Pelz et al. utilizada bajo licencia CC BY 2.0 modificado del original<sup>10</sup> y accesible en <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/56>)

Antes de comenzar el procedimiento quirúrgico, se encendió el baño termostático que calentó la solución de instilación contenida en una botella de vidrio, fijando la temperatura unos 12-15° C por encima de la temperatura diana (42° C) que se debe alcanzar en la cavidad peritoneal, para compensar las pérdidas que ocurren durante la perfusión. Se preparó la bomba peristáltica (Masterflex® L/S Easy Load) utilizada para recircular la solución hipertérmica,

<sup>16</sup> Sugarbaker PH. Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1999;43 Suppl:S15–25.

fijando, además, una malla metálica con forma de bulbo al conducto de entrada de la bomba para evitar que los tejidos fueran succionados.

Se realizó una laparotomía desde la sínfisis púbica hasta el cartílago xifoides, y se utilizaron tres puntos de sutura con el extremo de sendas porciones de hilo en cada lateral de la capa muscular seccionada. Al tensar los hilos, éstos sirvieron de retractores mediante su fijación a unos soportes universales, varillas y pinzas. Las paredes musculares elevadas dieron lugar a la cavidad denominada coliseo que permite contener la solución de perfusión (*figura 5a*).



*Figura 5 a) Coliseo b) Perfusión en cavidad peritoneal*

A continuación, se puso en funcionamiento la bomba peristáltica con un flujo de 50 mL/min, vertiendo primero el fluido calentado en la cavidad peritoneal y, una vez alcanzó el nivel óptimo, se procedió a introducir la sonda de succión para comenzar la recirculación (*figura 5b*).

Durante toda la perfusión se monitorizó la temperatura para asegurar que se encontraba dentro del rango fijado. Además, periódicamente, se realizaron masajes en las paredes del abdomen para uniformizar la temperatura de la solución y asegurar que ésta alcance por igual todas las regiones del peritoneo, según recomiendan Elias *et al.*<sup>17</sup>

Transcurrido el tiempo establecido de perfusión (60 minutos), se retiró la solución hipertérmica mediante succión y se lavó el peritoneo con 300 mL de

---

<sup>17</sup> Elias D, Antoun S, Goharin A, Otmany AE, Puizillout JM, Lasser P. Research on the best chemohyperthermia technique of treatment of peritoneal carcinomatosis after complete resection. *Int J Surg Investig.* 2000;1(5):431-9.

solución glucosada usando, así mismo, la bomba peristáltica. Se soltaron los hilos que hacían las veces de retractores y se cerró al animal mediante suturas continuas de la capa muscular y de la piel, en segundo lugar. A continuación se procedió a retirar la anestesia para que el animal despertara mientras se continuó con la toma de muestras programada, con el animal ya dentro de una jaula.

### *Desarrollo de la toma de muestras*

Para posibilitar la realización de la curva concentración/tiempo en el desarrollo del HIPEC cuando se incorpore el fármaco en la solución de instilación, se programó la toma de muestras plasmáticas a través del catéter a ciertos intervalos de tiempo, a los 6, 15, 25, 35, 50, 65, 95, 155, 275 y 515 minutos. Los intervalos son menores al comienzo de la perfusión pues las concentraciones varían más rápido al principio de la misma, y son mayores progresivamente, pues los cambios de concentración tienden a estabilizarse con el transcurso del tiempo.

Además, se tomaron muestras de la solución perfundida en la cavidad peritoneal a los 30 y 60 minutos, que servirían para medir la evolución de la concentración de fármaco presente en la cavidad peritoneal.

## **Objetivo 2. Búsqueda bibliográfica técnica analítica de MMC**

Se recuperó un total de 46 artículos, al limitar la búsqueda por idioma se obtuvieron 44. No se tuvo acceso al texto completo de 31 trabajos, por lo que fueron rechazados. Tras revisar el texto completo de los 13 artículos restantes, se rechazaron 9 principalmente porque no cumplían los criterios de inclusión, pero también por tener protocolos duplicados. Los artículos finalmente

seleccionados fueron los pertenecientes a los autores Paroni *et al.*<sup>18</sup>, Dalton *et al.*<sup>19</sup>, Joseph *et al.*<sup>20</sup> y Song *et al.*<sup>21</sup>

También se incluyó el artículo de van der Speeten *et al.*<sup>22</sup> que no se recuperó en esta búsqueda sino en la búsqueda bibliográfica de parámetros farmacocinéticos del objetivo 3, pues se encontró que el protocolo de cuantificación de MMC en plasma descrito cumplía los criterios de inclusión. Quedando finalmente seleccionados 5 artículos para su estudio.

La extracción de los datos obtenidos se detalla en la tabla 1. Todos los artículos seleccionados contaban con un método de análisis de MMC en plasma mediante técnica de HPLC con detección de absorción en UV a 365 nanómetros, ahora bien, el procedimiento descrito en uno de los trabajos difería en dos aspectos fundamentalmente, no utilizaba como patrón interno Porfíromicina (PFM) y el tipo de columna usada permitía la inyección directa de la muestra sin realizar extracción de las proteínas presentes en el plasma<sup>21</sup>.

El resto de los métodos analizados utilizaban columnas C<sub>18</sub> de fase inversa convencionales. Se observó que, en todos los trabajos seleccionados el fluido a analizar, al menos, era plasma humano, pero adicionalmente se analizaba orina humana en 2 de ellos<sup>19,22</sup>. Este último estudio también cuantificaba el fármaco en el fluido peritoneal de los pacientes a los que se les aplicó HIPEC. Sin embargo, sólo en uno de los artículos analizaba MMC en plasma y orina de rata<sup>19</sup>.

Otro de los parámetros en el que coincidieron los artículos fue que el tiempo de retención de MMC era menor que el observado para PFM, siendo en ambos casos tiempos reducidos, concretamente entre cuatro y siete minutos. En uno de los artículos se especificó que ese tiempo de retención podía reducirse a

---

<sup>18</sup> Paroni R, Arcelloni C, De Vecchi E, Fermo I, Mauri D, Colombo R. Plasma mitomycin C concentrations determined by HPLC coupled to solid-phase extraction. *Clin Chem.* 1997;43(4):615–8.

<sup>19</sup> Dalton JT, Geuns ER, Au JL. High-performance liquid chromatographic determination of mitomycin C in rat and human plasma and urine. *J Chromatogr.* 1989;495:330–7.

<sup>20</sup> Joseph G, Biederbick W, Woschée U, Theisohn M, Klaus W. Sensitive and convenient high-performance liquid chromatographic method for the determination of mitomycin C in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;698(1-2):261–7.

<sup>21</sup> Song D, Au JL. Direct injection isocratic high-performance liquid chromatographic analysis of mitomycin C in plasma. *J Chromatogr B, Biomed Appl.* 1996;676(1):165–8.

<sup>22</sup> Van der Speeten K, Stuart OA, Chang D, Mahteme H, Sugarbaker PH. Changes induced by surgical and clinical factors in the pharmacology of intraperitoneal mitomycin C in 145 patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(1):147–56.

**Tabla 1. Métodos cuantificación de MMC con HPLC detección en UV**

Autor (referencia)	Paroni et al. (18)	Dalton et al. (19)	Joseph et al. (20)	Song et al. (21)	Van der Speeten et al. (22)
<b>Estándar interno</b>	PFM	PFM	PFM	NU	-
<b>Disoluciones stock</b>	MMC 0.5 g/L en metanol PFM 1 g/L en metanol	NU	MMC 0.21 g/L PFM 0.004 g/L en metanol-agua (50:50 v/v)	MMC 0.5 g/L	-
<b>Disoluciones de trabajo</b>	MMC 1 y 0.5 mg/L en agua PFM 1 mg/L en tampón fosfato 2 M (pH 7.4)	PFM 21.4 mg/L en tampón fosfato 0.5 M (pH 7)	MMC 1mg/L, 0.5 mg/L, 0.05 mg/L (para la recta de calibración)	MMC 0.005 a 5 mg/L	-
<b>Almacenamiento</b>	disoluciones stock -20°C (1 mes) muestras plasma -20°C	disolución stock a -20°C (3 semanas con degradación <4% ) muestras a -20 °C		disolución stock -70°C	muestras congeladas (no indica <sup>22</sup> )
<b>Descongelación</b>	-	-	Descongelar, agitar (10 s vortex), centrifugar (15800 g) 5 min a 4°C	-	-
<b>Extracción</b>	extracción en fase sólida en columna C18 de 1 mL bajo vacío	PR etilacetato:cloroformo:2-propanol (70:15:15)	acetoniitrilo	inyección directa, no es necesaria extracción	acetoniitrilo
<b>Concentración</b>	NU	PR evaporación con vortex a vacío PM corriente de N <sub>2</sub> a T° ambiente	centrifuga de vacío	NU	corriente de N <sub>2</sub> a 39°C
<b>Fase móvil</b>	agua:acetoniitrilo (85:15 v/v)	tampón fosfato 2,5 mM (pH 6.9):acetoniitrilo (87.5:12.5 v/v)	tampón fosfato 0.01 M (pH 6.5):metanol (70:30 v/v)	agua	tampón fosfato 0.01 M (pH 6.5):acetoniitrilo (85:15 v/v)
<b>Flujo (mL/min)</b>	1	1,5	1,3	1	1,5
<b>Fase estacionaria (Columna)</b>	columna C18 de fase inversa (Ultrasphere 150 x 4.6 mm, 5 µm)	columna C18 de fase inversa (Pecosphere 83 mm x 4.6 mm, 3 µm)	columna C18 de fase inversa (Hypersil ODS, 250 x 4mm, 5µm)	Capcell Pak MF Ph-1, 150 x 4.6 mm, 5µm	columna C18 de fase inversa (Microsorb 100, 150 x 4.6 mm, 5 µm)
<b>Tiempo de retención (min)</b>	4.9 MMC y 7.2 PFM	~4 MMC y ~6 PFM	4.92 MMC y 6.64 PFM	5 min	-
<b>Límite de detección (µg/L)</b>	-	-	1	-	-
<b>LLQ (µg/L)</b>	0.5	0.5 (en PM)	5	5	-
<b>Volumen inyectado (µL)</b>	100-200	50	50	25	50
<b>Abreviaturas utilizadas</b>	PFM porfiromicina MMC mitomicina-C	PR plasma de rata PM plasma humano	NU no utilizado LLQ límite de cuantificación		



menos de tres minutos al reemplazar la columna de 150 mm por una de menor longitud (30 mm x 3 mm), con diámetro de partícula también menor (3  $\mu\text{m}$ )<sup>18</sup>.

Con respecto al LLQ, se observó que difería en un orden de magnitud en 4 artículos, siendo 0.5  $\mu\text{g/L}$  en dos de ellos<sup>19,20</sup> y 5  $\mu\text{g/L}$  en otros dos<sup>21,22</sup>.

Todos los métodos descritos en los artículos estudiados tenían una complejidad técnica similar, excepto el protocolo que describía la inyección directa de las muestras en el HPLC, que destacaba por su simplicidad<sup>21</sup>. En contrapartida, la columna utilizada era menos versátil que en el resto de los métodos y no alcanzaba el mismo LLQ que dos de los artículos<sup>19,20</sup>. Aun así, sería un procedimiento recomendable para su uso en clínica, debido a su menor complejidad técnica y a la menor inversión en aparataje.

Los tiempos de retención de los analitos, reducidos en todos ellos, se consideraron adecuados para su implementación en el laboratorio, mientras que los tipos de dispositivos utilizados para la concentración de las muestras podrían ser limitante por su disponibilidad.

En cuanto a las limitaciones encontradas, es destacable la escasa recuperación de artículos realizando una búsqueda sistemática que pudo ser debido a que muchos de los descriptores no se correspondían con palabras claves asignados por los autores. Además, varios de los descriptores son posteriores a la publicación de los artículos, lo que impedía su recuperación utilizando el campo "MeSH" en la base de datos MEDLINE.

Durante el estudio de los trabajos realizado para el objetivo 3, se constató que estaban descritos métodos analíticos válidos en los artículos que se revisaban, pero los términos utilizados para la consulta en la base de datos, no se encontraban en los campos "MeSH" y "Title/Abstract" por lo que no fueron recuperados en la búsqueda primaria en MEDLINE.

Otra limitación que se encontró fue la escasa cantidad de artículos que describieran métodos de análisis para plasma de rata, por lo que se decidió estudiar también los métodos recuperados para plasma humano. En caso de adoptar como método de cuantificación uno de éstos, habría que adaptarlo y validarlo para el modelo animal propuesto en el laboratorio, principalmente por

la diferencia de volumen de las muestras. Ténganse en consideración que la muestra tomada en la rata es de apenas 0,2 mL.



Figura 6. Diagrama de flujo para la selección de los artículos de objetivos 2 y 3.

### Objetivo 3. Simulaciones determinísticas

Se localizó un total de 19 artículos resultado de la búsqueda según metodología descrita. Sólo un trabajo se recuperó de modelo farmacocinético en rata, pero al no cumplir el criterio de inclusión de análisis compartimental se rechazó. Los 18 artículos restantes eran estudios en pacientes, no se tuvo acceso al texto completo en 3 de ellos y otros 14 se revisaron pero no cumplían criterios de inclusión, si bien uno de ellos se utilizó para su estudio en el objetivo 2<sup>22</sup>, por lo que finalmente fueron rechazados 13 artículos.

Se seleccionó únicamente un artículo para su estudio, pues reunía los criterios de inclusión, el estudio de van Ruth *et al.*<sup>9</sup>

La tabla 2 muestra los parámetros farmacocinéticos que eran preceptivos para realizar las simulaciones y la figura 7 el modelo farmacocinético.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos

$k_{20}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,0230
$k_{23}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,0550
$k_{32}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,0340
$k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,0135
$V_c$ (L)	0,0780

$k_{20}, k_{23}, k_{32}, k_{12}$  son las microconstantes farmacocinéticas  
 $V_c$  es el volumen del compartimento central

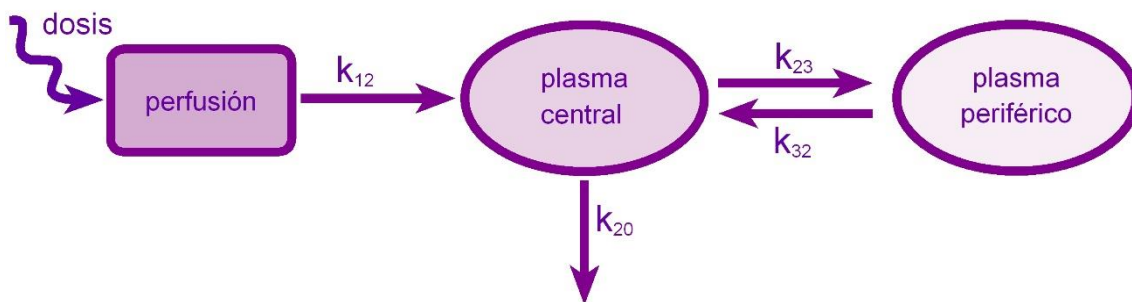
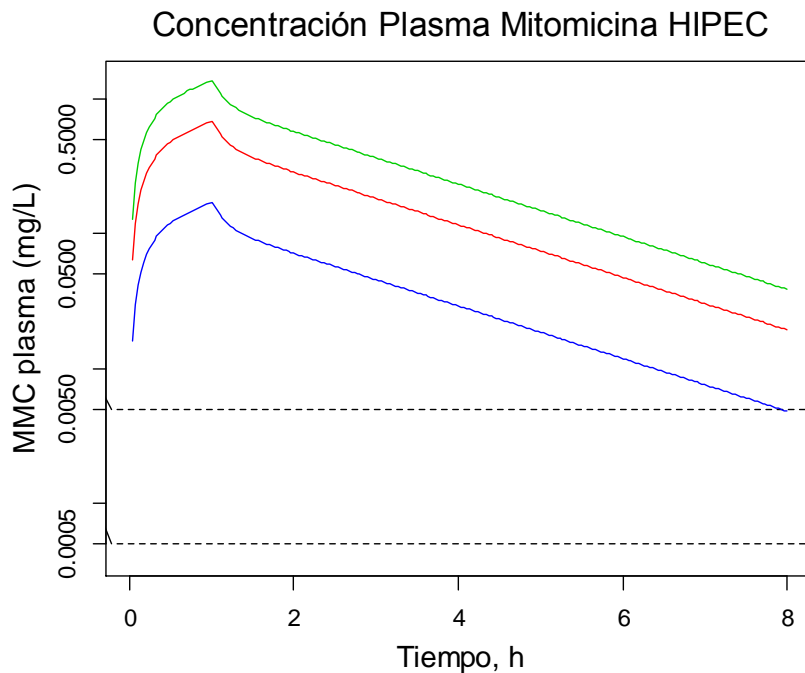


Figura 7. Modelo farmacocinético bicompartimental con HIPEC

La principal limitación encontrada fue la escasez de artículos recuperados que cumplieran los criterios de inclusión. Se encontraron muchos trabajos que incluían el término “Pharmacokinetics” que únicamente tenían descritas concentraciones plasmáticas y muy pocos estudios en los que se describieran modelos farmacocinéticos. Además, los pocos que sí los tenían, no se habían realizado mediante análisis compartimental, por lo que los parámetros necesarios para realizar las simulaciones no estaban descritos.

Es posible que también contribuyera a la escasa recuperación de trabajos la poca idoneidad de los términos de indización en muchos de los artículos. También se ha comentado anteriormente que, en general, son pocos los grupos de investigación que hayan implementado el procedimiento HIPEC en modelos animales, por lo que finalmente se hubo de adoptar un estudio en pacientes y se realizó un escalado alométrico,

Los perfiles de concentraciones plasmáticas obtenidos a partir de las simulaciones, administrando MMC con instilación en la cavidad peritoneal mediante HIPEC, se expresaron mediante una gráfica concentración/tiempo. Además de las simulaciones, los datos de LLQ obtenidos como resultado de la búsqueda bibliográfica del objetivo 2 se añadieron a la figura obtenida. De esta manera se pudo estimar si las concentraciones esperadas según se encontraban dentro de los rangos de detección de los métodos analíticos (ver figura 8).



*Figura 8. Simulaciones de los perfiles de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras administrar una instilación durante 60 minutos de una disolución de MMC a 2.5 mg/L (curva azul), 10 mg/L (curva roja) y 20 mg/L (curva verde). Las dos líneas discontinuas representan los LLQ de 0.5 y 5  $\mu$ g/L*

Se pudo observar que, según estas simulaciones, los métodos que describen un LLQ tanto de 5  $\mu$ g/mL como de 0.5  $\mu$ g/mL permitirían cuantificar el perfil de concentraciones de todas las dosis hasta las 8 horas. Por lo tanto, no supondría un problema el adoptar cualquiera de los procedimientos puesto que la concentración de MMC esperada en las muestras a analizar, a la vista de las simulaciones, sería mayor.

# Conclusiones

1.- El procedimiento quirúrgico desarrollado en el SEA para la implementación de la técnica del coliseo con administración de MMC en HIPEC resultó adecuado, así como el protocolo de extracción de muestras plasmáticas ligado a dicho procedimiento.

2.- Existen pocos protocolos para el análisis y cuantificación de MMC en plasma de rata. Los métodos analíticos de plasma humano que se estudiaron en la búsqueda realizada pueden resultar válidos para aplicación en el laboratorio, puesto que describen LLQ adecuados, pero deben ser adaptados y validados en futuros trabajos en el laboratorio.

3.- Según los resultados de las simulaciones farmacocinéticas realizadas, los métodos de cuantificación de MMC estudiados en el objetivo 2 son adecuados para detectar las concentraciones esperadas en plasma hasta las 8 horas posteriores al inicio del procedimiento. Estos resultados, aunque orientativos dada su naturaleza, permiten decidir qué métodos analíticos pueden ser apropiados

4.- Existen pocos modelos farmacocinéticos descritos en la literatura para HIPEC en animales. Además, los modelos en humanos se fundamentan en la exposición al fármaco mediante estimaciones del área bajo la curva (AUC) y concentraciones máximas ( $C_{máx}$ ), y en análisis no compartimental, por lo que sería aconsejable desarrollar líneas de investigación que estudien las hipótesis que se han descrito en este trabajo.

# Anexos

## Anexo 1: Material utilizado para implementación de la técnica HIPEC

### *Material quirúrgico general*

- Material de protección: Bata desechable, mascarillas, calzas y guantes de nitrilo.
- Utillaje de laboratorio estándar.
- Material quirúrgico: tijeras microcirugía s/punta recta 8 cm, pinzas fórceps, portaagujas sierra 12,5 cm, pinzas punta fina, micropinzas bulldog, agujas 21 mm, tijeras punta fina p/disección 8,5 cm, tijeras operar 11,5 cm.
- Agujas de punta roma.
- Medicamentos:
  - Isoflurano: anestésico empleado en la cateterización y la perfusión.
  - Buprenorfina (Buprex®): fármaco analgésico de elección
  - Heparina Hospira® 1%, equivalente a 5000 UI/mL
- Equipo de inducción y mantenimiento de anestesia: Surgivet®
- Suero fisiológico heparinizado: se utiliza para reponer los volúmenes de sangre extraídos en la toma de muestras.
- Manta calefactora.
- Contenedor residuos peligrosos líquidos y sólidos: para los materiales líquidos y sólidos que hayan estado en contacto con mitomicina-C.

### *Material para la cateterización de la vena yugular*

- Catéteres de silicona grado quirúrgico.

- Guía metálica para extraer el catéter en una zona cercana a la nuca de la rata.
- Hilo de sutura 3/0 y adhesivo de cianocrilato.

*Material para el procedimiento HIPEC y toma de muestras*

- Bomba de perfusión: Masterflex® L/S EasyLoad Modelo 77202-50.
- Baño termostático: Jp Selecta®.
- Termómetro digital con sonda termopar.
- Cronómetros.