

00563 N-1
2Ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INTERACCION METABOLICA ENTRE
PRAZICUANTEL Y DEXAMETASONA.
ESTUDIOS "IN VITRO".

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN FARMACIA

(BIOFARMACIA)

P R E S E N T A :

Q.F.B. DINORA FABIOLA GONZALEZ ESQUIVEL

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

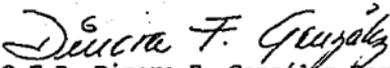
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

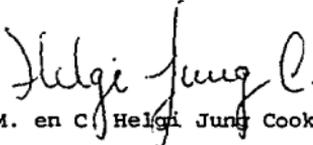
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. en C. Adriana M. Domínguez Ramírez.
PRIMER VOCAL: M. en C. Margarita S. Rodríguez A.
SECRETARIO: M. en C. Inés Fuentes Noriega.
PRIMER SUPLENTE: Dra. Elia B. Naranjo Rodríguez.
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".


Q.F.B. Dinora F. González Esquivel
Sustentante


M. en C. Helgi Jung Cook
Asesor de Tesis

Debes amar
el tiempo de los intentos.
Debes amar
la hora que nunca brilla.
Y si no,
no pretendas tocar lo cierto...

Silvio Rodríguez

INDICE

PAGINA

	INDICE DE TABLAS.....	vi
	INDICE DE FIGURAS.....	vii
	RESUMEN.....	ix
I.	INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
II.	GENERALIDADES.....	3
II.1.	Metabolismo de fármacos.....	3
II.2.	Metabolismo "in vitro".....	7
II.2.1.	Preparación de fracciones tisulares.....	12
II.3.	Interacciones entre fármacos.....	15
II.3.1.	Interacciones en la absorción.....	19
II.3.2.	Interacciones en la distribución.....	19
II.3.3.	Interacciones en el metabolismo.....	20
II.3.4.	Interacciones en la excreción.....	28
II.4.	Prazicuantel.....	29
II.4.1.	Propiedades Físicoquímicas.....	29
II.4.2.	Propiedades Farmacológicas.....	31
II.4.2.1.	Mecanismo de acción.....	32
II.4.2.2.	Absorción.....	34
II.4.2.3.	Distribución.....	34
II.4.2.4.	Metabolismo.....	36
II.4.2.5.	Eliminación.....	39
II.4.2.6.	Toxicidad.....	40
II.4.3.	Preparados.....	41
II.4.4.	Usos terapéuticos.....	41
II.4.5.	Métodos analíticos para la cuantificación de Prazicuantel.....	43
II.5.	Fármacos asociados a la administración de Prazicuantel.....	45
II.6.	Dexametasona.....	46
II.6.1.	Propiedades Físicoquímicas.....	46
II.6.2.	Propiedades Farmacológicas.....	47

II.6.2.1.	Mecanismo de acción.....	50
II.6.2.2.	Absorción.....	50
II.6.2.3.	Distribución.....	50
II.6.2.4.	Metabolismo.....	51
II.6.2.5.	Eliminación.....	51
II.6.2.6.	Toxicidad.....	52
II.6.3.	Preparados	53
II.6.4.	Usos terapéuticos.....	53
III.	PARTE EXPERIMENTAL.....	55
III.1.	Método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en homogenado de hígado de rata.....	55
III.1.1.	Material y Equipo.....	55
III.1.2.	Reactivos.....	55
III.1.3.	Preparación de la fracción sobrenadante 10,000 X g.....	56
III.1.4.	Soluciones.....	56
III.1.5.	Preparación de la muestra.....	57
III.1.6.	Condiciones cromatográficas.....	58
III.1.7.	Linealidad.....	61
III.1.8.	Repetibilidad.....	61
III.1.9.	Exactitud.....	61
III.1.10.	Selectividad.....	61
III.1.11.	Concentración mínima detectable.....	61
III.1.12.	Estabilidad de la muestra	62
III.2.	Metodología para el estudio "in vitro" de interacción metabólica entre prazicuantel y dexametasona.....	63
III.2.1.	Reactivos.....	63
III.2.2.	Soluciones.....	63
III.2.3.	Incubación.....	64
III.2.4.	Tiempo de Incubación.....	64
III.2.5.	Efecto de la concentración de Prazicuantel sobre la velocidad de oxidación (Vo). Experimento control.....	65

III.2.6.	Efecto de dexametasona sobre la velocidad de oxidación de prazicuantel.....	65
III.2.7.	Cálculos.....	66
III.3.	Determinación de proteínas en homogenado de hígado de rata.....	67
III.3.1.	Reactivos.....	67
III.3.2.	Soluciones.....	67
III.3.3.	Determinación colorimétrica.....	68
IV.	RESULTADOS.....	70
IV.1.	Validación del Método Analítico para la cuantificación de Prazicuantel en homogenado de hígado de rata por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	70
IV.2.	Parámetros validados.....	70
IV.3.	Estudio "in vitro" de interacción metabólica entre Prazicuantel y Dexametasona.....	80
V.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	93
V.1.	Validación del método analítico para cuantificar Prazicuantel en homogenado de hígado de rata...	93
V.2.	Interacción metabólica entre Prazicuantel y Dexametasona "in vitro".....	98
V.3.	Análisis retrospectivo del efecto "in vivo" de Dexametasona sobre los niveles plasmáticos de Prazicuantel.....	103
VI.	CONCLUSIONES.....	105
	BIBLIOGRAFIA.....	107

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Contenido de algunos metabolitos intracelulares en preparaciones hepáticas.....	14
II	Clasificación y ejemplos de interacciones.....	18
III	Efectos observados en los parámetros farmacocinéticos por alteración de algunas variables fisiológicas de un fármaco eliminado por hígado.....	26
IV	Usos terapéuticos del Prazicuantel.....	42
V	Incubación de diferentes concentraciones de Prazicuantel en presencia de Dexametasona.....	66
VI	Linealidad del método analítico.....	73
VII	Repetibilidad intradía del método analítico	75
VIII	Repetibilidad interdías del método analítico	75
IX	Exactitud del método analítico.....	76
X	Tiempo de incubación.....	82
XI	Velocidad de oxidación de Prazicuantel a diferentes concentraciones de sustrato. Experimento control....	85
XII	Parámetros cinéticos del experimento Control.....	85
XIII	Velocidad de oxidación de Prazicuantel en presencia de Dexametasona.....	88
XIV	Efecto de la adición de Dexametasona sobre la velocidad de oxidación de PZQ.....	90
XV	Parámetros cinéticos obtenidos del experimento de interacción entre Prazicuantel y Dexametasona.....	92
XVI	Análisis "t student" de diferencia de interceptos para la linealidad del método analítico.....	97
XVII	Análisis de varianza para la repetibilidad del método analítico	97
XIX	Análisis "t student" para la exactitud del método analítico.....	97

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Sistema propuesto en la transferencia de electrones del sistema monooxigenasa P-450.....	5
2	Efecto de la inducción enzimática sobre la cinética de un fármaco con bajo y con alto cociente de extracción.....	27
3	Estructura química del Prazicuantel.....	31
4	Esquema de la preparación del homogenado de hígado de rata.....	59
5	Esquema del método analítico utilizado para la cuantificación de Prazicuantel en homogenado de hígado de rata.....	60
6	Esquema de la determinación colorimétrica de proteínas.....	69
7	Cromatogramas de homogenado de hígado de rata blanco y homogenado añadido con Prazicuantel.....	72
8	Gráfica de linealidad del método analítico.....	74
9	Gráfica de exactitud del método analítico.....	77
10	Cromatograma de homogenado de hígado de rata añadido con Prazicuantel y con Dexametasona. Muestra control y muestra incubada durante 2 horas.....	78
11	Cromatograma de homogenado de hígado de rata añadido con Prazicuantel. Concentración mínima detectable...	79
12	Oxidación de Prazicuantel en función del tiempo de incubación.....	83
13	Actividad enzimática en función del tiempo óptimo de incubación.....	84
14	Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de oxidación de Prazicuantel.....	86
15	Gráfica doble recíproca del efecto de la concentración de Prazicuantel sobre su velocidad de oxidación (control).....	87

16	Efecto de la adición de Dexametasona sobre la velocidad de oxidación de Prazicuantel.....	89
17	Gráfica doble recíproca del efecto de Dexametasona sobre la velocidad de oxidación de Prazicuantel.....	91

RESUMEN.

Las interacciones entre fármacos provienen, en su mayoría, de la politerapia. Existen muchos ejemplos clínicos en la literatura que han mostrado como un fármaco puede modificar profundamente la acción de otro al ser administrados en conjunto. El efecto de un fármaco puede suprimirse, intensificarse e incluso observarse reacciones adversas, al administrarse simultáneamente dos o más fármacos. La detección de interacciones entre fármacos durante su uso terapéutico se dificulta por la complejidad de la situación clínica y patologías asociadas por lo que, para su confirmación o cuantificación, se han utilizado los estudios "in vitro" o en animales de experimentación, los que además pueden conducir a estudios posteriores en humanos que permitan establecer su importancia.

Considerando que entre los efectos adversos de la Neurocisticercosis (NCC), se encuentra la reacción inflamatoria debida tanto a la presencia de los cisticercos como a su destrucción, durante el tratamiento con Prazicuantel (PZQ), en algunos casos se prescribe la Dexametasona (DMZ) en forma simultánea. En un estudio previo, realizado en pacientes con diagnóstico de NCC, se observó que la DMZ disminuye los niveles plasmáticos de PZQ en aproximadamente 50%. Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que la DMZ podría inducir el metabolismo de PZQ el cual se lleva a cabo en el sistema microsomal hepático mediante el citocromo P450.

Para verificar la interacción metabólica, en el presente trabajo se realizó un estudio in vitro utilizando la fracción sobrenadante 10,000 X g de hígado de rata. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas en presencia de adenindinucleótidos y de diferentes concentraciones de PZQ y de DMZ. La oxidación de PZQ en ausencia y en presencia de DMZ en el homogenado, se cuantificó utilizando un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, previamente validado.

Los resultados demostraron que la velocidad de oxidación de PZQ aumenta con la adición de DMZ. Se aplicaron los métodos convencionales de doble recíproca para linearizar datos cinético-enzimáticos, obteniéndose altos coeficientes de correlación con disminución de

la pendiente respecto al control, con lo cual se corroboró que la DMZ es un activador enzimático. Así mismo, los resultados sugieren que en la oxidación de PZQ la DMZ podría estar actuando como un efector alostérico más potente, ya que a concentraciones altas de PZQ, hay competencia con DMZ por el mismo sitio alostérico.

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

El Prazicuantel (PZQ) es un fármaco antihelmíntico eficaz en el tratamiento de las infecciones provocadas por todas las especies de esquistosomas que infectan al hombre. Además, su uso clínico incluye el tratamiento de una gran variedad de infecciones causadas por tremátodos hemáticos, intestinales, hepáticos y pulmonares así como en el tratamiento de infecciones por céstodos intestinales, tisulares y cerebrales [1]. En América Latina y algunos países de Asia y Africa, la utilidad del PZQ en los últimos 10 años ha sido en el tratamiento de la neurocisticercosis (NCC), enfermedad endémica en países en vías de desarrollo y considerada en la actualidad como la enfermedad más común del sistema nervioso central, por lo que representa uno de los mayores problemas de salud pública [2].

En México, el PZQ ha sido usado en el tratamiento de la NCC humana desde 1980 [3]. Los primeros estudios fueron seguidos por otros estudios no controlados y casos aislados en donde se demostraba la eficacia del PZQ [4,5]. En 1984 [6], se publicó un estudio controlado en pacientes con NCC parenquimatosa y se demostró la eficacia del fármaco en más del 90% de los pacientes.

Durante la terapia de la NCC con PZQ, muchos pacientes presentan cefalea, vómitos o exacerbación de las crisis convulsivas. Estas reacciones colaterales no están relacionadas al fármaco, sino que se deben a una fuerte reacción inflamatoria que desarrolla el huésped durante la destrucción de los parásitos. Dichas manifestaciones generalmente son pasajeras y pueden ser tratadas con analgésicos o antiepilépticos, sin embargo, cuando son muy severas, como es la presencia de hipertensión endocraneal, se administran antiinflamatorios esteroidales como la dexametasona (DMZ) [2].

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) en pacientes con NCC parenquimatosa [7], se demostró que los niveles plasmáticos de PZQ disminuían en un 50% cuando se administraba la DMZ simultáneamente, sin embargo, los parámetros farmacocinéticos de absorción y eliminación no se vieron alterados. Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que la

DMZ podría inducir el metabolismo de PZQ, el cual se lleva a cabo en el sistema microsomal hepático mediante el citocromo P-450. En base a lo anteriormente mencionado, el objetivo del presente trabajo fue:

- Determinar si la DMZ actúa como inductor enzimático en el metabolismo de PZQ, utilizando para ello técnicas "in vitro".

II. GENERALIDADES.

II.1. METABOLISMO DE FARMACOS.

El citoplasma de las células del parénquima hepático contiene una red altamente organizada de membranas intracelulares conocida como retículo endoplásmico. El retículo está compuesto de una red de estructuras lamelares, tubulares y vesiculares las cuales engloban canales o espacios, los que a su vez, están separados del citoplasma pero son continuos con el medio nuclear.

Las membranas del retículo endoplásmico se dividen en dos tipos principales, lisa y rugosa, dependiendo de su apariencia morfológica y se diferencian porque la rugosa tiene los ribosomas unidos en la superficie externa, aunque existen evidencias de heterogeneidad entre las membranas respecto a composición química, físicoquímica y enzimática.

El aislamiento y fragmentación del retículo endoplásmico produce, después de homogeneización, partículas conocidas como microsomas, lo cual lo hace diferente de otros organelos ya que pueden aislarse en forma intacta. Se ha demostrado que los microsomas representan fragmentos de retículo endoplásmico [8].

Los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación de muchos fármacos están localizados en el retículo endoplásmico liso de las células hepáticas, designado operativamente fracción microsomal. Estas enzimas también están presentes en otros órganos como el riñón, el pulmón y el epitelio gastrointestinal, aunque en cantidades menores. El sistema enzimático microsomal hepático es capaz de biotransformar muchas sustancias y fármacos a metabolitos más polares y menos liposolubles los cuales pueden ser excretados por riñón y bilis [9].

Las reacciones químicas de biotransformación enzimática se clasifican como reacciones de fase I y reacciones de fase II. Las reacciones de fase I convierten al fármaco original en un metabolito más polar por oxidación, reducción o hidrólisis, produciendo metabolitos que pueden ser farmacológicamente inactivos, menos activos o, en ocasiones, más activos que la molécula inicial. Cuando el meta-

bolito constituye la forma activa, se dice que el compuesto original es un profármaco.

Muchas reacciones se producen en forma simultánea o consecutiva, de modo que el compuesto inicial es convertido en diversos metabolitos; el metabolismo de fase I seguido por una conjugación (fase II) se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque también contribuyen el riñón, el tracto gastrointestinal, el pulmón y el plasma [10].

El retículo endoplásmico liso contiene un grupo importante de enzimas oxidativas denominadas monooxigenasas que requieren oxígeno molecular (atmosférico), una oxidasa terminal (citocromo P-450), un agente donador de electrón o agente reductor, NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina) y una flavoproteína (NADPH citocromo P-450 reductasa) envuelta en la transferencia de electrones [11].

El paso clave en estas reacciones oxidativas es la inserción de un átomo de oxígeno molecular en el sustrato, produciendo a menudo un intermediario inestable que se rompe finalmente dando el producto final (figura 1). En términos cuantitativos, la mayoría de las reacciones oxidativas se llevan a cabo por una gran familia de isoenzimas denominadas citocromo P-450. Las proteínas del citocromo P-450 están incluidas en la bicapa lipídica del retículo endoplásmico liso. Una importante proteína asociada, la NADPH-citocromo P-450 óxido-reductasa, también está fijada a ésta bicapa lipídica en una relación estequiométrica de unas 10 moléculas de P-450 por una de reductasa [11].

Los citocromos P-450 constituyen el sistema oxidante de fase I, aunque las oxidaciones por aminooxidasas, varias hemoperoxidasas, prostaglandina H sintasa, xantina oxidasa y alcohol y aldehído deshidrogenasa también son importantes [8, 10].

Una serie de experimentos ha mostrado que la velocidad de metabolismo de fármacos esta relacionada de una manera más estrecha con la velocidad de reducción del citocromo P-450 que con la cantidad de P-450 o con la velocidad de reducción del citocromo c, por lo que se ha concluido que la NADPH-citocromo P-450 reductasa es el

paso limitante en las reacciones totales que envuelven al sistema microsomal [12]

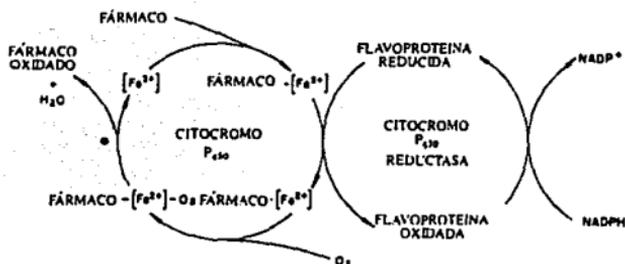


Figura 1. Sistema propuesto en la transferencia de electrones del sistema monooxigenasa P-450 [10].

II.1.1. CITOCROMO P-450.

El término citocromo P-450 o P-450 es usado para describir una o más hemoproteínas las cuales se combinan en su forma reducida con monóxido de carbono (CO) para dar un máximo de absorbancia alrededor de 450 nm.

Casi todo el citocromo P-450 hepático de todos los mamíferos se encuentra en los hepatocitos, los cuales representan entre el 60 y 80 % de las células presentes. [13].

El citocromo P-450 es una hemoproteína tipo b en donde la molécula Hemo del citocromo, es una ferroporofirina IX, la cual es un quelato de hierro planar en el cual el metal puede formar complejos con dos ligandos adicionales, el quinto y el sexto y la combinación con el primero facilita la unión con el segundo. En el caso del citocromo P-450 existen evidencias de que el quinto ligando está ocupado por un grupo tiol [14].

En las partículas microsomales existen 3 formas de citocromo P-450, las cuales se resuelven como entidades separadas; las 3 entidades aparentemente tienen diferente peso molecular, 44000, 50000 y 53000

y son inducidas diferencialmente por 3-metilcolantreno, fenobarbital y alcohol etílico. La demostración de tales formas explicaría las diferencias en actividad metabólica debidas al sexo, a la especie y las alteraciones debidas a condiciones no fisiológicas [15]. Los fármacos se combinan con la forma oxidada del citocromo P-450 produciendo dos tipos básicos de interacción espectral llamados tipo I y tipo II. Las interacciones tipo I se caracterizan por una depresión a 420 nm (rango=418-427 nm) y un máximo a 385 nm (rango=385-390 nm) cuyos ejemplos típicos son aminopirina, clorpromazina y hexobarbital. Los compuestos tipo II muestran un máximo a 430 nm (rango=425-435 nm) y un mínimo a 395 (rango=390-405 nm) representados por anilina, piridina y nicotina [16].

Los compuestos que producen espectro tipo I incluyen fármacos, pesticidas y hormonas esteroideas de diferentes clases químicas. Los compuestos capaces de actuar como inductores enzimáticos tienden a producir interacciones tipo I. Muchos de los compuestos que producen espectros tipo II son amins básicas, aunque algunos esteroides y alcoholes pueden producirlo [8].

Estudios realizados con microsomas tratados con fosfolipasa C, compuesto que destruye el sitio de unión tipo I, muestran que un compuesto no necesita producir espectro de unión para ser metabolizado. Esto no significa que el compuesto no se une al P-450, sino simplemente, que no produce cambio conformacional en la hemoproteína [17].

En la actualidad, se han aislado aproximadamente 140 citocromos P-450 de diferentes especies de mamíferos y no-mamíferos. Categorizar estos citocromos de acuerdo a su función ha sido una tarea difícil, ya que muchos de ellos poseen especificidades traslapadas por sus sustratos y, de muchos otros, no se conocen sus funciones. Desde el punto de vista evolutivo, los P-450s están relacionados unos con otros y constituyen un grupo, una superfamilia, compuesta de 25 familias y 21 subfamilias. Como regla general, aquellos P-450s que comparten un 40% de identidad en aminoácidos son miembros de la misma familia. Dentro de cada subfamilia de P-450s en mamíferos, alrededor del 60% son idénticos. Dentro de una subfamilia, los ge-

nes de los P-450s pertenecen al mismo grupo de genes y estructuralmente son muy similares. Sin embargo, sus perfiles catalíticos así como la regulación de su expresión puede variar considerablemente. Por ejemplo, los P-450s 3A1 y 3A2 (familia 3, subfamilia A miembro 1 y 2) en rata comparten 90 % de identidad y sólo el 3A1 es inducido por dexametasona [18].

Además de su importancia en la oxidación y reducción de xenobióticos lipofílicos, el P-450 se encuentra involucrado en el metabolismo de un gran número de lípidos endógenos. Algunas de las reacciones principales catalizadas por el P-450 en el metabolismo exógeno son:

Hidroxilación de esteroides, aromatización de esteroides, síntesis de ácidos biliares, 25-hidroxilación de vitamina D₃, síntesis de colesterol, producción de estrógenos de catecol y la α - y (α -1)-hidroxilación de ácidos grasos [13].

II.2. METABOLISMO "IN VITRO".

Los estudios de metabolismo de fármacos en animales vivos ha hecho posible elucidar las vías metabólicas y los factores que controlan los niveles de fármacos y sus metabolitos en los sitios receptores. Sin embargo, sin los estudios "in vitro", la interpretación de muchos de esos estudios sería imposible. Por medio de técnicas "in vitro", es relativamente fácil caracterizar la capacidad metabólica y determinar las constantes cinéticas de esas enzimas.

Gracias a los estudios "in vitro" se han obtenido resultados sobre los mecanismos de acción de fármacos, de los sitios específicos donde ocurre el metabolismo, de la presencia de sistemas de transporte o sobre sitios de unión intracelular y la correlación de esos hallazgos con los estudios "in vivo" ha permitido el entendimiento de los procesos llevados a cabo.

Los estudios de metabolismo "in vitro" pueden llevarse a cabo utilizando diferentes preparaciones enzimáticas: órganos aislados perfundidos, rebanadas de hígado, células aisladas, cultivos celulares, homogenados de tejidos y fracciones subcelulares. Las más utilizadas en la actualidad son los hepatocitos aislados de rata y

las fracciones microsomales, sin embargo, el objetivo y complejidad del estudio es el factor determinante en la selección de la preparación. La técnica de preparación y el medio utilizado es un factor determinante en la actividad enzimática [19].

El homogenado de hígado o fracción sobrenadante 10,000 X g es una preparación ampliamente utilizada en la obtención inicial de datos ya que contiene no sólo microsomas sino también un sistema generador de NADPH. La fracción 10,000 X g es mucho más fácil de preparar y la reacción llevada a cabo es lineal por un periodo de tiempo mayor debido a que la actividad enzimática se mantiene por tiempos prolongados [20].

La actividad "in vitro" requiere la presencia de un sistema generador de NADPH, ya sea en forma de NADP + fracción soluble (fracción 100,000 X g que contiene glucosa 6-fosfato y deshidrogenasa isocítrica) o NADP + glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o el mismo NADPH. El Magnesio, Mg^{2+} , se requiere para mantener la actividad máxima, puesto que la velocidad de oxidación de NADPH o la velocidad de transporte de electrones desde NADPH hacia los diferentes aceptores es mayor en presencia de Mg^{2+} o de Ca^{2+} [21].

La actividad "in vitro" de las enzimas microsomales se ve afectada no sólo por factores fisiológicos, sino también por otros factores como es el estado nutricional, cronofarmacología, así como otros relacionados a la metodología de preparación.

A continuación se describen los factores más estudiados:

Especies: Se ha demostrado ampliamente la existencia de diferencias en actividad metabólica, tanto cualitativas como cuantitativas. Las diferencias cualitativas pueden deberse a la presencia o ausencia de alguna enzima, en una especie particular. Las diferencias cuantitativas generalmente son debidas a variaciones en la cantidad de una enzima o en la cantidad del inhibidor natural, o bien debido a la presencia de competidores por el sustrato [22].

Raza, Cepa y Diferencias Genéticas. Las diferencias en el metabolismo de fármacos entre especies se han asociado con el desarrollo

evolutivo y parecen estar determinadas genéticamente. De la misma manera, es posible que cambios genéticos produzcan diferencias entre razas de animales de la misma especie, lo cual explicaría las diferencias en respuesta farmacológica debido a defectos genéticos [23].

Parece razonable pensar que las diferencias en cepa se deben principalmente a factores genéticos y ambientales, los cuales influyen tanto el nivel basal del metabolismo microsomal hepático como en la respuesta a inductores [8].

Las diferencias en la habilidad de acetilación muestran una distribución muy amplia, pero no se asocian con deficiencias o desordenes genéticos, sino a heterogeneidad genética [24].

Sexo: ha sido ampliamente documentada la diferencia en metabolismo de fármacos debida al sexo. En general, las ratas machos poseen mayor actividad oxidativa hacia un gran número de sustratos. La existencia de variaciones en el metabolismo debidas al sexo, en la rata, sugieren que hay diferencias en los componentes de la cadena de transporte de electrones o en la oxidasa terminal de ese sistema. Se ha observado, en preparaciones de ratas macho, un mayor contenido de esos componentes en aproximadamente un 20-30% [25,26].

En otras especies animales como ratón, hamster, coballo y monos no se han observado muchas diferencias debidas al sexo.

En el hombre, hay evidencias de metabolismo dependiente del sexo con nicotina, ácido salicílico, heparina, oxazepam y clordiazepóxido [27].

Edad: Numerosos estudios han mostrado que en animales recién nacidos y en fetos, la capacidad metabólica se encuentra limitada. Se ha observado que poseen niveles bajos de enzimas, lo cual se atribuye ya sea a la presencia de un inhibidor endógeno, a la ausencia de cofactores o bien a cantidad limitada de enzimas [28]. Los niveles de actividad enzimática se desarrollan en un período de 30 días aproximadamente. Este patrón de desarrollo es común a varias especies y se ha caracterizado con un gran número de sustratos.

El desarrollo de los sistemas de conjugación sigue un patrón semejante, la formación de conjugados de glutatión y glicina es baja al nacimiento y se incrementa gradualmente a niveles de adultos sobre un período de 30 días aproximadamente. [28-30].

Las preparaciones hepáticas de ratas de edad avanzada poseen capacidad metabólica "in vitro" disminuída y se ha sugerido que este fenómeno este ligado a la especie, ya que estudios similares, realizados en ratón, no muestran tales cambios [31].

A diferencia de las especies animales estudiadas, el feto humano posee una gran capacidad metabólica de fármacos en ciertas rutas o vías metabólicas. A las 8 semanas de edad, se detecta actividad oxidativa y la actividad tiende a aumentar en función del peso fetal hasta las 13 semanas. Las enzimas presentes tienen muchas de las características del sistema monooxigenasa de los adultos. El nivel de citocromo P-450 en hígado fetal es del mismo orden que el de microsomas de adultos (60-70%) pero los niveles de NADPH-citocromo c reductasa son sólo el 30% de los valores encontrados en adultos. Al considerar el peso relativo del hígado, entre 4 y 5% del peso corporal en el feto y 2% en el adulto, la capacidad metabólica de fármacos del feto por unidad de peso corporal se aproxima a los niveles de los adultos. El desarrollo postnatal enzimático es similar al ya descrito en animales, hay un incremento gradual en la formación de conjugados durante los primeros 3 meses y durante la niñez la eliminación de éstos es constante. La mayoría de las rutas para eliminar fármacos aumenta con la edad y la edad a la cual se alcanzan los valores encontrados en adultos depende de las rutas metabólicas involucradas [28, 31].

Además de los factores fisiológicos ya descritos, existen otros factores que influyen en el metabolismo de fármacos como son:

Estado nutricional: la dieta y el estado nutricional afectan marcadamente la actividad enzimática. La deficiencia de Calcio, Cobre y vitamina C disminuyen el metabolismo oxidativo y reductivo en ratas. También se ha observado disminución de los niveles de citocromo P-450 y de la actividad enzimática con deficiencia de magnesio

y zinc [32-34].

Dietas deficientes en proteínas, no sólo producen disminución en el metabolismo de fármacos, sino que también incrementan la toxicidad de estos [35].

El ayuno, a diferencia de los otros factores nutricionales, produce un patrón complejo de alteraciones que muestran relación dependiente del sexo. El ayuno no sólo afecta los procesos de fase I, ya que se producen menores cantidades de glucurónidos en animales en ayunas. A pesar de esto, la actividad "in vitro" de la glucuronil transferasa no disminuye [36].

Cronofarmacología. Estudios realizados en animales han demostrado que existe influencia del ritmo circadiano en los sistemas enzimáticos de metabolismo. La influencia de la luz es uno de los factores determinantes en la actividad metabólica en ratas [37].

En humanos existen pocos estudios relacionados a la influencia circadiana en el metabolismo, sin embargo, hay información de algunos fármacos que son completamente metabolizados, como la teofilina, cuya velocidad de metabolismo es mayor cuando se administra en durante el día (1:00 p.m.) y la indometacina, cuyas concentraciones plasmáticas son más altas cuando se administra por la mañana (7 a.m.) [38].

Prefez. Esta demostrado que, al menos en rata y en conejo, durante los estadios finales de la preñez, la capacidad metabólica materna se encuentra disminuída, tanto en las reacciones de fase I como en las de fase II [39].

En mujeres preñadas, se ha observado alteración en la unión a proteínas de algunos fármacos lo cual influye en la depuración hepática. Debido a que la producción de esteroides aumenta, se ha sugerido que los niveles altos de progesterona estimulan la actividad microsomal hepática, lo que a su vez aumenta la depuración intrínseca hepática [40].

Patología Hepática. Cualquier estado patológico que interfiera con

la función normal del hígado puede influir en los procesos de biotransformación de fármacos. Estos cambios fisiopatológicos pueden conducir a una reducción del flujo sanguíneo hepático, disfunción de hepatocitos, cambios cualitativos y cuantitativos de las proteínas séricas y cambios en el flujo biliar, lo que a su vez puede alterar la disposición de algunos fármacos.

No todos los procesos de biotransformación se ven alterados por enfermedades hepáticas, y es necesario hacer estudios con cada uno de los fármacos para determinar si existe o no, influencia en la actividad [41,42].

II.2.1. PREPARACION DE FRACCIONES TISULARES.

- Sacrificio del animal: Los animales deben mantenerse en ayuno por al menos 24 horas previas al sacrificio con la finalidad de estandarizar condiciones. El ayuno disminuye los niveles de glicógeno y previene la pérdida de microsomas durante la centrifugación [36]. El uso de anestésicos previo al sacrificio del animal es recomendable sólo que se haya establecido que este no afecta la actividad enzimática bajo estudio.

- Perfusión del hígado: Algunos investigadores recomiendan perfundir el hígado previo a la homogeneización cuando se va a estudiar unión de fármacos y P-450. Sin embargo, puede causar pérdida de proteínas hepáticas y de P-450 así como incrementar el tamaño y peso del hígado hasta en un 25%. También puede disminuir la actividad de la fracción 10,000 X g.

Una vez que el hígado ha sido removido, todas las operaciones técnicas deberán realizarse en frío, ya sea con baño de hielo y soluciones mantenidas en frío, o en un cuarto frío [43].

- Medio de homogeneización: las soluciones más utilizadas son, sacarosa isotónica (0.25M) o cloruro de potasio (KCl 1.15%, p/v); cuando se usa sacarosa, la centrifugación inicial debe realizarse a velocidades mayores de 10,000 X g para prevenir contaminación mitocondrial de la fracción microsomal, sin embargo, los microsomas son menos activos que los preparados con KCl isotónica. Cuando se usa KCl como medio de homogeneización se produce aglutinación de

mitocondria y microsomas, lo cual previene la contaminación mitocondrial y con una velocidad de centrifugación de 10,000 X g es suficiente. Se ha observado mayor rendimiento de microsomas con el uso de medios conteniendo sacarosa y una solución amortiguadora (sacarosa 0.25M y Tris-HCl 0.01M, pH=7.4) o KCl (1.15%)/fosfatos (0.01M) pH=7.4 [20].

- Método de preparación del tejido: existen diferentes técnicas las cuales poseen ventajas y desventajas dependiendo de los objetivos del estudio:

La técnica con navajas rotatorias es muy conveniente cuando se procesan grandes cantidades de tejido ya que se acumulan cantidades grandes de una fracción subcelular en particular, con el fin de aislar y purificar enzimas. El homogenado obtenido debe filtrarse a través de una gasa doble antes de someterlo a centrifugación diferencial. Este método disminuye el rompimiento celular pero puede haber contaminación de fracción microsomal por rompimiento de mitocondria [20].

El homogeneizador con tubo de vidrio y pistilo de teflón (Potter-Elvehjem) es el más utilizado y puede ser manipulado por medio de un motor eléctrico conectado al pistilo, el cual gira a una velocidad constante mientras el tubo es movido en forma ascendente y descendente (6-8 movimientos). El homogenado obtenido consiste de una masa de células diluidas, partículas celulares (núcleo, mitocondria y microsomas) y algunas células completas; estos componentes pueden separarse por centrifugación diferencial.

Deberán utilizarse pequeñas cantidades de tejido, previamente cortadas, para reducir el tiempo de homogeneización y no producir sobrecalentamiento del pistilo lo cual destruye las enzimas. Todo el proceso deberá realizarse en frío.

Una técnica más recientemente utilizada es la sonicación tisular, la cual es muy rápida y segura, sin embargo también debe de evitarse el sobrecalentamiento.

- Almacenamiento: la práctica más recomendable es no almacenar microsomas; deberán hacerse estudios de estabilidad para determinar el efecto de almacenamiento sobre la reacción particular bajo estu-

dio.

Las preparaciones microsomales pueden almacenarse como fracción 10,000 X g a -15°C o liofilizada; pellet microsomal a -15°C o bajo corriente de nitrógeno a -15°C , o como suspensión al 25% en glicerol a -15°C ; como microsomas anhidros congelados; suspensión microsomal en solución amortiguadora a -15°C y como hígado intacto congelado a -20°C [36,43].

La tabla I muestra el contenido de algunos metabolitos intracelulares en homogenado de hígado y en órgano perfundido bajo diferentes condiciones [43].

TABLA I. Contenido de algunos metabolitos intracelulares en preparaciones hepáticas [43].

Sustrato [nmol/gr]	Homogenado		Órgano perfundido "in vivo"	aislado aislado	aislado 90' después
	t=0 (fresco)	90' después (oxigenado)			
Lactato	8200	5170	1280	12000	1102
Malato	1275	1340	248	750	149
FEP	41	156	100	6	66
3 FG	169	358	238	49	145
G6F	2310	189	136	986	89
α CG	35	122	90	-	295
Glucosa	31000	93000	6000	26000	8000
Glicógeno	280000	144000	295000	320000	250000
Nucleótidos	2635	173	3780	2563	3750
ATP/ADP	0.6	< 0.2	3.8	0.4	3.6

FEP=fosfoenolpiruvato; 3FG=3 fosfogluconato; G6F=glucosa-6-fosfato; α CG=alfa-ceto glutamato; Nucleótidos=suma de adenin nucleótidos; ATP/ADP=trifosfato/difosfato de adenin nucleótidos.

Los microsomas almacenados como suspensiones en solución amortiguadora a -15°C o como liofilizado, son menos activos que cuando se almacenan como pellet cubierto con 1 ml de solución amortiguadora. También se ha reportado que el almacenamiento del hígado intacto a -20°C durante 30 días mantiene la actividad de la NADPH-citocromo c reductasa, de la NADPH-neotetrazolio reductasa y del citocromo P-450.

- Procedimiento de incubación: el orden de adición de los componen-

tes a incubar deberá estandarizarse con el fin de disminuir la variación. La preparación enzimática se adiciona generalmente al final para evitar interacción con el sustrato. Las soluciones de cofactores y nucleótidos deberán prepararse al momento de su uso y no es recomendable almacenarlas [20].

II.3. INTERACCIONES ENTRE FARMACOS.

Las interacciones entre fármacos ocurren cuando la farmacodinamia o la farmacocinética de un fármaco, o ambos, se modifican por la presencia de otro fármaco. Las interacciones farmacodinámicas se presentan cuando los fármacos interactuantes, actúan en los mismos receptores, mismos sitios de acción o mismos sistemas fisiológicos. Cuando un fármaco interfiere con la absorción, transporte, distribución, biotransformación o eliminación de otro, ocurre una interacción farmacocinética y puede alterarse más de un parámetro farmacocinético primario: velocidad de absorción, concentración libre, volumen de distribución, depuración sistémica o depuración renal y fracción absorbida, los que a su vez alteran los parámetros secundarios como tiempo de vida media, área bajo la curva y fracción excretada [44].

Las posibilidades de interacciones en el organismo son prácticamente ilimitadas y el campo con mayor potencialidad de interacciones está en la práctica clínica. Algunos estudios epidemiológicos [45] han demostrado que la frecuencia de reacciones adversas aumenta desproporcionadamente respecto al incremento en el número de fármacos prescritos.

La probabilidad de que ocurra una interacción entre fármacos es muy grande, sin embargo pocas tienen consecuencias clínicas importantes. La mayoría de las interacciones dentro del organismo no son de la magnitud suficiente como para alterar la concentración libre o la actividad terapéutica de alguno de los fármacos involucrados. La dosis de la mayoría de los fármacos necesitaría ser de la magnitud de la dosis letal media para demostrar la significancia de la interacción, o algunas veces, los cambios en los procesos afectados o vías de eliminación son tan pequeños que carecen de importancia.

Las interacciones, al igual que todas las respuestas del organismo son procesos graduados; el grado de interacción depende de la concentración de las especies interactuantes, y por lo tanto de la dosis y del tiempo. De esto se desprende el que las interacciones se consideren como una causa más de variabilidad en la respuesta farmacológica [46].

Los mecanismos [47] por los cuales se observan alteraciones en la respuesta farmacológica, se han clasificado como:

Sumación: Se observa cuando dos o más fármacos con efecto farmacológico similar, sin importar el mecanismo de acción, producen una respuesta que es la suma algebraica de los efectos individuales.

Efecto Aditivo: El efecto combinado de dos fármacos que actúan por el mismo mecanismo de acción es la adición de los efectos individuales.

Sinergismo: el efecto combinado de dos fármacos es mayor que la suma algebraica de los efectos individuales. El término es usado, generalmente, para fármacos que tienen diferente mecanismo de acción, en donde el fármaco sinergista aumenta el efecto de otro, ya sea alterando su distribución, metabolismo o excreción.

De la misma manera, la administración conjunta de dos o más fármacos puede producir un efecto combinado menor al esperado o menor a la suma de los efectos individuales, este fenómeno es llamado antagonismo. Existen cuatro mecanismos conocidos por los cuales un fármaco puede oponerse a la acción de otro y estos son:

Antagonismo farmacológico: cuando un fármaco (antagonista) interfiere en la formación del complejo agonista-receptor, se reduce el efecto farmacológico del fármaco agonista.

Antagonismo fisiológico o funcional: se observa cuando dos agonistas, que actúan en diferente sitio, producen efectos opuestos en la misma función fisiológica. Cada fármaco actúa en su propio receptor.

Antagonismo bioquímico: este tipo de antagonismo puede considerarse como el opuesto al sinergismo y se observa cuando un fármaco disminuye la cantidad disponible al sitio efector de un segundo fármaco. Por ejemplo, el antagonista puede aumentar la velocidad de metabo-

Las interacciones, al igual que todas las respuestas del organismo son procesos graduados; el grado de interacción depende de la concentración de las especies interactuantes, y por lo tanto de la dosis y del tiempo. De esto se desprende el que las interacciones se consideren como una causa más de variabilidad en la respuesta farmacológica [46].

Los mecanismos [47] por los cuales se observan alteraciones en la respuesta farmacológica, se han clasificado como:

Sumación: Se observa cuando dos o más fármacos con efecto farmacológico similar, sin importar el mecanismo de acción, producen una respuesta que es la suma algebraica de los efectos individuales.

Efecto Aditivo: El efecto combinado de dos fármacos que actúan por el mismo mecanismo de acción es la adición de los efectos individuales.

Sinergismo: el efecto combinado de dos fármacos es mayor que la suma algebraica de los efectos individuales. El término es usado, generalmente, para fármacos que tienen diferente mecanismo de acción, en donde el fármaco sinergista aumenta el efecto de otro, ya sea alterando su distribución, metabolismo o excreción.

De la misma manera, la administración conjunta de dos o más fármacos puede producir un efecto combinado menor al esperado o menor a la suma de los efectos individuales, este fenómeno es llamado antagonismo. Existen cuatro mecanismos conocidos por los cuales un fármaco puede oponerse a la acción de otro y estos son:

Antagonismo farmacológico: cuando un fármaco (antagonista) interfiere en la formación del complejo agonista-receptor, se reduce el efecto farmacológico del fármaco agonista.

Antagonismo fisiológico o funcional: se observa cuando dos agonistas, que actúan en diferente sitio, producen efectos opuestos en la misma función fisiológica. Cada fármaco actúa en su propio receptor.

Antagonismo bioquímico: este tipo de antagonismo puede considerarse como el opuesto al sinergismo y se observa cuando un fármaco disminuye la cantidad disponible al sitio efector de un segundo fármaco. Por ejemplo, el antagonista puede aumentar la velocidad de metabo-

lismo o de excreción del agonista, o incluso puede competir por el transporte del agonista.

Antagonismo químico: es simplemente la reacción entre dos fármacos que dan lugar a un producto inactivo.

La tabla II muestra algunos ejemplos de interacciones [46,47].

TABLA II. CLASIFICACION Y EJEMPLOS DE INTERACCIONES [46,47].

Interacciones Farmacodinámicas			
Respuesta	Ejemplo	Reacción	
	Aspirina - Codeína	Sumación (mecanismo de acción diferente)	
↑	Aspirina - Fenacetina	Adición (actúan en el mismo receptor)	
↑	Tiramina ← IMAO'	Sinergismo (inhibición del metabolismo)	
	Difenhidramina → Histamina	Antagonismo farmacológico (competencia por los sitios receptores)	
	Histamina - Norepinefrina	Antagonismo fisiológico (efectos opuestos)	
↓	Warfarina = Vitamina K	Efectividad disminuida mutuamente	
Interacciones Farmacocinéticas			
Parámetro	A	B	Reacción
	↑ Acetaminofén ← Metoclopramida		B acelera vaciamiento gástrico
Velocidad de absorción	↓ Lidocaína ← Epinefrina		B disminuye el flujo sanguíneo en el sitio de administración, SC e IM.
	↑ Metoprolol ← Cimetidina		B inhibe metabolismo de A (efecto de primer paso disminuido).
Biodisponibilidad oral	↓ Tetraciclina ← Calcio		B forma un complejo insoluble con A.
Volumen de distribución	↑ Acido salicílico = Fenilbutazona		Desplazamiento competitivo de los sitios de unión en plasma y en tejidos.
	↓ Digoxina ← Quinidina		B desplaza A de los sitios de unión en tejidos.
Depuración hepática	↑ Warfarina ← Fenobarbital		B induce enzimas microsomales.
	↓ Teofilina ← Eritromicina		B inhibe el metabolismo de A.
Depuración renal	↑ Ac. salicílico ← Bicarbonato		B eleva el pH urinario disminuyendo la reabsorción tubular de A.
	↓ Bencilpenicilina ← Probenecid		B inhibe la secreción de A.

(=) denota efecto bidireccional; (←) o (→) denota interacción unidireccional, la flecha apunta hacia el fármaco afectado.

IMAO= fármacos inhibidores de monoaminoxidasas.

II.3.1. INTERACCIONES EN LA ABSORCION.

Una interacción a nivel de absorción puede aumentar o disminuir la velocidad de absorción o la cantidad absorbida, o bien ambas. Algunos de los mecanismos potenciales de interacción a nivel de absorción son [44].

- Efectos del pH sobre la ionización y disolución.
- Cambios en la motilidad gastrointestinal.
- Modificación de la velocidad de vaciamiento gástrico.
- Formación de quelatos, complejos químicos.
- Competencia o interferencia con el transporte activo.
- Cambios en el flujo sanguíneo esplácnico.
- Cambios en el volumen, composición y viscosidad de las secreciones gastrointestinales.
- Alteraciones en la flora intestinal.

II.3.2. INTERACCIONES EN LA DISTRIBUCION.

El desplazamiento de la unión a proteínas es la causa más común de distribución alterada por interacción entre fármacos. El desplazamiento implica competencia entre dos fármacos por los sitios de unión en la proteína, lo cual se refleja por un aumento en la concentración libre del fármaco desplazado. Algunas veces el desplazamiento se efectúa a través de un efecto alostérico (cambios conformacionales en la proteína), lo que disminuye la afinidad del fármaco por la proteína.

Las condiciones que favorecen el desplazamiento son cumplidas por muy pocos fármacos, y por lo tanto no tienen consecuencias terapéuticas importantes, ya que el fármaco debe unirse en gran proporción para que pueda ser desplazado, así mismo, el desplazador debe poseer gran afinidad por los sitios de unión, para lo cual deberá encontrarse a una concentración que se aproxime o exceda la concentración molar de los sitios de unión de la proteína. En general, sólo los fármacos ácidos cumplen esas condiciones ya que los básicos tienen volúmenes de distribución muy grandes, son administrados en dosis muy pequeñas y las concentraciones plasmáticas que alcanzan son más bajas que las de los fármacos ácidos. A pesar de esto,

son muy pocos los fármacos ácidos que alcanzan las concentraciones molares requeridas, como la fenilbutazona, el ácido salicílico y algunas sulfonamidas [44].

En un régimen de dosificación múltiple, el desplazamiento depende del cociente de extracción, E, del fármaco. El desplazamiento siempre produce un incremento del volumen de distribución, pero la depuración aumenta sólo que el fármaco tenga un cociente de extracción bajo, ya que solo el fármaco libre es capaz de atravesar membranas.

Para fármacos con un valor bajo de E, la concentración inicial y el área bajo la curva se reducen (ABC) debido a que el volumen de distribución y la depuración total aumentan, sin embargo, el tiempo de vida media no cambia o disminuye ligeramente. En este caso la depuración intrínseca no depende de la fracción libre del fármaco, la concentración libre al estado estacionario no cambia y por lo tanto la respuesta farmacológica no se afecta, a pesar de la caída de los niveles plasmáticos totales.

En el caso de fármacos con E alto, el valor de la depuración total es independiente de la unión a proteínas, ya que su valor se aproxima al valor del flujo sanguíneo. Si la administración es intravenosa, el volumen de distribución y el tiempo de vida media aumentan conforme aumenta la fracción libre en plasma pero los niveles totales no cambian. La concentración libre aumenta por lo que la respuesta farmacológica puede aumentar. En el caso de administración oral, disminuye la biodisponibilidad y por lo tanto el ABC debido a que el efecto de primer paso aumenta considerablemente [24,44].

II.3.3. INTERACCIONES EN EL METABOLISMO.

Inhibición metabólica.

Un fármaco puede inhibir la actividad enzimática microsomal de diferentes maneras, incluyendo alteración de algunos parámetros fisiológicos (niveles hormonales, estado nutricional) o por administración de inhibidores de la síntesis de componentes microsomales. Estos factores producen inhibición de manera indirecta. Las vías por las cuales se inhibe el metabolismo a nivel enzimático en las

monooxigenasas incluyen competencia por el sitio activo en las enzimas, inhibición de algún componente de la cadena de transporte de electrones (citocromo P-450), alteración de la conformación de la enzima, lo que a su vez altera la unión de fármacos y alteración de los complejos formados entre fármaco y citocromo P-450.

A pesar de que los inhibidores enzimáticos no comparten características estructurales que permitan agruparlos, todos ellos son liposolubles y requieren cumplir ciertos requerimientos para que actúen como inhibidores del metabolismo "in vivo". Las concentraciones que producen inhibición no deberán producir efectos tóxicos, los valores de los parámetros cinéticos K_m y $V_{máx}$ no deberán de ser mayores que los del sustrato, el metabolismo por otras vías diferentes deberá ser mínimo y el inhibidor deberá excretarse a una velocidad menor que la del sustrato [48].

Se ha observado que los inhibidores ejercen un efecto bifásico de manera que inicialmente producen inhibición y estimulan la velocidad metabólica cuando se administran repetidamente. Sin embargo, estudios con SKF-525A revelan que las enzimas sintetizadas por el proceso inductivo son susceptibles a la inhibición, por el compuesto mismo y por sus metabolitos [49].

Las consecuencias cinéticas de inhibición del metabolismo dependen del cociente de extracción (E) del fármaco cuyo metabolismo se inhibe. En general, se ha observado que después de administración oral, en fármacos con E bajo, aumenta el tiempo de vida media por disminución de la depuración total, sin embargo, después de administración parenteral, ni el volumen de distribución ni la biodisponibilidad se afectan.

Los fármacos con E alto, muestran un aumento del área bajo la curva de concentración plasmática cuando se administran en forma oral, ya que en la administración intravenosa, el efecto inhibitorio sobre E es mínimo y no afecta ni la depuración ni el efecto de primer paso [24,44].

Inducción metabólica.

Una de las propiedades del sistema microsomal hepático es su capacidad de aumentar la síntesis de enzimas de manera no específica cuando es expuesto a fármacos liposolubles y otros xenobióticos. Este aumento en la actividad enzimática puede dar lugar a una disminución del efecto terapéutico, alterando la intensidad y duración de la acción del fármaco o aumentando la toxicidad de fármacos, dependiendo de la actividad de los metabolitos producidos. A pesar de que las características de los compuestos inductores son muy diferentes, comparten algunas como: su liposolubilidad a pH fisiológico y poseen un tiempo de vida media prolongado. Por lo que, compuestos liposolubles con tiempo de vida media corta, inducen el metabolismo solo en administración múltiple [30,46].

Los cambios bioquímicos observados durante la inducción enzimática permiten dividir a los agentes inductores en dos grupos: los barbitúricos, ejemplificados por el fenobarbital, que aumentan el metabolismo de una gran variedad de sustratos y que estimulan diferentes vías metabólicas como oxidación, reducción, formación de glucurónidos y des-esterificación; el segundo grupo, ejemplificado por 3-metilcolantreno y 3-4 benzopireno, comprende los hidrocarburos policíclicos que estimulan el metabolismo de un número limitado de sustratos y de reacciones. También se ha demostrado que los glucocorticoides, alcohol, cetonas, isoniazida y otros xenobióticos, inducen determinados miembros individuales de la superfamilia del citocromo P-450 [30,50].

Los principales cambios bioquímicos que acompañan a la inducción por fenobarbital se han observado en la actividad de los componentes de la cadena de transporte de electrones. Se ha observado incremento en la actividad de NADPH-oxidasa, NADPH-citocromo c reductasa, NADPH citocromo P-450-reductasa y citocromo P-450. Algunos de estos cambios también se han observado con 3-metil colantreno pero en menor magnitud [30].

Tal parece que los cambios operados por los agentes inductores son específicos para los sistemas monooxigenasa, ya que en otros sistemas enzimáticos son poco frecuentes. Los sistemas enzimáticos aso-

ciados tal como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y ácido isocítrico deshidrogenasa se ven aumentados pero glucosa-6-fosfatasa y citocromo b₅ no aumentan o se ven disminuídas con fenobarbital. La enzima microsomal UDP-glucuronil transferasa muestra incremento moderado, el cual es paralelo al aumento en actividad de UDP-glucosa deshidrogenasa. Cuando estos cambios se examinan en base al contenido de proteína microsomal por peso del hígado, se observa un aumento de aproximadamente 12 a 14 veces, aún en aquellos sistemas en que la actividad específica disminuye [30,51].

Además de las diferencias cuantitativas encontradas para los dos tipos de inductores, se ha sugerido que la especificidad hacia los sustratos se debe también a diferencias cualitativas en el citocromo P-450. Se han observado diferencias espectrales que sugieren que la hemoproteína inducida por compuestos del tipo hidrocarburos policíclicos es diferente a la de animales control o tratados con fenobarbital, y para diferenciarla se ha denominado P₁-450 o P-448 (máximo de absorbancia = 446-448 nm) [52].

El uso de inhibidores de síntesis de proteínas ha permitido comprobar algunos mecanismos de inducción enzimática. El aumento en actividad enzimática está relacionado a un aumento en la velocidad de síntesis de proteínas o bien a inhibición de la velocidad de degradación de enzimas. Los inductores enzimáticos pueden estimular la formación de enzimas ya sea por medio de interacción directa con ADN estimulando la síntesis de ARN mensajero, pueden interactuar con el retículo endoplásmico aumentando la transferencia de ARNm sobre los ribosomas, también pueden interactuar con la enzima misma, o actuar a nivel de receptores que regulan la expresión genética de las múltiples formas del citocromo P-450 [30].

La inducción por fenobarbital envuelve un incremento en varios ARNm incluyendo aquellos que codifican la epóxido-hidratasa, NADPH-P-450 óxidoreductasa, UDP-glucuronosiltransferasa y los ARNm IIB1/IIB2. La acumulación de ARNm se debe a un aumento en la velocidad de transcripción genética. A pesar de esto, aún no se ha identificado el receptor de los P-450s inducibles por fenobarbital [53].

La expresión celular de los P-450s inducibles por hidrocarburos policíclicos es regulada por un receptor citosólico (receptor Ah), que interactúa con los fármacos de este tipo y es transferido al núcleo, donde interacciona con el ADN nuclear estimulando la transcripción [50,53].

El efecto inductor del fenobarbital o de los hidrocarburos policíclicos no altera la afinidad de la enzima por el sustrato. Se ha observado que la administración de fenobarbital altera la velocidad máxima en el metabolismo de etilmorfina, hexobarbital y clorpromazina, pero no la constante de Michaelis [30].

La inducción por glucocorticoides en rata, se lleva a cabo por medio de aumento en la síntesis de ARNm y aumento en la transcripción. La inducción del P-450 IIIA4 por dexametasona, también se lleva a cabo en humanos. Se sabe que existe un receptor glucocorticoide que regula una variedad de genes en el hígado [53].

De especial importancia en los mecanismos de inducción es la influencia que tienen los inductores sobre la biosíntesis de la hemoproteína hepática. Tanto el fenobarbital como los compuestos tipo benzopireno estimulan la síntesis del ácido δ -aminolevulínico, que es el paso inicial y limitante en la síntesis de la hemoproteína, induciendo así, al citocromo P-450 y la actividad de las monooxigenasas [30]. Tal parece que los cambios inducidos en la síntesis de la hemoproteína son el componente principal en el mecanismo de inducción.

Se ha observado que la velocidad con que ocurre la inducción no es la misma para ambos tipos de compuestos. La máxima inducción con 3-metilcolantreno ocurre a las 24 horas después de su administración, mientras que con fenobarbital se observa entre 48 y 72 horas después de dosis repetidas. Los cambios iniciales ocurren en retículo endoplásmico liso y los finales en rugoso [30,52].

Los cambios farmacocinéticos durante inducción metabólica, nuevamente están gobernados por el cociente de extracción del fármaco cuyo metabolismo se altera y por la vía de administración. La figura 5 muestra el perfil farmacocinético observado cuando la administración es oral o intravenosa para fármacos con E alto y bajo; así

mismo la tabla III resume los parámetros farmacocinéticos afectados [24].

TABLA III. Efectos observados en los parámetros farmacocinéticos por alteración de algunas variables fisiológicas de un fármaco eliminado por hígado [24].

Administración	Parámetro	Inhibición Metabólica	Inducción Metabólica	Incremento de fracción libre
Fármacos con alto cociente de extracción				
DOSIS UNICA				
Intravenosa	t ½	↔	↔	↑
	ABC	↔	↔	↔
Oral	F	↑	↓	↓
	ABC	↑	↓	↓
INFUSION INTRAVENOSA				
	C _∞ total	↔	↔	↔
	C _∞ libre	↔	↔	↔
Fármacos con bajo cociente de extracción				
DOSIS UNICA				
Intravenosa	t ½	↑	↓	↔
	ABC	↑	↓	↓
Oral	F	↔	↔	↔
	ABC	↑	↓	↓
INFUSION INTRAVENOSA				
	C _∞ total	↑	↓	↓
	C _∞ libre	↑	↓	↔

t½ = tiempo medio de eliminación. ABC = área bajo la curva de concentración plasmática contra tiempo. F = biodisponibilidad. C_∞ = concentración en estado estacionario.

↑ Incremento; ↓ decremento; ↔ sin cambio.

Dosis intravenosa Dosis oral Infusión intravenosa

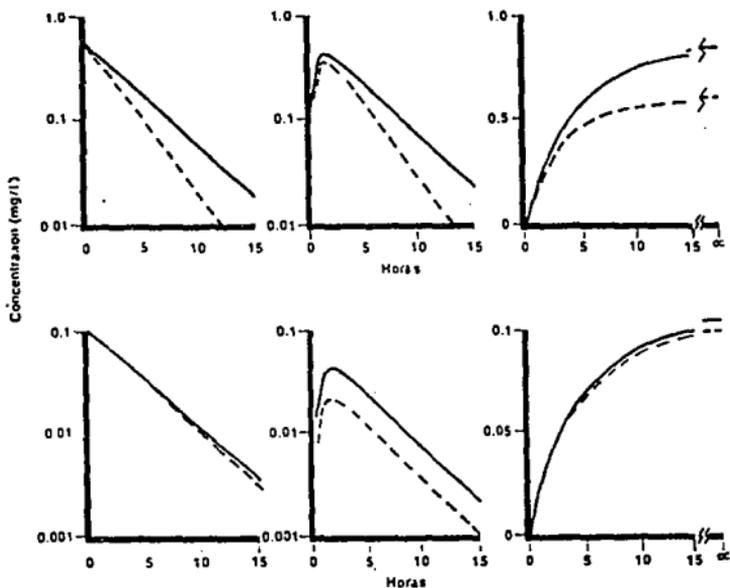


Figura 2. Efecto de la inducción enzimática sobre la cinética de un fármaco con bajo cociente de extracción (gráficas superiores) y uno con alto cociente de extracción (gráficas inferiores).

(—) Condición normal; (----) Condición alterada

Existen un gran número de sustratos endógenos que son metabolizados por las monooxigenasas hepáticas, cuyo metabolismo se puede alterar por efecto de la inducción. Por ejemplo, esteroides, glucosa, galactosa. Estas alteraciones endógenas se han utilizado como pruebas de inducción.

La estimulación del metabolismo de esteroides produce un aumento de actividad enzimática así como una alteración de las vías metabólicas. El cortisol normalmente se metaboliza a 6 β -hidroxicortisol en pequeñas cantidades, sin embargo, después de inducción con fenobarbital, difenilhidantoína, fenilbutazona y otros fármacos inductores, los niveles urinarios del metabolito aumentan considerablemente, por lo que la determinación de sus niveles urinarios es una medida de inducción.

La excreción urinaria de ácido ascórbico, producto metabólico de glucosa y galactosa, se ve aumentada bajo inducción, sin embargo, su uso como índice de inducción se encuentra limitado puesto que no todas las especies son capaces de sintetizarlo y por otro lado, se ha observado que algunos inhibidores metabólicos como SKF-525A producen el mismo efecto. El ácido glucárico, otro producto de la vía del ácido glucurónico, también ha sido utilizado como índice de inducción no sólo en animales sino también en humanos, ya que al igual que el ascórbico, sus niveles urinarios aumentan bajo inducción [30,52].

II.3.4.INTERACCIONES EN LA EXCRECION.

Las interacciones que ocurren en el proceso de excreción de los fármacos, pueden afectar alguno de los procesos de excreción renal: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular activa. La mayoría de las interacciones clínicamente importantes se deben a cambios de pH urinario, alteración de la fracción reabsorbida, o competencia por los mecanismos de secreción tubular [44].

II.4. PRAZICUANTEL

La introducción del Prazicuantel (PZQ) en el tratamiento de las helmintiasis ha sido uno de los mayores logros en salud a nivel mundial ya que numerosas parasitosis consideradas en el pasado como no tratables, en la actualidad lo son [1]. Esto es particularmente útil en los países subdesarrollados, donde estas enfermedades también causan una pérdida económica importante. La prevalencia global de las infecciones parasitarias humanas ha superado ya el 50% y continúa incrementándose. La helmintiasis afecta a más de dos mil millones de personas y su prevalencia está en aumento. La esquistosomiasis es un problema común que se ha agravado debido al incremento del área dedicada a la agricultura y la irrigación artificial ha acrecentado la multiplicación de los caracoles de agua dulce que sirven de huéspedes intermedarios para los esquistosomas que infectan al hombre. Entre los factores responsables se incluyen el hacinamiento poblacional, educación y condiciones sanitarias deficientes, control inadecuado de los vectores de parásitos y de los reservorios de la infección, introducción del control y sistemas de suministro de agua para uso agrícola, aumento de migración a nivel mundial, de operaciones militares y resistencia a los agentes empleados para el control de vectores o para la quimioterapia [54].

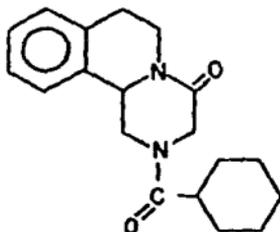
II.4.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS [55-57].

NOMBRE QUIMICO: 2-(Ciclohexilcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolein-4-ona. 4H-Pirazino[2,1-a]isoquinolein-4-ona,2-ciclohexilcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahidro.

SINONIMOS: Cesol; Cisticid; Ehliten.

FORMULA CONDENSADA: $C_{19}H_{24}N_2O_2$.

FORMULA DESARROLLADA:



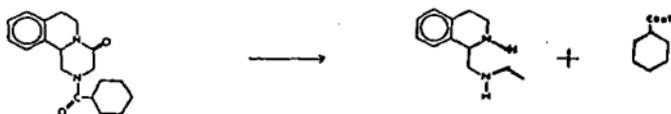
PESO MOLECULAR: 312.41

APARIENCIA FISICA: Compuesto cristalino incoloro, casi inoloro, de sabor amargo.

ESTABILIDAD: Estable bajo condiciones normales e higroscópico. Inestable a la luz.

En soluciones neutras o débilmente ácidas o alcalinas, la concentración de PZQ disminuye en una proporción menor al 2%, durante 16 hrs, a temperatura ambiente.

El PZQ puede sufrir hidrólisis en medio fuertemente alcalino formando:



En plasma, a temperatura ambiente, el PZQ se degrada en un 5% después de 16 hrs. Almacenado en plasma y orina, bajo condiciones de congelación, a -60°C durante 4 semanas, no se observa disminución en la concentración.

SOLUBILIDAD: Soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (9.7 g/100 ml de etanol; 56.7 g/100 ml de cloroformo a 25°C); soluble en dimetilsulfóxido. Practicamente insoluble en agua (0.04 g/100 ml de agua a 25°C).

PUNTO DE FUSION: $136-139^{\circ}\text{C}$.

COEFICIENTE DE PARTICION: En una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.0) y ciclohexano, se obtuvo un valor de 14:86. Para la misma solución amortiguadora y n-hexano, el valor fue de 38:62. El PZQ puede ser extraído cuantitativamente de ciclohexano utilizando ácidos fuertes como el sulfúrico (5 - 10 N) y clorhídrico 8N.

II.4.2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

El PZQ se encuentra clasificado como un antihelmíntico de amplio espectro [54].

A pesar de que en un inicio la eficacia del PZQ fue probada en el tratamiento de la esquistosomiasis, su uso clínico se ha extendido para el tratamiento de todas las especies de esquistosomas patógenas al hombre y otros tremátodos así como para una amplia variedad de céstodos, incluyendo los de Taenia solium en tejidos y órganos humanos y en el sistema nervioso central [57,58].

El PZQ por sí mismo es el agente antiparasitario activo; sus metabolitos hidroxilados y conjugados tienen poca o nula actividad [57]. Sin embargo, Xiao y cols. [59] observaron que el principal metabolito de PZQ en humanos, 4-OH-PZQ tienen efecto farmacológico similar al del PZQ sobre Schistosoma Japonicum "in vitro", pero a concentraciones 30 veces mayores, las cuales no se alcanzan con dosis terapéuticas de PZQ.

La mayor actividad antihelmíntica de su molécula asimétrica está relacionada a la estructura pirazino [2,1-a]isoquinolina, mientras que su amplio espectro parece depender de un grupo oxo en la posición 4 y un grupo acil o tioacil en la posición 2 (Figura 3). [60].

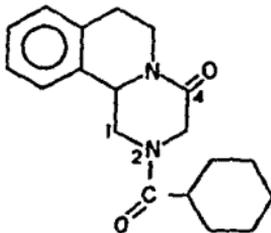


Figura 3. Estructura química del prazicuantel donde se muestran los grupos importantes para la actividad farmacológica.

La actividad antiparasitaria sólo se manifiesta en el isómero levo-(-) con configuración R. Wu y cols., [61] compararon la eficacia terapéutica de una dosis única de levo-PZQ, isómero activo, respec-

to a la mezcla racémica en pacientes infectados con S. japonicum, y observaron que una dosis de 20 mg/Kg de levo-PZQ es tan eficaz como una dosis de 40 mg/Kg de mezcla racémica de PZQ, produciendo menos efectos colaterales; ellos sugieren que el isómero puede ser usado en la terapia con la ventaja de que sólo se requiere administrar la mitad de la dosis de PZQ.

II.4.2.1. MECANISMO DE ACCION.

El PZQ ejerce 2 acciones inmediatas sobre los organismos susceptibles: a concentraciones efectivas bajas causa un aumento de la actividad muscular (tono) seguida por contracciones y parálisis espástica, produciendo el desprendimiento de los parásitos de los tejidos del huésped. A concentraciones más elevadas, aunque terapéuticas, causa vacuolización, vesiculación y degeneración del tegumento de parásitos susceptibles. Este efecto, activa los mecanismos de defensa del huésped y produce la destrucción de los helmintos. Estudios "in vitro" e "in vivo" sobre S. mansoni muestran que existe correlación entre eficacia clínica y la acción sobre los tegumentos [62]. También se ha observado reducción del glicógeno endógeno, de la alanina y aumento de la liberación de lactato, los cuales probablemente son efectos secundarios [57,60].

Hasta ahora, se desconoce el fundamento molecular de su acción. El efecto sobre la tensión muscular puede deberse a la alteración en la distribución de iones a través de las membranas musculares en el esquistosoma. Los cambios inducidos por el PZQ en el potencial de membrana, pueden jugar un papel muy importante durante la contracción, al mantener altos los niveles de Calcio (Ca^{2+}) intramuscular. Los estudios demuestran que es necesaria la presencia de Ca^{2+} para que se observe la respuesta mecánica del parásito. A pesar de que el PZQ estimula el flujo de Ca^{2+} hacia el esquistosoma, no actúa como ionóforo puesto que sustancias bloquea-oras de canales de calcio no antagonizan la respuesta [60,63].

El calcio también puede estar implicado en el segundo mayor efecto del PZQ, que es la disrupción estructural del tegumento con extensa vacuolización citoplasmática y evaginación de la membrana superfi-

cial. Este efecto contribuye a la acción antihelmíntica pero no es letal por sí mismo. El efecto se inhibe con altas concentraciones de Magnesio (Mg^{2+}) [64].

En céstodos, el mecanismo es diferente, ya que aún cuando exista depleción de Ca^{2+} o incremento de Mg^{2+} se presenta la contracción muscular [60]. En H. diminuta, la contracción se acompaña de una fuerte inhibición de la incorporación de calcio marcado. Así mismo, cuando los parásitos se cargan con Ca^{2+} marcado, el PZQ estimula la liberación del mismo. Tal parece que esta estimulación y la inducción de contracciones son independientes del Ca^{2+} exterior. Los autores sugieren que la liberación sostenida de calcio endógeno produce la concentración umbral en el mioplasma (parte contráctil del músculo) del parásito necesaria para contracción muscular. En esquistosomas, esta concentración umbral podría alcanzarse por el influjo rápido de Ca^{2+} externo. En conclusión, la contracción de H. diminuta depende de Ca^{2+} endógeno, parecido a lo que ocurre en músculo esquelético de vertebrados. En contraste a esto, la contracción muscular en esquistosomas depende del influjo de Ca^{2+} externo, como ocurre en músculo liso de vertebrados [65].

Los resultados parecen indicar que para que el PZQ ejerza su efecto, se requiere tanto de la presencia de Ca^{2+} como de los mecanismos de protección intrínsecos en el huésped, tales como efectores inmunes mediados por células, los cuales se adhieren al parásito penetrando por los sitios lesionados del tegumento [65-67]. Xiao y cols. [62,67] observaron, después de 30 minutos de la administración del PZQ, aparición de antígenos superficiales de S. japonicum en ratones infectados. Esto sugiere un posible sinergismo entre PZQ y el sistema inmune del huésped para la eliminación "in vivo" del parásito, lo cual ha sido fuertemente apoyado por otros estudios similares [68].

Sabah y cols. [69] observaron que el tratamiento con PZQ es menos efectivo en ratones infectados con S. mansoni deficientes de células T, que en ratones inmunológicamente intactos. Este y otros estudios han mostrado que el tratamiento con PZQ parece aumentar la unión de inmunoglobulinas G y M (IgG y IgM) a la superficie del

parásito.

A pesar de todos los estudios realizados, se desconoce por qué es necesaria la respuesta inmune del huésped para la eliminación del parásito.

FARMACOCINETICA.

II.4.2.2. ABSORCION.

Después de administración oral, el PZQ se absorbe rápidamente y casi por completo. En ratas, la mayor absorción ocurre desde estómago y en ratones, desde duodeno [57].

En el hombre, se absorbe aproximadamente el 80% de la dosis administrada y las concentraciones máximas se alcanzan en 1-2 hrs después de la administración oral de dosis de 14 y de 46 mg/kg de PZQ [C^{14}]. [70, 71].

En estudios en pacientes con NCC se ha observado una rápida absorción después de una dosis única de 15mg/kg de peso; las concentraciones máximas se alcanzaron entre 1.5 y 2 hrs con una vida media de absorción de 0.66 horas [72].

II.4.2.3. DISTRIBUCION.

La distribución de PZQ [C^{14}] ha sido estudiada por Steiner y Garbe [73] en diferentes especies. En rata, después de administración oral, la mayor radioactividad de PZQ se encuentra en hígado, riñón, glándulas adrenales, ovario y útero, así como en pulmón, páncreas y glándula tiroides. La mayoría de los órganos, al igual que en plasma, muestran la concentración máxima a los 30 minutos después de administración, lo cual indica que la absorción así como la distribución en todos los tejidos es rápida. La velocidad de eliminación en todos los órganos es semejante a la del plasma. Después de una administración repetida, no se encontró acumulación del fármaco en ningún órgano o tejido.

En los estudios de permeación de la placenta, se encontraron valores muy bajos en feto, 0.3% respecto a los demás órganos, después de 24 horas, lo cual indica que el fármaco atraviesa con dificultad la barrera placentaria.

Respecto al cerebro se observó que sólo llegan pequeñas cantidades, entre 1/3 y 1/8 comparadas con las de plasma. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por Andrews [74], quién estudió la penetración de PZQ a través de la barrera hemato-encefálica en rata y conejo. La concentración en LCR fue de 1/5 a 1/7 en rata y 1/10 en conejo, de la cantidad total de PZQ (unido y libre).

Se han realizado algunos estudios en pacientes con NCC, en los cuales se han determinado las concentraciones alcanzadas en LCR. Jung y cols. [75] encontraron que las concentraciones en LCR representan el 24% de las encontradas en plasma en estado estacionario; Xiaozhang [76] observó que estas representaban sólo el 11% de las de plasma después de dosis única de 40mg/Kg de peso. Spina-Franca y cols. [77] encontraron una correlación entre los niveles en LCR y en suero libre de proteínas. Overbosch y cols. [78] estudiaron la distribución de PZQ entre plasma, LCR y cisticerco y determinaron la vida media de distribución de PZQ entre estos fluidos y entre el cisticerco observando gran similitud en la concentración libre en plasma, LCR y fluido de cisticerco.

En un estudio de distribución de PZQ en leche en 10 mujeres lactantes se encontró una excreción media de 0.008% de la dosis administrada, las concentraciones en leche fueron 4 veces menores que las encontradas en plasma y siguen la misma cinética que en plasma [71].

Debido a que el PZQ se excreta en la leche materna en concentraciones que son aproximadamente 25% de las de plasma, al iniciar un tratamiento con PZQ, las madres deben abandonar la lactancia y reiniciarla hasta después de 72 horas de finalizar el tratamiento [70].

En bilis y heces se han detectado concentraciones muy pequeñas de PZQ. En pocos estudios se ha determinado el grado de unión de PZQ a proteínas plasmáticas y el valor oscila entre 70 y 90% .

En pacientes con NCC se ha observado que la cinética de PZQ se ajusta a un modelo monocompartmental [57].

II.4.2.4. METABOLISMO.

El PZQ es rápida y extensamente metabolizado en hígado. Después de una dosis oral de 300 mg/Kg en ratas, se encontraron concentraciones en vena porta de 21.2 µg/ml, mientras que en sangre periférica es de 6.2 µg/ml lo cual indica inactivación rápida por el hígado [74].

Después de administración oral en diferentes especies animales, sólo una pequeña fracción de aproximadamente 0.001 del fármaco inalterado llega a la circulación general, ya que las concentraciones séricas de radiactividad total son 100 veces más elevadas que las concentraciones séricas de PZQ inalterado. En contraste con esto, cantidades sustanciales de PZQ inalterado se encuentran presentes en suero después de administración intravenosa [73]. Estas diferencias se deben al metabolismo de primer paso, prominentemente mayor en ratas y mono rhesus y menos notable en perros beagle.

Estudios "in vitro" muestran que S. mansoni, S. japonicum y H. nana no tienen la capacidad de biotransformar PZQ [59,65].

En humanos también se observa metabolismo de primer paso, en grado similar al observado en animales. La concentración plasmática de PZQ inalterado es sólo 5% del total (unido y libre). Patzchke y cols. [79] encontraron diferencias de casi 100 veces entre las concentraciones séricas de PZQ y la radiactividad total, a dos dosis diferentes.

Leopold y cols. [80] observaron dosis-dependencia en las concentraciones séricas de PZQ administrando 4 dosis diferentes. Bittencourt y cols. [81] observaron un aumento desproporcionado en las concentraciones séricas y en LCR de 8 a 9 veces cuando la dosis de PZQ se aumentó por un factor de 4, lo que indica saturación metabólica. Los principales metabolitos detectados en el hombre son productos de hidroxilación conteniendo uno o más grupos hidroxilo [57].

Ali y cols. [82,83] identificaron y determinaron cualitativa y cuantitativamente 17 metabolitos hidroxilados de PZQ en orina de ratones control e infectados con S. mansoni por medio de espectrometría de masas, incluyendo 3 monohidroxilados, 6 dihidroxilados y 8 trihidroxilados. No hubo diferencia cualitativa entre los metabo-

litos formados por los animales control y los infectados. La cantidad excretada de PZQ inalterado y de dos metabolitos dihidroxilados fue mayor en ratones infectados mientras que la cantidad de un tercero dihidroxilado fue menor respecto a los animales control. Dos tercios de los metabolitos urinarios corresponden a monohidroxilados, lo cual contrasta con los hallazgos de Buhring [84], quien reportó que en hombre y mono la mayoría son metabolitos dihidroxilados. Esto podría indicar diferencias en el metabolismo de PZQ debidas a la especie.

Westhoff y Blaschke [85] determinaron cualitativamente la biotransformación "in vitro" de PZQ, después de incubar la forma racémica en microsomas hepáticos de diferentes especies animales, encontrando que se formó menor cantidad del enantiómero R-(-)-PZQ, el cual es principalmente metabolizado a cis- y trans-4-hidroxiprazicuantel. El enantiómero S-(+)-PZQ es metabolizado principalmente a otros metabolitos monohidroxilados. Sus resultados "in vitro" fueron corroborados en humanos, observando enantioselectividad en el metabolismo. La relación R/S varió entre 0.33 y 0.54. y el área bajo la curva para el principal metabolito humano, trans-4-hidroxi-PZQ, fue 14 veces mayor que el área del PZQ.

Se han realizado diferentes estudios con la finalidad de investigar el efecto de PZQ sobre el metabolismo hepático, así como el efecto de enfermedades hepáticas sobre el metabolismo de PZQ. Mostafa y cols. [86] estudiaron el efecto del PZQ sobre la actividad de enzimas microsomales, después de administración oral (60 mg/kg), en ratones sanos, observando que el PZQ no alteró la proteína microsomal ni la relación entre peso del hígado y peso corporal, ni la actividad de la enzima NADPH-citocromo c-reductasa pero se observó disminución en el contenido de citocromo P450, tanto "in vivo" como "in vitro". Cuando el PZQ se administró en dosis repetida durante tres días, el contenido de citocromo P450 no se alteró. En contraste, Ebeid y cols. [87] observaron, en estudios "in vitro" con hepatocitos aislados de ratas sanas, que el contenido de citocromo P450 aumenta cuando la concentración de PZQ en el hepatocito alcanza los 100 µg/ml, sin alterar la integridad de las membranas celulares ni

la viabilidad celular.

Estudios en pacientes infectados con *S. japonicum*, con alguna patología a nivel hepático, muestran que las concentraciones de PZQ inalterado en plasma son más altas que en pacientes sin daño hepático, a pesar de que la fase de eliminación no cambia [59]. En un grupo de 5 niños con esquistosomiasis urinaria, se observó que el área bajo la curva de concentración plasmática aumentó y la cantidad de PZQ inalterado se duplicó en relación a un grupo control [88]. Estos resultados confirman la importancia que tiene el estudiar el efecto de primer paso del PZQ principalmente en pacientes con enfermedades hepáticas.

En 1989 [89] se publicó la primera información sobre la cinética de disposición de los isómeros de PZQ. Después de la administración oral de 100 mg/Kg de los enantiómeros de PZQ y del PZQ como mezcla racémica, a conejos, los valores de depuración del PZQ como mezcla racémica y de los enantiómeros R-(-)-PZQ y S-(+)-PZQ fueron de 52.6 l/h, 50.3 l/h y 174 l/h, respectivamente. El ABC del S-(+)-PZQ fue aparentemente menor que el área de los otros dos compuestos. Estos resultados corroboran que existe enantioselectividad en el efecto de primer paso de PZQ y de sus enantiómeros.

Vásquez y cols. [7] observaron que la administración simultánea de PZQ con Dexametasona, corticoesteroide utilizado para prevenir las reacciones inflamatorias adversas ocasionadas por la destrucción de los parásitos, en pacientes con NCC, reduce los niveles plasmáticos de PZQ en aproximadamente 50%, tanto después de una dosis única como en dosis múltiple. Posteriormente, Bittencourt y cols. [90], observaron una disminución en los niveles plasmáticos de PZQ en pacientes epilépticos a los cuales se les administró el fármaco conjuntamente con carbamazepina o fenitoína; esta disminución representó un 90.3% con carbamazepina y un 73.91% con fenitoína. En ambos estudios, la vida media de eliminación de PZQ no se vio alterada, a pesar de la disminución de niveles. Estos resultados parecen indicar que existe interacción a nivel metabólico de tipo inductivo.

Diekmann y cols. [91] realizaron estudios en los que se observó el

efecto de cimetidina, ketoconazol y miconazol, inhibidores de citocromo P450, sobre el metabolismo de PZQ en rata, con la finalidad de incrementar la biodisponibilidad de PZQ, encontrando que en las preparaciones microsomales el metabolismo se inhibió en un 90%. "In vivo", la biodisponibilidad de PZQ aumentó por un factor de 2 y 4 con ketoconazol y miconazol respectivamente, a dosis de 25 mg/Kg. En ratas pretratadas con fenobarbital, el ketoconazol aumentó la biodisponibilidad en un factor de 2 y el miconazol en un factor de 4. La cimetidina inhibió el metabolismo a dosis de 200 mg/kg. Los autores sugieren que estos inhibidores podrían suprimir el metabolismo de PZQ en humanos y consecuentemente aumentar la biodisponibilidad y los niveles sanguíneos, a dosis terapéuticas usuales.

II.4.2.5. ELIMINACION.

Tanto el PZQ como sus metabolitos se eliminan rápidamente por vía renal, en ratas, perros, mono y humano. Más del 80% de la radiactividad de PZQ marcado administrado por vía intravenosa, es eliminado en 24 horas. La vida media de eliminación en perro es de 3 hrs. Dado que cantidades traza de fármaco inalterado son excretadas en orina, bilis, pared intestinal y heces (0.3% en ratón y 0.1% en buego), esto podría sugerir que existen metabolitos activos en las excreciones en vista de su alta efectividad contra céstodos intestinales.

En el hombre, la eliminación renal es mayor al 80% en 4 días y de este porcentaje, más del 90% se excretó en 24 horas. La vida media de eliminación en hombre es de 1.0 a 1.5 hrs, después de una dosis única y para los metabolitos de 4 a 5 horas. Prácticamente no se encontró PZQ inalterado por excreción. [57,71,79,80]. La mayoría de los metabolitos son productos hidroxilados y algunos son conjugados de los ácidos glucurónico y sulfúrico. Se han detectado pequeñas concentraciones de PZQ (menores del 10 a 20% de las de plasma) en bilis, heces y leche [1,57].

II.4.2.6. TOXICIDAD.

El PZQ es bien tolerado en humanos y parece no tener toxicidad a largo plazo. En algunos estudios se ha observado la presencia de efectos colaterales como son trastornos abdominales, particularmente dolores y náusea así como malestar, cefaleas y vértigo; estos efectos son pasajeros y están relacionados con la dosis. Ocasionalmente se produce fiebre, eosinofilia y erupciones cutáneas [54].

En pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato-hidrogenasa o con hematóglabinopatías, se han observado los síntomas usuales. No se ha reportado que exista interacción con alcohol, tabaco o algún constituyente de la dieta [92].

Los ensayos de toxicidad aguda en ratón, rata, conejo y perros beagle después de administración oral y en ratones y ratas después de administración parenteral muestran que el intervalo terapéutico es muy amplio. La Dosis letal 50 (DL₅₀) varía dependiendo de la ruta de administración entre 795 mg/kg y 16000 mg/kg. En ratones infectados con S. mansoni, se encontraron los mismos valores de DL₅₀ que en animales sanos. No se dispone de datos sobre toxicidad en el hombre [71,93].

Los ensayos para detectar efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, realizados de manera cuidadosa e intensa, han sido negativos [57,71]. Sin embargo, otros estudios han mostrado que el PZQ aumenta el índice de abortos en ratas tratadas con dosis 3 veces superiores a la dosis única en humanos (categoría B para embarazo según la FDA) [93]. En humanos no se han realizado estudios adecuados y bien controlados.

Estudios recientes utilizando núcleos aislados de hígado de hámster muestran que el PZQ es capaz de inhibir la síntesis de RNA, a pesar de que el efecto es reversible [94]. En otros estudios, utilizando células "in vitro", se observó que el PZQ aumenta la actividad mutagénica de otras sustancias como el benceno; "in vivo" se observó que aumenta y desvía la ruta metabólica del benceno, de manera que los metabolitos producidos aumentan la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de médula ósea, es decir,

el PZQ aumenta la actividad clastogénica del benceno a pesar de que el PZQ por sí mismo no es clastógeno [95].

II.4.3. PREPARADOS.

El PZQ se administra por vía oral en forma de tabletas de 150 mg, 300 mg y 600 mg [96].

II.4.4. USOS TERAPEUTICOS.

El PZQ es bien tolerado, seguro y efectivo cuando se administra en una a tres dosis al día tanto para infecciones simples como mixtas por todas las especies de esquistosomas que infectan al hombre. Con la excepción de la fasciolosis, el PZQ también resulta muy útil para infecciones por otros tremátodos y céstodos que afectan al hombre, incluyendo infecciones por Clonorchis sinensis y las cisticercosis causada por el estadio larvario de la Taenia solium [1,54,93,95].

A pesar de que el PZQ está aprobado en los EE. UU. para el tratamiento de todas las especies de esquistosomiasis humana, en otros países se emplea para infecciones por tremátodos. Aunque los esquemas de dosificación pueden variar, los más comunmente empleados se muestran en la tabla IV [1,54].

TABLA IV. Usos terapéuticos del Prazicuantel [1,54].

PARASITO	DOSIS	EFFECTIVIDAD
CESTODOS		
Intestinales:		
Taeniasis		
Taenia saginata	10-20 mg/Kg/1 dosis	99%
Taenia solium	10-20 mg/Kg/1 dosis	99%
Difilobotriasis		
Diphyllobothrium latum	10-20 mg/Kg/1 dosis	95.3%
Himenolepiasis		
Hymenolepis nana	25 mg/Kg/1 dosis	92%
Equinococosis		
Echinococcus granulosus	bajo investigación	
Neurocisticercosis		
	50 mg/Kg/día en 3 dosis 15-30 días	90%
TREMATODOS		
Tremátodos hemáticos		
Schistosoma haematobium	40 mg/Kg/1 dosis	95%
S. mansoni	20 mg/Kg/ 3 veces/día/1 día	95%
S. japonicum	20 mg/Kg/2-3 veces/día/1 día	90%
S. intercalatum	40 mg/Kg/1 dosis	89%
S. mekongi	20 mg/Kg/3 veces/día/1 dosis	
Tremátodos intestinales		
Fasciolopsis buski	25 mg/Kg/3 veces día/1 dosis	
Heterophyes heterophyes	25 mg/Kg/3 veces día/1 dosis	
Metagonimus yokogawai	25 mg/Kg/3 veces día/1 día	
Tremátodos hepáticos		
Clonorchis sinensis	25 mg/Kg/3 veces día/2 días	100%
Opisthorchis felinus	25 mg/Kg/3 veces día/1 día	100%
O. viverrini	25 mg/Kg/3 veces día/1 día	96%
Fasciola hepática	25 mg/Kg/3 veces día/2 días	
Tremátodos pulmonares		
Especies de Paragonimus	25 mg/Kg/3 veces día/1-2 días	

II.4.5. METODOS PARA LA CUANTIFICACION DE PZQ EN FLUIDOS BIOLOGICOS

Se han reportado diferentes métodos para la cuantificación de PZQ en fluidos biológicos como plasma, suero, orina, leche materna y recientemente en fracción microsomal de hígado de rata.

Considerando que estos métodos ya han sido descritos en otros trabajos [97,98], se mencionarán brevemente:

- Método fluorométrico, reportado por Putter y cols. en 1979 [99], utilizado para determinar PZQ en plasma, orina y leche materna. A pesar de ser muy sensible, 3ng/ml en plasma y 4 ng/ml en leche, presenta algunas desventajas: es muy laborioso, utiliza 5 ml de fluido biológico y consume mucho tiempo.

- Método por Cromatografía de gases desarrollado por Diekmann [100] para determinar PZQ en plasma y orina. El límite de detección es de 10 ng/ml.

- Método radiométrico desarrollado por Patzschke y cols. [79] para determinación en órganos y fluidos biológicos. Es muy sensible, sin embargo, mide radiactividad total de PZQ y requiere disponer de la molécula marcada con C^{14} .

- Métodos por CLAR:

- Xiao y cols. [101] desarrollaron un método por CLAR, relativamente sencillo y rápido para cuantificar PZQ en suero; el rango de linealidad es de 0.05 - 8 ng/ml con un límite de sensibilidad de 2.5 ng/ml y un coeficiente de variación de 2.6% a la concentración de 5ng/ml. Posteriormente el autor llevó a cabo pequeñas modificaciones en el método con la finalidad de cuantificar el principal metabolito humano de PZQ, 4-OH-PZQ [59] utilizando gradiente de elución.

- Mandour y cols. [102] reportan un método para determinar PZQ en suero o plasma con una sensibilidad de 3 ng/ml y un rango lineal de 0.3 - 2 μ g/ml. A diferencia de los otros métodos que utilizan como estándar interno un homólogo de PZQ, ellos usan diazepam.

- Westhoff y Blaschke [85] describen un método en suero para determinar simultáneamente PZQ y 4-OH-PZQ, principal metabolito de PZQ en humanos, en fase reversa así como los enantiómeros de PZQ y del

trans-4-OH-PZQ sobre una fase estacionaria quiral. El método fue aplicado para la determinación cualitativa de varios metabolitos monohidroxilados de PZQ, obtenidos después de incubar PZQ racémico en fracción microsomal de hígado de varias especies animales.

II.5. FARMACOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACION DE PRAZICUANTEL: DEXAMETASONA.

Uno de los factores envueltos en la patología de la neurocisticercosis es la respuesta inmune individual al parásito que varía desde inmuno-tolerancia hasta respuesta inflamatoria severa y edema cerebral. La reacción inflamatoria que se desarrolla alrededor del cisticerco es causada principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos y es la responsable de la destrucción del parásito que ocurre con el tiempo [103].

Durante el tratamiento de la NCC con PZQ muchos pacientes presentan cefalea, náusea, vómitos o exacerbación de crisis convulsivas. Estas manifestaciones se encuentran directamente relacionadas con la efectividad del fármaco ya que se deben a la intensa respuesta inflamatoria que desarrolla el huésped frente a la muerte de los cisticercos. Generalmente son pasajeras y pueden ser tratadas con analgésicos, antieméticos o antiepilépticos cuando las reacciones no son fuertes y con esteroides cuando éstas son muy severas [2].

Aunado a la inflamación, se ha observado edema alrededor de los cisticercos, hidrocefalea obstructiva, hipertensión intracraneal y desplazamiento por efecto de masa. Estas complicaciones causan, en muchos casos, más disturbios neurológicos que el parásito mismo [103]. Existe gran controversia sobre la administración conjunta de PZQ con esteroides, algunos autores recomiendan el uso simultáneo de dexametasona (8mg/8 h IV; 12mg/día oral) [77], otros, previo o durante el tratamiento de la enfermedad o bien, ambos y unos más, durante y después del tratamiento (4 mg/6 h oral, 2 meses previos y 4 meses después) [6,104,105]. Algunos no recomiendan su uso [106]. En el INNN se recomienda administrarlo sólo en caso de reacciones adversas severas pero no como medida preventiva, ya que muchos pacientes no las presentan o las que presentan son muy leves y pueden ser tratadas con analgésicos comunes o con antiinflamatorios no esteroideos [2,6]. En algunos casos se ha utilizado la prednisona en dosis de 30 mg/día, vía oral, durante el tratamiento y en dosis de 50 mg/día/3 meses después del tratamiento [6,78].

II.6. DEXAMETASONA.

La dexametasona es un glucocorticoide sintético con potentes efectos antiinflamatorios e inmunosupresores y variados efectos metabólicos propios de los corticoesteroides.

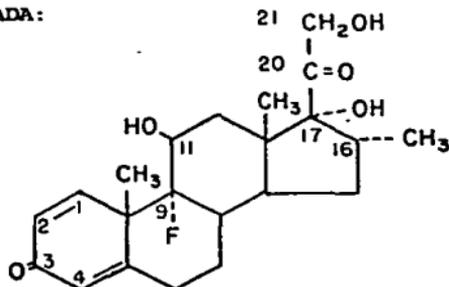
II.6.1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS [56,107].

NOMBRE QUIMICO: 9 α -fluoro-11 β ,17 α ,21-trihidroxi-16 α -metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona.

SINONIMOS: Alin, Decadrón, Decadronal, Dexal, Dibasona.

FORMULA CONDENSADA: C₂₂H₂₉FO₃

FORMULA DESARROLLADA:



PESO MOLECULAR: 392.45

APARIENCIA: polvo cristalino, color blanco a blanco amarillento, inodoro.

PROPIEDADES CRISTALINAS: Se han observado 2 formas cristalinas (A y B), las cuales tienen la misma solubilidad en agua y la misma temperatura de descomposición, pero muestran diferencias en el patrón de difracción de rayos X. La forma B es la usualmente encontrada. No hay formación de solvatos ni modificaciones polimórficas a partir de dexametasona cristalizada de acetona, cloroformo y etanol.

ESPECTRO ULTRAVIOLETA: Se han reportado en la literatura los siguientes datos:

Solvente	Maxima	E ^{1%} _{1cm} (ε)
Metanol	240 nm	355(13,920)
Metanol	238 nm	392(15,400)
Metanol	240 nm	380-410
H ₂ SO ₄ conc.	262 nm	444
H ₂ SO ₄ conc.	305 nm	308

ROTACION OPTICA: El rango obtenido a 25°C en dioxano se encuentra entre +75 y 80°.

SOLUBILIDAD: Se han reportado los siguientes datos de solubilidad:

Solvente	Temperatura	Solubilidad
Agua destilada	37°C	11.6 mg/100 ml
Agua destilada	25°C	8.4 mg/100 ml
Agua destilada	25°C	10.0 mg/100 ml
Miristato de isopropil	37°C	23.3 mg/100 ml
Aceite mineral	37°C	0.01 mg/100 ml
Etanol	--	1 en 42
Cloroformo	--	1 en 65
Acetona	--	soluble
Eter	--	ligeramente soluble
Acetato de etilo	25°C	4.1 mg/g
Piridina	--	aproximadamente 10%

PUNTO DE FUSION: Entre 250-272°C. El valor depende tanto de la velocidad de calentamiento como del grado de molido del polvo.

ESTABILIDAD: El sólido es estable al aire pero debe ser protegido de la luz. Las soluciones de DMZ pierden 50% de la cadena C-17 α-cetol en 6-8 minutos en presencia de catalizadores básicos. En preparados farmacéuticos tiene excelente estabilidad.

II.6.2. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

Los corticoesteroides (CE), como otras hormonas esteroideas, inducen la síntesis de proteínas y suprimen la secreción de ACTH. Los CE se clasifican en glucocorticoides (GCE) y mineralocorticoides (MCE) dependiendo de su potencia relativa sobre el depósito de glu-

cógeno hepático y sobre la retención de sodio (Na^+) respectivamente.

El cortisol, prototipo de los GCE, es muy potente en cuanto al depósito de glucógeno en el hígado pero débil en cuanto a la retención de Na^+ . La dexametasona es un GCE sintético de estructura similar a la prednisolona, con un grupo metilo adicional en la posición 16 y un átomo de Flúor en la posición 9. Estas modificaciones aumentan la actividad antiinflamatoria y disminuyen los efectos mineralocorticoides.

Los efectos de los corticoesteroides (CE) son numerosos y de amplio alcance. Influyen sobre el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, sobre el equilibrio de los electrolitos y agua y sobre las funciones del aparato cardiovascular, riñón, músculo esquelético, sistema nervioso y otros órganos y tejidos. Además, confieren al organismo la capacidad de resistir a diversos tipos de estímulos nocivos y modificaciones ambientales [108].

Los efectos de los CE sobre el metabolismo de carbohidratos y proteínas comprenden el disminuir la utilización periférica de la glucosa y estimular el almacenamiento como glucógeno para proteger las funciones cerebrales dependientes de la glucosa. Los GCE promueven la gluconeogénesis mediante acciones periféricas y hepáticas. En forma periférica, movilizan los aminoácidos de diversos tejidos hacia el hígado, donde inducen la síntesis de enzimas que participan en la gluconeogénesis y en el metabolismo de los aminoácidos [109]. Se han establecido dos efectos de los CE sobre el metabolismo de los lípidos. El primero es la notable redistribución de grasa que se produce en el hipercorticismismo, el otro es la facilitación del efecto de agentes adipoquinéticos para inducir la lipólisis de los triglicéridos del tejido adiposo [108].

Los CE ejercen acciones importantes sobre los diversos elementos del sistema circulatorio, incluyendo los capilares, las arteriolas y el miocardio. Los GCE tienden a incrementar la concentración de hemoglobina y el número de eritrocitos de la sangre. Debido a que retardan la eritrofagocitosis, la frecuencia de policitemia es mayor; también afectan a los leucocitos circulantes [110].

Los CE afectan el SNC en diversas formas indirectas; en particular mantienen concentraciones plasmáticas normales de glucosa, una circulación adecuada y el equilibrio normal de electrólitos en el organismo. Influyen sobre el estado de ánimo, la conducta, el electroencefalograma y la excitabilidad cerebral [111].

Una de las funciones más importantes de los GCE es su acción anti-inflamatoria. Los GCE tiene la capacidad de prevenir o suprimir el desarrollo de las manifestaciones de la inflamación. Iniben la respuesta inflamatoria cualquiera que sea el agente causal: radiante, mecánico, químico, infecciosos o inmunológico.

Inhiben la inflamación durante todo su proceso, desde la formación de edema, depósito de fibrina, dilatación capilar, migración de leucocitos hacia el área inflamada y actividad fagocitaria, las manifestaciones posteriores (proliferación de capilares y fibroblastos y depósito de colágeno), hasta la cicatrización.

Muchos de los mecanismos involucrados en la supresión de la inflamación no han sido aclarados. Se ha demostrado que los GCE inhiben la capacidad de los leucocitos y monocitos macrófagos para elaborar diversas sustancias quimiotácticas así como factores que intervienen en la mayor permeabilidad capilar, vasodilatación y contracción de diversos músculos lisos no vasculares [108,112].

Los GCE también son utilizados en el tratamiento de enfermedades que resultan de reacciones inmunes indeseables; desde aquellas resultantes de la inmunidad humoral hasta las mediadas por mecanismos de inmunidad celular, como los trasplantes de órganos. Las acciones inmunosupresoras y antiinflamatorias están íntimamente ligadas porque son el resultado de la inhibición de las funciones específicas de los leucocitos.

A pesar de ser inmunosupresores, no disminuyen la concentración de anticuerpos, no eliminan los estados de inmunidad humoral o celular sino que impiden sus manifestaciones a través de la destrucción de la comunicación intracelular entre los leucocitos, interfiriendo en la producción o función de las linfoquinas [112]

II.6.2.1. MECANISMO DE ACCION.

En muchos tejidos los CE reaccionan con las proteínas receptoras en el citoplasma de las células blanco formando un complejo receptor-esteroide. Este complejo sufre una modificación, como lo indica el aumento en su constante de sedimentación, y luego se traslada al núcleo donde se fija a la cromatina y regula la transcripción de genes específicos. La mayoría de las veces la transcripción es incrementada como lo muestra la mayor cantidad de RNA_m específico. Sin embargo, los GCE también reducen la transcripción de algunos genes, por ejemplo, el gen de la proopiomelanocortina que codifica la ACTH.

La fijación de los CE a sus receptores provoca la disociación de una proteína fosforilada de función desconocida, la cual desempeña un papel importante en la transformación del receptor, permitiendo que el complejo hormona-receptor llegue a su destino intranuclear o reaccione en forma efectiva con el DNA [108,110].

II.6.2.2. ABSORCION.

Después de administración oral, la dexametasona se absorbe casi por completo, reportándose una biodisponibilidad del 78% [113]. Los efectos más prolongados se obtienen después de administración intramuscular de suspensiones del fármaco o de sus ésteres, y las concentraciones máximas se alcanzan en 1 hora [108]. Los GCE son absorbidos en los sitios de aplicación local, como espacios sinoviales, tejido conjuntival y piel [108,110].

II.6.2.3. DISTRIBUCION.

Después de administración intravenosa de 6.6 mg, la cinética de DMZ se ajusta a un modelo de 2 compartimientos, con un volumen de distribución de 0.82 l/Kg. La unión a proteínas es de 68% ± 3% sin que se modifique durante el embarazo [113].

Se han realizado estudios de la distribución de DMZ en eritrocitos, encontrándose que la relación sangre/plasma es de 0.8.

II.6.2.4. METABOLISMO.

La reducción del doble enlace entre las posiciones 4 y 5 de los esteroides corticosuprarrenales se lleva a cabo en sitios hepáticos y extrahepáticos. La posterior reducción del grupo cetona del C 3 a hidroxilo sólo ha sido observado en hígado. La mayor parte de los metabolitos reducidos forman sulfatos o glucurónidos solubles en agua que son excretados como tales. Estas reacciones de conjugación se producen principalmente en hígado y en cierta medida en el riñón [108].

Se han realizado algunos estudios sobre el efecto de inductores enzimáticos en el metabolismo de DMZ, observándose que el pretratamiento con fenobarbital produce un incremento de 88% en la depuración plasmática hepática de DMZ. Así mismo, después de administrar difenilhidantoína, la depuración aumentó en 140% [114].

Se ha demostrado que la DMZ puede actuar como inductor enzimático a nivel de citocromo P450 en isoenzimas individuales, específicamente en la subfamilia IIIA₄, la que también es inducida por fenobarbital y triamcinolona en humanos [50].

II.6.2.5. ELIMINACION.

Después de administración intravenosa de DMZ en voluntarios, se recupera en orina el 64% de la reactividad total en 24 horas. Después de administración oral de DMZ marcada, se excreta 15% de la radiactividad total en 4 horas; aproximadamente 50% de la radiactividad excretada se encuentra en forma conjugada, probablemente glucurónidos y 50% en forma no conjugada.

Después de administrar 6.66 mg por vía intravenosa, el porcentaje excretado en orina en 24 horas, en forma inalterada, fue de 2.6% y la depuración renal fue de 6.88 ml/min [113,115].

En el ser humano la excreción fecal y biliar carece de importancia cuantitativa [115].

Considerando que el 97% de la dosis administrada de DMZ se elimina por vía hepática, se ha calculado que la depuración plasmática hepática de DMZ es de 239 ml/min. La depuración plasmática observada, después de administración intravenosa fue de 3.7 ± 0.9 ml/minuto/Kg

y el tiempo de vida media para DMZ inalterada oscila entre 2.3 y 3.4 horas [113].

En pacientes bajo monoterapia con difenilhidantoína, se ha observado que los niveles urinarios de DMZ total y conjugada aumentan considerablemente en relación a los niveles en sujetos normales. Así mismo, Köbberling [116] observó que tanto la difenilhidantoína como la carbamazepina inhiben el efecto de la dexametasona en la supresión de corticoesteroides urinarios.

II.6.2.6. TOXICIDAD.

En el uso terapéutico de los CE se han detectado dos categorías de efectos: los que resultan de la suspensión del agente y los causados por el uso continuo de dosis elevadas. La suspensión demasiado brusca de los corticoesteroides luego de una terapia prolongada, produce insuficiencia suprarrenal, presentándose un síndrome caracterizado por fiebre, mialgia, artralgia, malestar y en algunos casos puede observarse la presencia de un pseudotumor cerebral con papiledema.

La terapia prolongada puede dar como resultado la supresión de la función hipofisiaria-suprarrenal que retorna lentamente a la normalidad. Las complicaciones generales que resultan de la terapia prolongada son: alteraciones hidroeléctricas, hipertensión, hiperglicemia y glucosuria, mayor susceptibilidad a las infecciones incluyendo, tuberculosis, úlceras pépticas con sangrado o perforación, osteoporosis, miopatía, alteraciones de la conducta, cataratas subcapsulares posteriores y hábito de Cushing.

La mayor susceptibilidad a las infecciones que se observa en pacientes tratados con CE no es específica para ningún patógeno bacteriano o fúngico en particular.

Dosis elevadas de CE ocasionalmente producen miopatías.

Las alteraciones de la conducta pueden tomar diversas formas, incluyendo nerviosismo, insomnio, variación del estado de ánimo y de la conducta y psicopatías de tipo maniaco-depresivo o esquizofrénico. Las tendencias suicidas son frecuentes.

En niños se ha observado la aparición de cataratas subcapsulares posteriores.

La osteoporosis y las fracturas vertebrales por compresión son complicaciones frecuentes y graves de la terapia con corticosteroides [108,110].

II.6.3. PREPARADOS FARMACEUTICOS.

La dexametasona se puede administrar por diferentes vías en forma de diferentes sales, así como en combinación con otros fármacos como antibióticos, antisépticos, fungicidas, antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos y otros.

Las principales sales de DMZ son: 21-Acetato de DMZ; terbutilacetato de DMZ; 21-fosfato de DMZ; 21-fosfato disódico de DMZ; 21-isonicotinato de DMZ.

Las presentaciones comprenden: Tabletas orales desde 0.5 mg hasta 8 mg; grageas de capa entérica de 0.5mg; cápsulas de 0.15 y 0.5 mg; preparados tópicos en concentraciones desde 0.01% hasta 0.2%; gotas oftálmicas, nasales y óticas al 0.1%; inyectables desde 4 hasta 24 mg/ml y preparados de inhalación oral o nasal con 100 µg/ml [96].

II.6.4. USOS TERAPEUTICOS.

Con excepción de la terapia de reposición en los estados de deficiencia, el uso de los CE y sus congéneres es en gran medida empírico. Cuando los CE deben ser administrados durante periodos prolongados, debe emplearse la menor dosis que permita alcanzar el efecto deseado. Esta dosis debe establecerse en forma empírica. Cuando el objetivo de la terapia es el alivio de síntomas dolorosos o molestos no asociados con una enfermedad que presupone un riesgo mortal inmediato, por ejemplo en el caso de artritis reumatoide, la dosis inicial debe de ser pequeña y se incrementa gradualmente hasta que el dolor se haya reducido a niveles tolerables. La dosis debe de ser reducida en forma gradual con intervalos frecuentes hasta que el desarrollo de síntomas más intensos indique que se ha encontrado la dosis mínima aceptable. Cuando el riesgo de la enfermedad es mortal deberá iniciarse con dosis altas y la dosis debe reducir-

se bajo estricto control médico [108,110].

En enfermedades endocrinas los principales usos son:

-Terapia de reposición: insuficiencia suprarrenal primaria o secundaria ya sea en forma aguda o crónica.

-Hiperplasia suprarrenal congénita.

En enfermedades no endocrinas el uso es muy amplio y sólo se mencionan las patologías mas comunes, las cuales son usualmente tratadas con glucocorticoesteroides:

-Artritis y sus manifestaciones inflamatorias, carditis reumática, enfermedades renales, enfermedades del colágeno, enfermedades alérgicas, asma, enfermedades oculares, enfermedades de la piel, enfermedades del tracto gastrointestinal, edema cerebral, procesos malignos, enfermedades hepáticas.

-Otras enfermedades: sarcoidosis, trombocitopenia, anemia hemolítica con prueba de Coombs positiva, en trasplantes de órganos en el momento de la cirugía.

-Aplicaciones diagnósticas: los congeneres sintéticos del cortisol reducen la excreción urinaria de los metabolitos de este compuesto inhibiendo la liberación de ACTH por la hipófisis. La administración de DMZ (0.5 gr/6 h/2 dias) suprime la excreción de los metabolitos del cortisol en personas normales pero no suprime los esteroides urinarios en personas con el síndrome de Cushing [96,108, 110].

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE PRAZICUANTEL EN HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA.

III.1.1. MATERIAL Y EQUIPO.

- *Balanza analítica electrónica Sartorius modelo 1801 MP8.
- *Centrífuga Beckman Modelo TJ6, con refrigeración.
- *Centrífuga Beckman Modelo J21C.
- *Agitador Sybron Thermolyne tipo 16700 Maxi Mix.
- *Baño de agua con temperatura y agitación constante modelo BT25, Yamato Scientific Co., Ltd., Japan.
- *Potenciómetro Beckman modelo 41.
- *Ultrasonido Bransonic modelo PC-620R.
- *Guillotina para animales de laboratorio.
- *Homogeneizador de vidrio con pistilo de teflón, conectado a un motor Rodine, tipo NSE-11R, Greiner Sci. Corp., N.Y., EUA. Thomas Sci. Co., N.J., EUA.
- *Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Beckman (Fullerton, CA, EUA) equipado con:
 - 2 Bombas isocráticas modelo 110B.
 - Detector UV-VIS de longitud de onda variable modelo 164.
 - Controlador de flujo modelo 240.
 - Válvula de inyección con loop de 20 μ l.
 - Integrador modelo 427.
- *Espectrofotómetro UV-VIS VARIAN modelo DMS 80.

III.1.2. REACTIVOS.

- Estandar secundario de prazicuantel (PZQ) donado por Bayer de México (D.F., México).
- Estandar Interno, 2-cicloheptil análogo de prazicuantel, donado por E. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Estandar de Fenobarbital sódico.
- Hidróxido de sodio, R. A., J. T. Baker.
- Fosfato de potasio monobásico, R. A., J. T. Baker.

Fosfato de potasio dibásico, R. A., J. T. Baker.

Fosfato de sodio dibásico anhidro, R. A., J. T. Baker.

Sulfato de sodio anhidro, R. A., J. T. Baker.

Cloruro de potasio, R. A., J. T. Baker.

Acetona, R. A., J. T. Baker.

Acetato de etilo, R. A., J. T. Baker.

Eter isopropílico, R. A., J. T. Baker.

Metanol, R. A., J. T. Baker.

Acetonitrilo, grado cromatográfico, J. T. Baker.

III.1.3. PREPARACION DE LA FRACCION SOBRENADANTE 10,000 X g.

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar, con peso entre 200-250 g, a las cuales se les administró fenobarbital sódico en dosis de 50 mg/Kg de peso durante 6 días, por vía intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados por decapitación después de un ayuno de 18 horas. El hígado fue separado y lavado con solución de cloruro de potasio 1.15%, sumergido en un baño de hielo. El tejido fue pesado, triturado y homogeneizado añadiendo solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH=7.4) y tritón X-100 al 5 %, respecto al volumen por homogeneizar, para obtener un homogenado al 10%. El homogenado fue centrifugado a 10000 X g durante 20 min., a -5°C (figura 4).

III.1.4. SOLUCIONES.

- Soluciones estandar de Praziquantel en acetona: pesar 10 mg del fármaco, disolver y aforar con acetona a 10 ml. A partir de esta solución hacer las diluciones necesarias en acetona para obtener concentraciones de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 µg/ml.

- Soluciones estandar de praziquantel en homogenado de hígado de rata (10%): pesar 10 mg del fármaco, disolver con 0.5 ml de acetona y aforar con homogenado 10% (diluido 1:5 con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M). De esta solución, se hacen las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 µg/ml aforando con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (pH=7.4).

- Solución de estandar interno: pesar 1.0 mg del compuesto, disolver con acetonitrilo-agua 50:50 (v/v) y aforar a 10 ml; tomar 1 ml de esta solución y diluirlo a 10 ml con la misma fase [10 µg/ml].
- Solución acuosa de hidróxido de sodio 0.2 M.
- Solución acuosa de hidróxido de sodio 0.8 M.
- Solución acuosa de Cloruro de potasio 1.15%.
- Solución amortiguadora de fosfatos (SAP) 0.05 M, pH=5.0, preparada con fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio dibásico, ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 0.8 M.
- Solución amortiguadora de fosfatos (SAP) 0.01 M, pH=7.4, preparada con fosfato de potasio monobásico y fosfato de sodio dibásico, ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 0.8 M.

III.1.5. PREPARACION DE LA MUESTRA.

A 2 ml de homogenado se le adicionan 100 µl de estandar interno [10µg/ml] a las concentraciones de 2 y 4 µg/ml; a las concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 µg/ml, se les adicionó 50 µl de estandar interno. Se agita suavemente en vortex durante 3 seg. y se alcaliniza con 1.0 ml de solución de hidróxido de sodio 0.2 M; nuevamente se agita durante 15 s y se extrae pasando la muestra por un cartucho Sep-Pak C₁₈. El cartucho se activa con 5.0 ml de metanol, R.A. y 5.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH=5.0). Los compuestos se eluyen dos veces con 3 ml de mezcla de acetato de etilo-éter isopropílico, 30:70 (v/v). Las dos fracciones recolectadas se secan con sulfato de sodio anhidro y se evaporan a sequedad en tubos cónicos en baño de agua a 25°C bajo corriente de nitrógeno. Los residuos se disuelven en 100 µl de fase móvil y se inyectan alícuotas de 20 µl en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Después de pasar las muestras por el cartucho Sep-Pak, este es lavado con 20 ml de agua, 8 ml de metanol y 20 ml de buffer de fosfatos (pH=5.0).

En la figura 5 se presenta el diagrama del método utilizado.

III.1.6. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Columna C₁₈ Ultrasphere ODS (250 mm x 4.6 mm I.D., tamaño de partícula 5 µm) (Beckman Instruments, San Ramon, CA, EUA).

Fase móvil: acetonitrilo-agua 50:50 (v/v).

Velocidad de flujo: 1.5 ml/min.

Longitud de onda: 217 nm.

Velocidad de carta: 0.25 cm/min.

Sensibilidad del detector: 0.005 aufs.

**Ratas macho Wistar de peso
promedio entre 200-250 g**



**Fenobarbital sódico vía
intraperitoneal
D= 60 mg/kg/6 días**



**18 horas de ayuno
antes del sacrificio**



**Homogeneizar al 10% con solución
amortiguadora de fosfatos (Na⁺/K⁺)
0.01M, pH=7.4**



**Centrifugar a 10,000 x g
durante 20 min (-5°C)**



Separar el sobrenadante

**Figura 7. Esquema de preparación del
homogenado de hígado de
rata.**

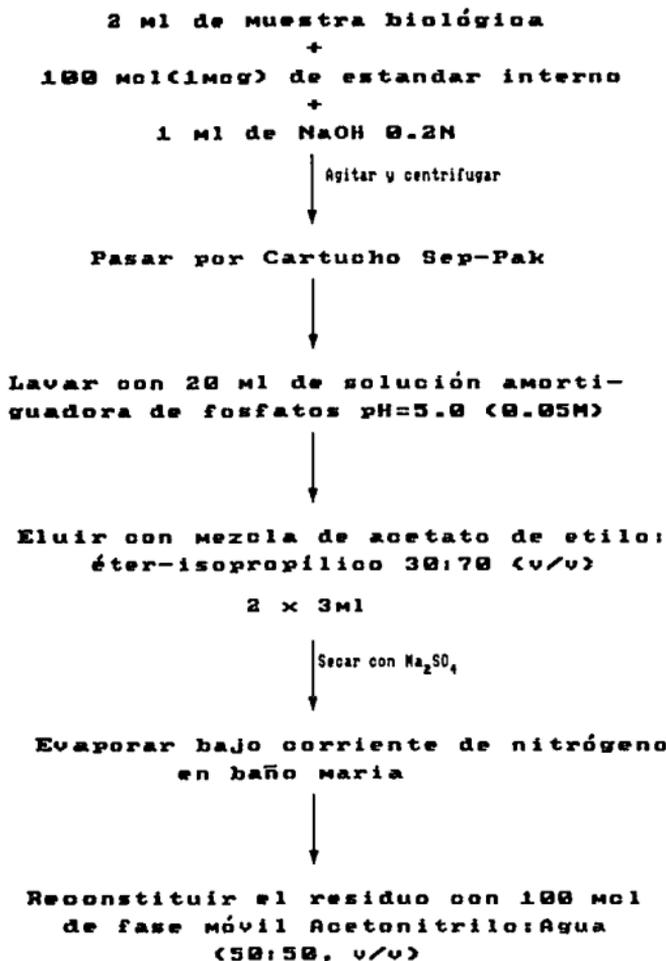


Figura 8. Esquema del método analítico para la cuantificación de PZQ en homogenado de hígado de rata.

III.1.7. LINEALIDAD.

Con la finalidad de conocer si la relación altura PZQ/altura Estándar interno era lineal, se prepararon 3 curvas en homogenado en un rango de concentración de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$ y se trabajaron siguiendo el procedimiento descrito en la figura 5. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen.

III.1.8. REPETIBILIDAD.

Se prepararon 6 curvas en homogenado, en dos días diferentes, en el rango de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$, con la finalidad de obtener los coeficientes de variación intra e inter día para cada concentración.

III.1.9. EXACTITUD.

Se prepararon 3 curvas en acetona en el rango de concentración de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$; alícuotas de 2 ml fueron evaporadas a sequedad en tubos cónicos bajo corriente de nitrógeno.

Se prepararon 3 curvas en homogenado en un rango de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$ y las muestras fueron tratadas como se indica en la figura 5. Se obtuvieron los porcentajes de extracción promedio para cada concentración así como el coeficiente de variación.

III.1.10. SELECTIVIDAD.

Con el fin de observar si compuestos endógenos interferían en la determinación de PZQ, se prepararon muestras blanco (sin fármaco), así como muestras conteniendo dexametasona.

III.1.11. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.

Se prepararon 3 curvas en homogenado en un rango de concentración de 15.62 a 125 ng/ml de acuerdo a la figura 5, con la finalidad de diferenciar la señal del ruido de fondo.

III.1.12. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Debido a que las fracciones tisulares pierden actividad enzimática, aún almacenadas en congelación a -70°C [20,36,43], y debido a las condiciones experimentales de los estudios de metabolismo "in vitro" (sección II.2.1.) no se requiere almacenamiento de muestras sembradas con el fármaco, puesto que las determinaciones deben de ser realizadas el día del experimento, incluyendo la determinación de proteínas microsomales. Por lo cual, no se evaluó la estabilidad del PZQ en homogenado.

III.2. METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO IN "VITRO" DE INTERACCION METABOLICA ENTRE PRAZICUANTEL Y DEXAMETASONA.

III.2.1. REACTIVOS.

- Estandar secundario de acetato de dexametasona donado por Bayer de México (D.F., México).
- Estandar secundario de Fenobarbital sódico.
- D-Glucosa 6-fosfato, sal monosódica (G6-P), Sigma Chemical, Co.
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, Tipo XII (obtenida del hongo *Torula*) (G-6-P-Dh), Sigma Chemical, Co.
- β -Nicotinamida adenin dinucleótido-fosfato, tipo II, sal sódica (NADP), Sigma Chemical, Co.
- β -Nicotinamida adenin dinucleótido-fosfato forma reducida, tipo I, sal tetrasódica (NADPH), Sigma Chemical, Co.
- Cloruro de Magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Sigma Chemical, Co.
- Tritón X-100, Sigma Chemical, Co.

III.2.2. SOLUCIONES.

- Solución de G-6-P: pesar exactamente 0.462 g , disolver y aforar a 10 ml con SAF 0.01 M.
- Solución de G-6-P-Dh: Disolver el contenido del vial de 100 UI en 4 ml de SAF 0.01 M para obtener una concentración de 25 UI/ml.
- Solución de NADP: pesar exactamente 0.086 g , disolver y aforar con SAF 0.01 M a 10 ml.
- Solución de NADPH: pesar exactamente 0.086 g , disolver y aforar a 10 ml con SAF 0.01 M.
- Solución de $MgCl_2 \cdot H_2O$: pesar 1.668 g del reactivo, disolver y aforar con agua a 10 ml.
- Solución estandar de Fenobarbital sódico: pesar 0.025g, disolver y aforar a 1 ml con solución isotónica (PiSA).
- Solución estandar de Prazicuantel: pesar exactamente 10 mg del fármaco, disolver en 0.5 ml de acetona y aforar a 10 ml con SAF 0.01 M. De esta solución, hacer las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 15.0, 30.0, 45.0 y 90.0, 150.0 y 300 nm/ml

diluyendo con la misma solución amortiguadora.

- Solución estandar de Dexametasona : pesar 20.0 mg, disolver con 1.0 ml de acetona y aforar a 5.0 ml con SAF 0.01 M. Realizar las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 0.022, 0.066, 0.110, 0.220 0.442 y 0.882 $\mu\text{mol/ml}$, aforando con SAF 0.01 M.

- Homogenado diluido: diluir 5 ml del sobrenadante 10,000 X g al 10% con SAF 0.01 M (pH=7.4) a 25 ml.

III.2.3 INCUBACION.

Las mezclas de incubación, así como todos los reactivos, fueron preparados en frío, sumergidos en un baño de hielo, el día del experimento y contenían :

125 $\mu\text{mol MgCl}_2$ (150 μl); 4.28 $\mu\text{mol NADPH.Na}_4$ (150 μl); 1.49 $\mu\text{mol NADP}$ (150 μl); 24.5 $\mu\text{mol Glucosa 6-fosfato}$ (150 μl); 2 UI de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (80 μl); 400 μl de sobrenadante; PZQ en el rango de 15-300 nmol/ml (todos disueltos en SAF 0.01 M pH=7.4, excepto el MgCl_2 , el cual fue disuelto en agua desionizada). El volumen final de las muestras fue de 3 ml, aforando con SAF 0.01 M. Las muestras se incubaron a 37°C en un baño de agua con agitación. Las muestras de referencia se prepararon sin la adición de cofactores y fueron analizadas de inmediato.

III.2.4 TIEMPO DE INCUBACION.

Con la finalidad de encontrar el tiempo óptimo de incubación para que se llevara a cabo la oxidación de PZQ, se efectuaron experimentos con muestras preparadas como se indica en la sección III.2.3., sin la adición de DMZ. El PZQ se adicionó a concentraciones de 15 nmol/ml y de 150 nmoles/ml y se incubaron durante 4 horas. La concentración de PZQ se determinó a diferentes tiempos, de acuerdo a la figura 5 : 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min. En cada tiempo, se analizaron muestras por triplicado.

III.2.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PZQ SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACION (V_0). EXPERIMENTO CONTROL.

Una vez determinado el tiempo de incubación necesario para efectuar la oxidación del PZQ, el cual fue de 2 horas, se llevaron a cabo experimentos con diferentes concentraciones de PZQ con la finalidad de observar el efecto de la concentración de sustrato (PZQ) sobre la velocidad inicial (V_0) de oxidación de PZQ, en ausencia de DMZ. Las concentraciones utilizadas de PZQ fueron: 15, 30, 45, 90, 150 y 300 nmoles/ml y fueron preparadas como se indica en la sección III.2.3 y analizadas de acuerdo al procedimiento de la figura 5. Cada concentración se incubó por triplicado en 2 días diferentes ($n=6$) determinándose la concentración remanente de PZQ en relación con muestras control sin incubar.

III.2.6. EFECTO DE DEXAMETAZONA SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACION DE PRAZICUANTEL.

Se prepararon muestras con diferentes concentraciones de PZQ, de acuerdo a lo especificado en la sección III.2.5, y se les adicionó Dexametazona a diferentes concentraciones en el rango de 0.022 a 0.884 μ moles/ml, como se indica en la tabla V. Las muestras fueron incubadas por triplicado en dos días diferentes ($n=6$) y analizadas de acuerdo a la fig. 8. Se determinó el porcentaje de disminución de PZQ, con cada concentración de DMZ, así como el efecto de la adición de DMZ en la velocidad de oxidación del sustrato.

TABLA V. Incubación de diferentes concentraciones de PZQ en presencia de DMZ.

PZQ [nmoles/ml]	DMZ [μmoles/ml]					
15.0	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
30.0	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
45.0	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
90.0	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
150.0	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
300.0	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884

III.2.7. CALCULOS.

Una vez obtenidos los datos, se determinó:

- Concentración de proteínas en la alícuota añadida de homogenado (sección III.3).
- Velocidad inicial de oxidación, V_o , [nmol/min/mg proteína].
- Inverso de la Velocidad inicial de oxidación, $1/V_o$, 1/[nmol/min/mg proteína].
- Inverso de la concentración de sustrato (PZQ), $1/[s]$.

Se construyeron gráficas de:

- Velocidad de oxidación del PZQ respecto al tiempo de incubación, V_o vs t (hrs).
- Velocidad de oxidación del PZQ respecto a la concentración de sustrato, V_o vs $[s]$.
- Lineweaver-Burk o gráfica doble recíproca del inverso de la velocidad de oxidación respecto al inverso de la concentración de sustrato, $1/V_o$ vs $1/[s]$.

III.3. DETERMINACION DE PROTEINAS EN HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA.

Esta determinación se efectúa el día del sacrificio de los animales de laboratorio en el homogenado ya preparado, así como el día que se lleva a cabo el experimento de incubación con el homogenado que se descongela y utiliza para esto.

III.3.1. REACTIVOS.

- Albúmina sérica bovina (libre de ácidos grasos) (ASB), Sigma Chemical, Co.
- Reactivo fenólico Folin & Ciocalteus's 2.0 N (para determinación de proteínas), Sigma Chemical, Co.
- Sulfato de cobre, R. A., J. T. Baker.
- Carbonato de sodio, R. A., J. T. Baker.
- Tartrato de sodio y potasio, R. A., J. T. Baker.
- Hidróxido de sodio, R. A., J. T. Baker.

III.3.2 SOLUCIONES.

- Solución estandar de ASB: pesar 10 mg, disolver y aforar a 10 ml con agua bidestilada. Hacer las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 50.0, 100.0, 150.0 y 200.0 µg/ml.
 - Solución de sulfato de cobre al 1%: pesar 0.250 g, disolver y aforar con agua a un volumen final de 25 ml.
 - Solución de tartrato de sodio y potasio al 2%: pesar 0.5 g, disolver y aforar a 25 ml con agua bidestilada.
 - Solución de carbonato de sodio al 10 % /NaOH 0.5 N: pesar 2.5 g del compuesto, disolver y aforar a 25 ml con solución de hidróxido de sodio 0.5 N, previamente preparada.
 - Reactivo Folin-Fenol: diluir 5ml del reactivo Folin-Fenol a 50 ml con agua destilada.
 - Reactivo de cobre: Mezclar 1 ml de sulfato de cobre al 1 % con 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio al 2 % y 20 ml de solución de carbonato de sodio al 10% / NaOH 0.5 N.
- Todos los reactivos son preparados al momento de su uso.

III.3.3 DETERMINACION COLORIMETRICA.

La determinación está basada en el método de Lowry y cols. [117] donde el complejo colorido se forma por complejación entre el reactivo alcalino cobre-fenol y los residuos triptofano y tirosina de la proteína. La formación del complejo es directamente proporcional a la concentración de proteína en el rango de 50.0 a 200.0 $\mu\text{g/ml}$. En la figura 6 se esquematiza la metodología seguida: a 1 ml de cada solución de ASB ó 1 ml de muestra de homogenado (diluido 1:200 con agua bidestilada), se le adiciona 1 ml del reactivo de cobre, se mezcla y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se adicionan 3 ml del reactivo de folin-fenol diluido, mezclando inmediatamente; los tubos se calientan durante 10 min. en baño de agua a 50°C. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y se lee la D. O. a 540 nm.

Se preparan muestras blanco utilizando 1 ml de agua bidestilada. La concentración obtenida en las muestras de homogenado, se multiplica por la dilución utilizada.

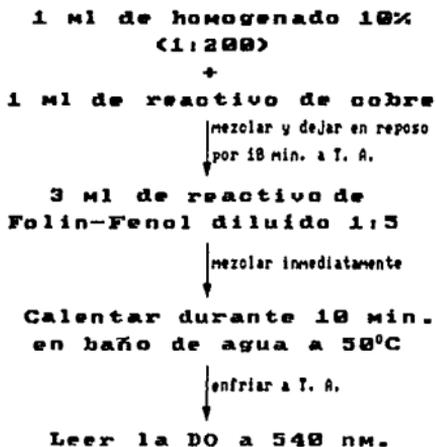


Figura 9. Esquema de la determinación colorimétrica de proteínas [125].

IV. RESULTADOS

IV.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE PZQ EN HOMOGENADOS DE HIGADO DE RATA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

A continuación se presentan los resultados obtenidos del método analítico desarrollado. Los parámetros de validación del sistema han sido reportados con anterioridad en otros trabajos de tesis [106,107].

IV.1.1. DETERMINACION DE PZQ EN HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA.

Utilizando el método descrito en la sección III.1.6. se encontró un tiempo de retención de 4.88 min para el prazicuantel y de 6.54 min para el estandar interno.

En la figura 7 se muestran los cromatogramas obtenidos al analizar muestras blanco de homogenado y muestras adicionadas de prazicuantel.

IV.2. PARAMETROS VALIDADOS.

IV.2.1. LINEALIDAD.

En la tabla VI se muestran los resultados promedio de 3 curvas en homogenado al cual se le adicionó el PZQ y el estandar interno y en la figura 8, se muestra la gráfica promedio de linealidad.

IV.2.2. REPETIBILIDAD.

Los resultados de repetibilidad se presentan en las tablas VII y VIII en las cuales se encuentran los valores promedio de porcentaje recuperado de PZQ, su desviación estandar, el coeficiente de variación para cada concentración y el coeficiente de variación promedio en la recuperación, obtenidos a partir de 3 curvas de calibración preparadas el mismo día (tabla VII), así como los resultados de 6 curvas preparadas en dos días diferentes (tabla VIII).

IV.2.3. EXACTITUD.

Para determinar la exactitud del método, se calcularon los porcentajes de extracción promedio de 3 curvas en homogenado, los coeficientes de variación para cada concentración y el promedio global recuperado, con la finalidad de determinar el intervalo de confianza ($t_{(0.95,5)}$) para este parámetro. Los resultados se presentan en la tabla IX. La representación gráfica de la concentración adicionada versus concentración recuperada de los datos promedio se presenta en la figura 9.

IV.2.4. SELECTIVIDAD

En la figura 7 se muestran los cromatogramas de homogenado blanco y homogenado añadido con PZQ en la que se observa que no existen interferencias de compuestos endógenos en la cuantificación del fármaco.

Al analizar muestras adicionadas con PZQ y DMZ no se encontró superposición de picos de ambos fármacos, como se muestra en la figura 10, donde el tiempo de retención para la señal de DMZ es de 2.37 minutos.

IV.2.5. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.

En la figura 11 se muestra el cromatograma obtenido para la concentración mínima detectable. Tomando como base que esta se obtiene cuando la relación señal/ruido es igual a 2, el valor obtenido fue de 31.2 ng/ml.

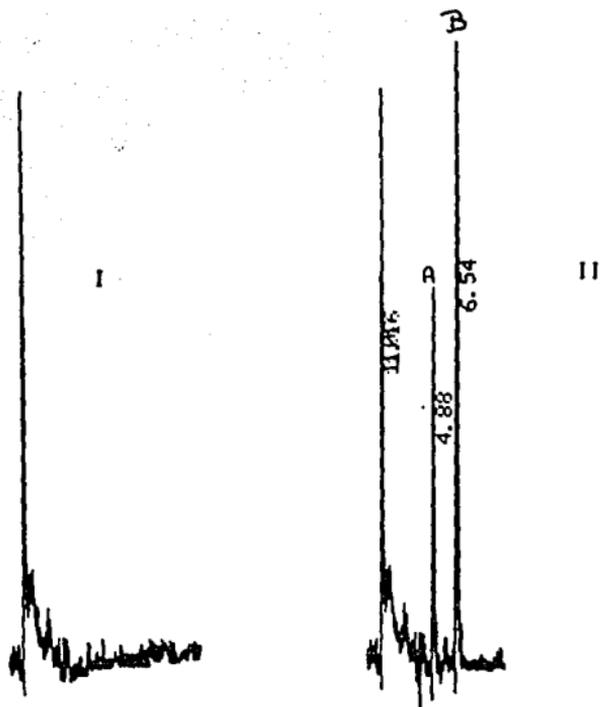


Figura 7. Cromatogramas de homogenado blanco (I) y homogenado añadido (II) con 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de Prazicuantel (A) y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de estandar interno (B).

TABLA VI. Linealidad del método analítico para cuantificar prazicuantel en homogenado de hígado de rata (n=3).

PZQ [µg/ml]	RELACION DE ALTURAS* PZQ/EI
0.125	0.6484
0.250	1.432
0.50	1.996
1.0	4.0026
2.0	8.079
4.0	15.910

* Promedio de 3 curvas

Coefficiente de correlación (r) = 0.99988

Pendiente (m) = 3.9536

Ordenada al origen (b) = 0.1069

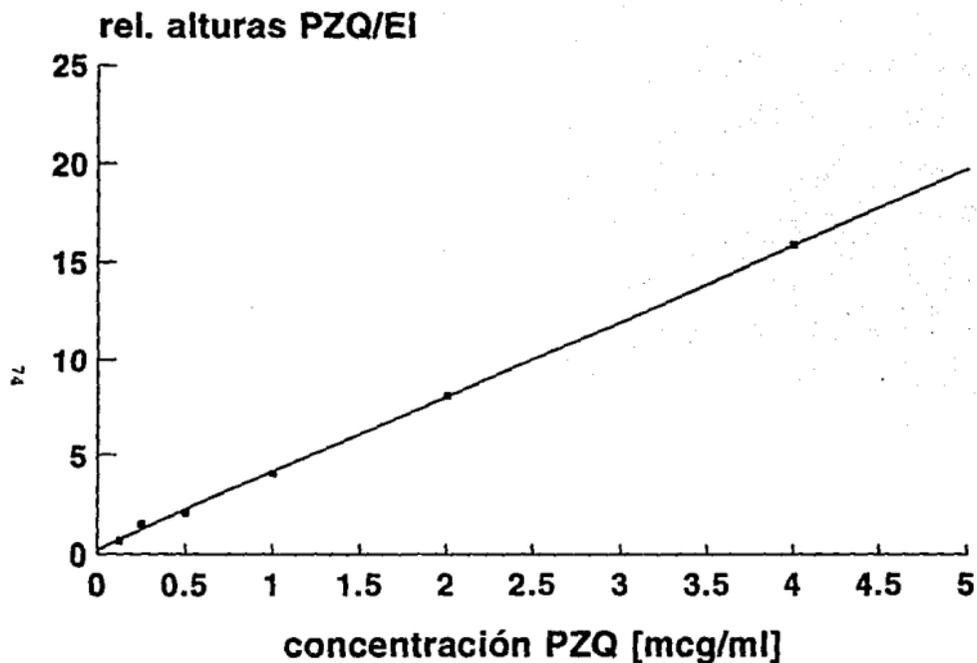


Figura 8. Linealidad del método analítico para cuantificar PZQ por CLAR.
 $r=0.999$; $m=3.953$; $b=0.1069$

TABLA VII. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de PZQ en homogenado de hígado de rata. (n=3).

CONCENTRACION ADICIONADA [µg/ml]	CONCENTRACION RECUPERADA [µg/ml]	PORCENTAJE RECUPERADO (%)	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
0.125	0.090	72.32	5.75
0.250	0.206	82.66	9.09
0.5	0.487	97.48	10.0
1.0	0.855	85.51	5.39
2.0	1.728	87.46	1.58
4.0	3.667	91.69	7.36

Coeficiente de correlación (r) = 0.9994
 Pendiente (m) = 0.9147
 Ordenada al origen (b) = 0.028
 C. V. Promedio (D.E.) = 9.9 (8.51)

TABLA VIII. Datos promedio de 6 curvas estandar de homogenado de hígado de rata adicionadas de prazicuantel y preparadas en 2 días diferentes.

CONCENTRACION ADICIONADA [µg/ml]	CONCENTRACION RECUPERADA [µg/ml]	PORCENTAJE RECUPERADO (%)	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
0.125	0.09948	79.59	12.91
0.250	0.2207	88.27	8.98
0.50	0.4808	96.16	1.93
1.0	0.8687	86.87	2.21
2.0	1.7082	85.41	1.68
4.0	3.7808	94.52	4.19

Coeficiente de correlación (r) = 0.9986
 Pendiente (m) = 0.9388
 Ordenada al origen (b) = -0.0391

Coeficiente de variación promedio (CV) = 6.90 %

TABLA IX. Valores promedio de la cantidad adicionada vs cantidad recuperada al comparar la relación de alturas de PZQ en homogenado contra PZQ en solución (n=3).

CONCENTRACION ADICIONADA [µg/ml]	CONCENTRACION RECUPERADA [µg/ml]	PORCENTAJE RECUPERADO (%)	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
0.125	0.090	72.32	5.75
0.250	0.206	82.66	9.09
0.5	0.487	97.48	10.0
1.0	0.855	85.51	5.39
2.0	1.728	87.46	1.58
4.0	3.667	91.69	7.36
Promedio		86.02	6.53

Coeficiente de correlación (r) = 0.9994
 Pendiente (m) = 0.9147
 Ordenada al origen (b) = 0.028

INTERVALO DE CONFIANZA: 77.082% < X < 94.95%

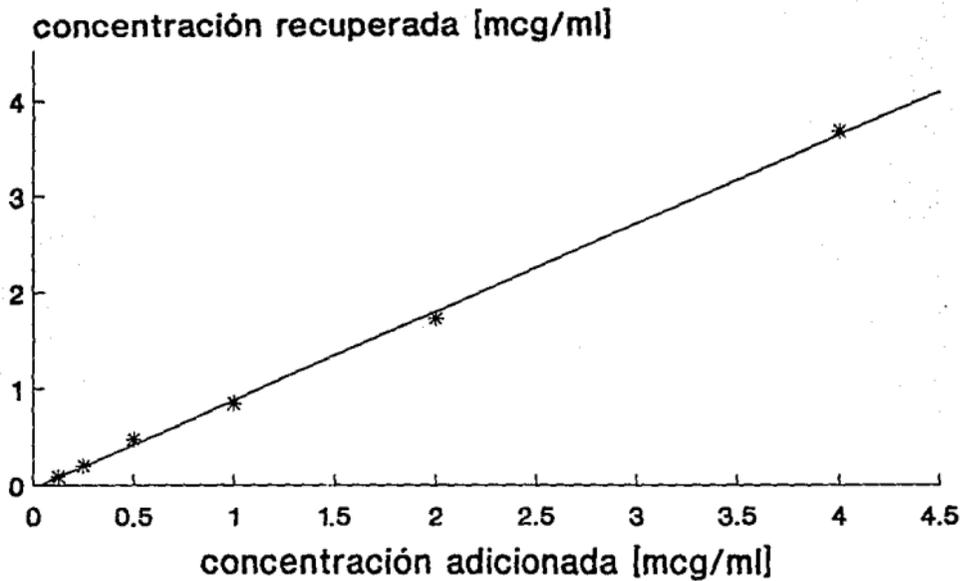


Figura 9. Exactitud del método analítico para cuantificar PZQ en homogenado.
 $r=0.9994$; $b=0.028$; $m=0.9148$

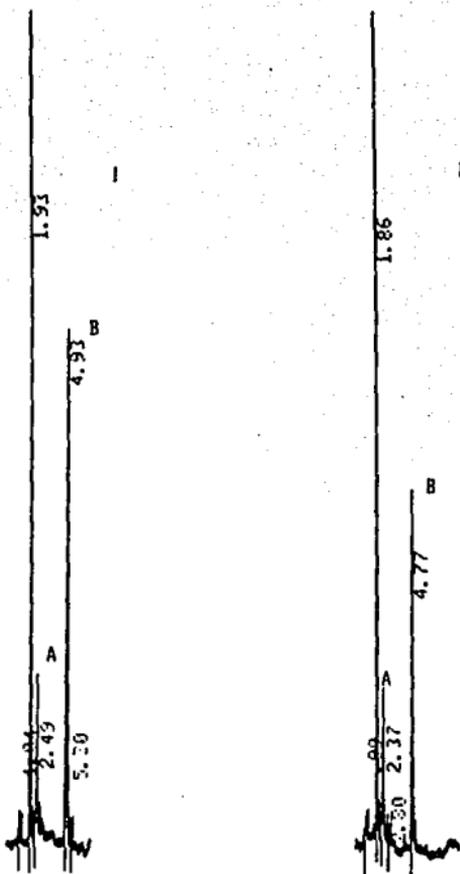


Figura 10. Cromatograma de homogenado de hígado de rata añadido con Dexametasona (A) y Prazicuantel (B). Muestra control sin incubar (I) y después de incubar por 2 horas (II).

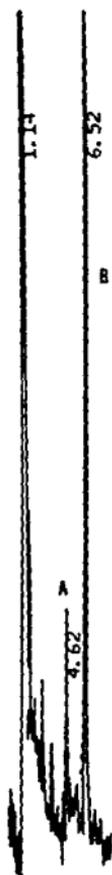


Figura 11. Cromatograma de hígado de rata añadido con 0.0312 $\mu\text{g/ml}$ Prazicuantel (A) y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de estandar interno (B).

IV.3. ESTUDIO "IN VITRO" DE INTERACCION METABOLICA ENTRE PRAZICUANTEL Y DEXAMETASONA.

IV.3.1. TIEMPO DE INCUBACION.

En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos al incubar el homogenado conteniendo PZQ a concentraciones de 45 y 150 nmoles/ml en presencia de cofactores, de acuerdo a lo descrito en la sección III.2.3, en la que se observa la concentración remanente a los diferentes tiempos de muestreo, así como la disminución de PZQ expresada en cantidad y en porcentaje. En la figura 12 se presenta la gráfica correspondiente a la cantidad de PZQ transformado respecto al tiempo de incubación. La figura 13 muestra la linealización de estos datos, tomando en cuenta únicamente los datos correspondientes hasta el tiempo donde se observó el máximo cambio, obteniéndose coeficientes de correlación de 0.808 y 0.975 para las concentraciones de 45 y 150 nmol/ml respectivamente.

IV.3.2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PRAZICUANTEL SOBRE SU VELOCIDAD DE OXIDACION. EXPERIMENTO CONTROL.

En la tabla XI se muestran los resultados correspondientes al estudio de oxidación de PZQ en ausencia de DMZ (experimento control). La tabla muestra la velocidad de oxidación (V_o) así como el valor correspondiente del inverso de la velocidad, $1/V_o$.

La figura 14 presenta una gráfica tipo Michaelis-Menten en la que se relaciona la velocidad de oxidación contra diferentes concentraciones de sustrato (PZQ). Al linealizar los datos cinético-enzimáticos utilizando la transformación doble-recíproca, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9664. De acuerdo a la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten [118], el valor en el intercepto con el eje de la abscisa corresponde al inverso de la Velocidad máxima, ($1/V_m$) y la pendiente de la recta corresponde a la relación entre la constante de Michaelis y la velocidad máxima, ($m=K_m/V_m$), valor que también puede obtenerse a partir del intercepto con el eje de las ordenadas cuando el valor de $y=0$. Los valores de pendiente e intercepto obtenidos a partir de la figura 15, se resumen en

la tabla XII.

IV.3.3 EFECTO DE DEXAMETASONA SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACION DE PRAZICUANTEL.

En la tabla XIII se muestran los resultados obtenidos al incubar prazicuantel en presencia de dexametasona siguiendo el procedimiento descrito en la sección III.2.6. La figura 16 muestra el efecto de la adición de diferentes concentraciones de DMZ sobre la velocidad de oxidación de PZQ, en el rango de concentración de 15 a 300 nmoles/ml. Se aplicó el método de doble recíproca con la finalidad de linealizar estos resultados y la gráfica correspondiente se muestra en la figura 17. Los valores del inverso de la velocidad se muestran en la tabla XIV y los parámetros cinético-enzimáticos se resumen en la tabla XV.

Tabla X. TIEMPO DE INCUBACION. Concentración remanente y porcentaje disminuido de PZQ a los diferentes intervalos de tiempo.

Concentración inicial=150 nmol/ml

Tiempo (hrs)	Concentración remanente (nmol/ml)	Disminución de PZQ (nmol)	Disminución (%)
0.25	134.48	31.04	10.34
0.50	131.82	36.36	12.12
0.75	128.2	43.6	14.53
1.0	123.95	52.1	17.36
1.5	121.59	56.82	18.94
2.0	122.81	54.38	18.12
2.5	122.72	54.56	18.18
3.0	122.4	55.2	18.4
3.5	122.42	55.16	18.38

Concentración inicial=45 nmol/ml

Tiempo (hrs)	Concentración remanente (nmol/ml)	Disminución de PZQ (nmol)	Disminución (%)
0.25	32.85	24.3	27.02
0.50	30.84	28.32	31.47
0.75	29.53	30.94	34.39
1.5	29.37	31.26	34.74
2.0	29.52	30.96	34.40
2.5	30.12	29.76	33.06
3.0	29.6	30.8	34.22
0.5	29.15	31.7	35.23

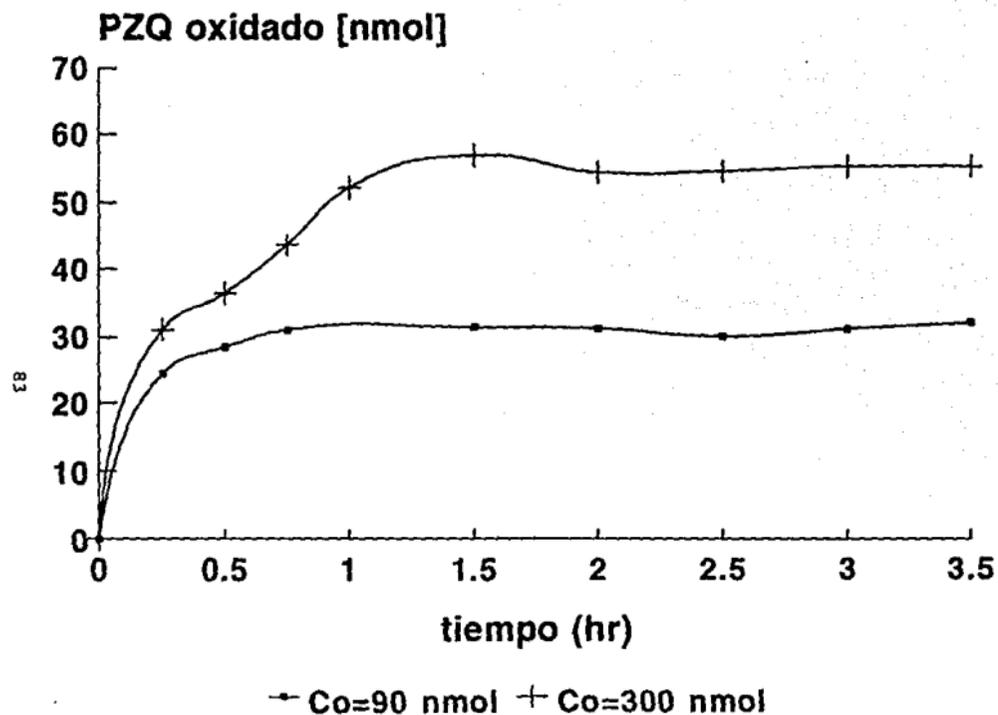


Figura 12. Oxidación de PZQ en función del tiempo de incubación.

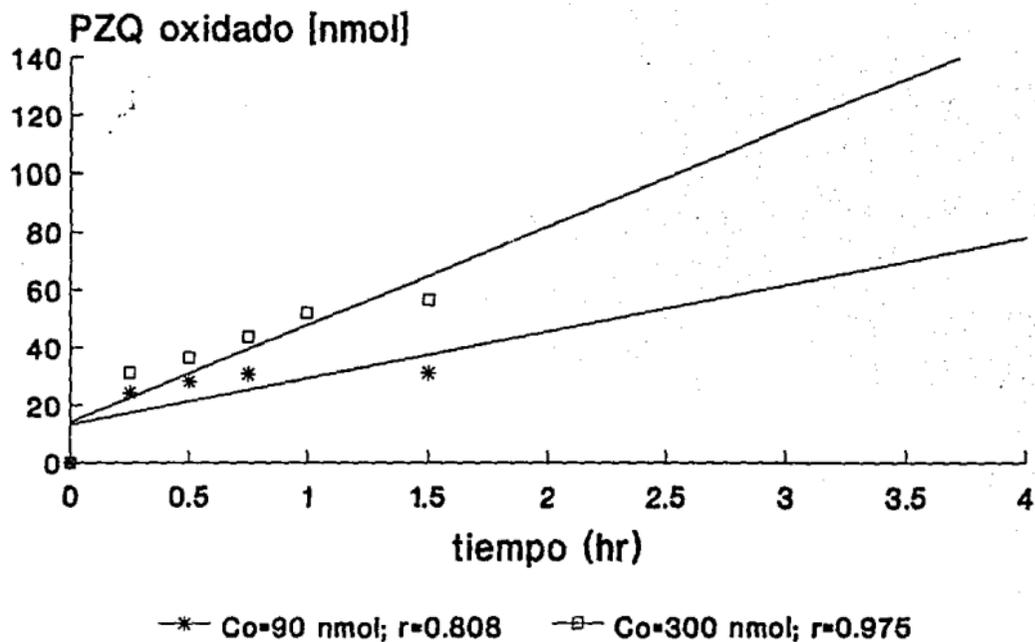


Figura 13. Actividad enzimática en función del tiempo óptimo de incubación.

TABLA XI. VELOCIDAD DE OXIDACION DE PZQ A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO. CONTROL.

Concentración de PZQ [nmol/ml]	Vo (x 1000)	1/Vo
15	1.73	578.03
30	5.84	171.04
45	11.06	90.37
90	22.64	44.16
150	23.83	41.95
300	24.8	40.10

$V_o = (\text{mol/ml} \times \text{mg proteína}) \times (1000)$.

$1/V_o = 1/(\text{nmol/ml} \times \text{mg proteína})$.

TABLA XII. PARAMETROS OBTENIDOS DEL EXPERIMENTO CONTROL EN LA GRAFICA DE DOBLE RECIPROCA.

PARAMETRO	
coeficiente de correlación (r)	0.9664
pendiente (m)	8579.21
intercepto (b) en las abscisas	-44.082
$V_{\text{max}} = 1/b$	-2.2682
$K_m = V_m \times m$	-194.59
Intercepto en la ordenada cuando $y=0$	0.00513
$1/x = -K_m$	-194.597

$V_{\text{max}} = \text{nmol/min} \times \text{mg proteína}$

$K_m = \text{nmol/ml}$

$1/V_o = (K_m/V_m)(1/s) + (1/V_m)$

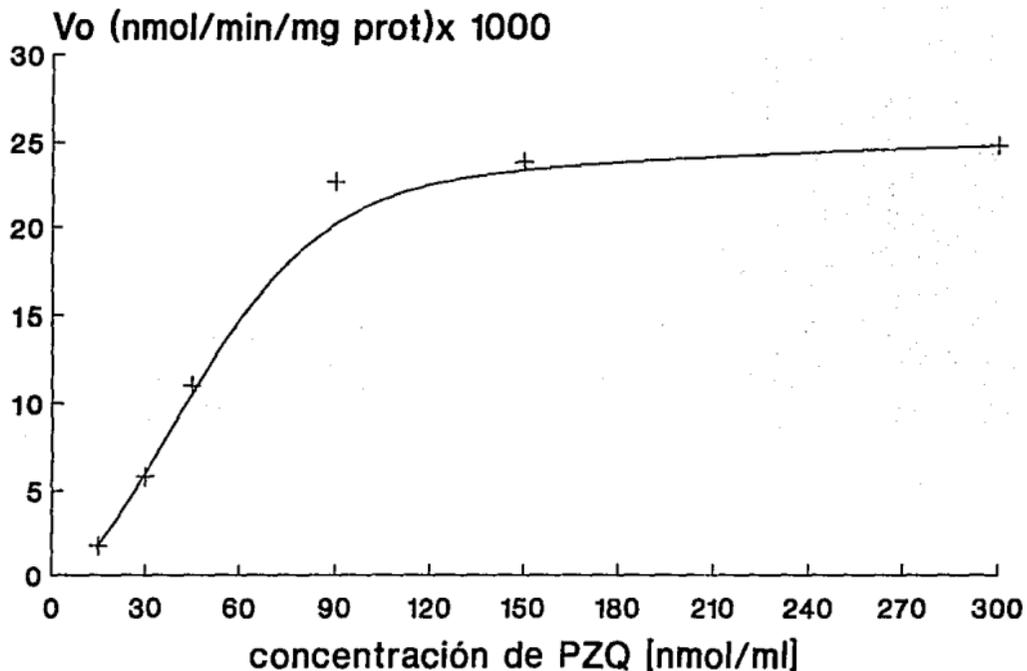


Figura 14. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de oxidación.

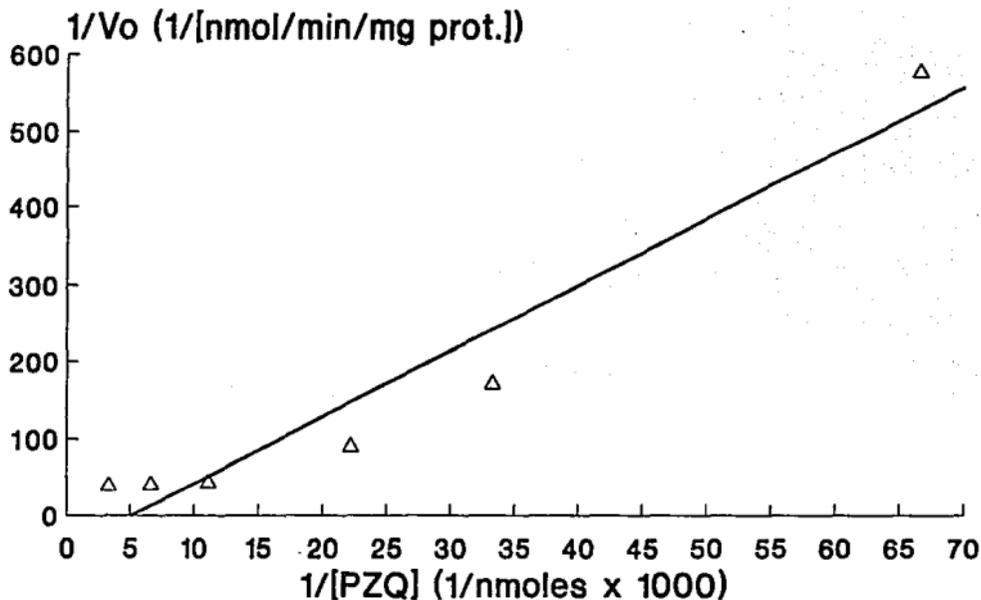


Figura 15. Gráfica doble-recíproca del efecto de la concentración de PZQ sobre la velocidad de oxidación (control).

TABLA XIII. EFECTO DE LA ADICION DE DEXAMETASONA EN LA VELOCIDAD DE OXIDACION DE PRAZICUANTEL.

VELOCIDAD INICIAL DE OXIDACION DE PZQ

PZQ [nmol/ml]	CONCENTRACION DE DMZ [μ mol/ml]					
	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
15	3.030	3.679	3.777	3.452	4.090	4.036
30	5.270	6.645	4.512	5.984	6.277	5.692
45	9.833	13.159	9.621	7.020	6.996	8.327
90	17.070	15.662	21.619	12.599	13.198	15.496
150	29.080	18.321	19.047	28.008	21.536	21.753
300	69.805	53.025	52.272	39.610	50.974	31.493

$V_o = \text{nmol/min} \times \text{mg proteina} \times (1000)$.

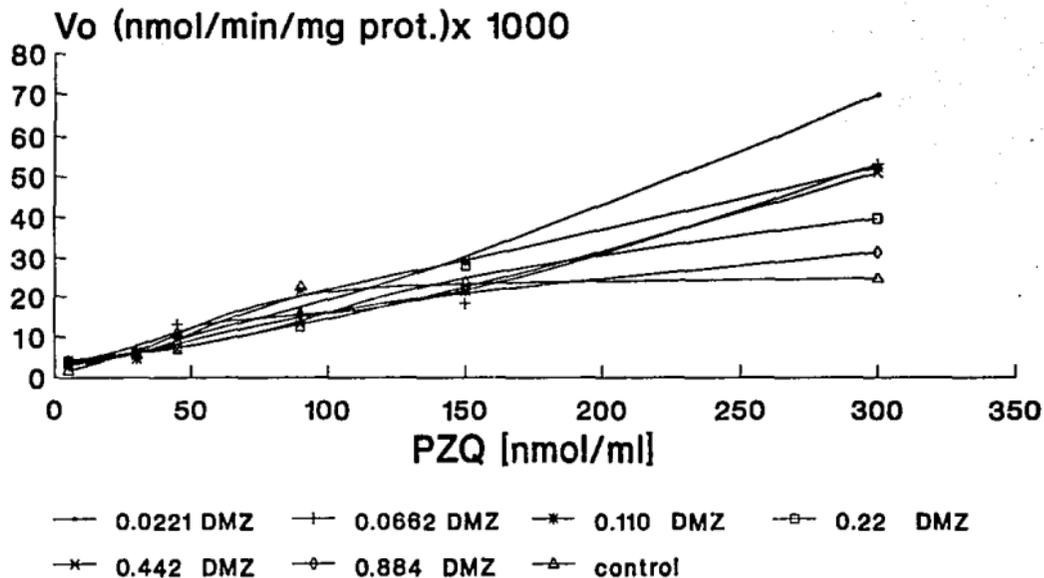


Figura 16. Efecto de la adición de Dexametasona sobre la velocidad de oxidación de Praziquantel.

TABLA XIV. EFECTO DE LA ADICION DE DEXAMETASONA EN LA VELOCIDAD DE OXIDACION DE PRAZICUANTEL. (Inverso de la velocidad).

1/ VELOCIDAD INICIAL DE OXIDACION DE PZQ						
1/[PZQ]	CONCENTRACION DE DMZ [$\mu\text{mol/ml}$]					
[1/nmol/ml]	0.022	0.066	0.110	0.220	0.442	0.884
0.0033	14.326	18.860	19.131	25.247	19.61	31.75
0.0066	34.389	54.583	52.501	35.705	46.434	45.972
0.011	58.584	63.851	46.258	79.375	75.772	64.535
0.022	101.700	75.993	103.942	142.445	142.930	120.084
0.033	189.742	150.496	221.593	167.096	159.318	175.674
0.066	330.016	271.778	264.769	289.669	244.456	247.733
*1/Vo= 1/(nmol/min x mg protefina)						
r ² =	0.991	0.977	0.890	0.973	0.934	0.961
r =	0.995	0.988	0.943	0.986	0.966	0.980
m(x10 ⁻²)	50.29	38.43	40.49	41.30	34.06	34.90
b	1.309	14.12	21.28	24.57	33.38	30.91

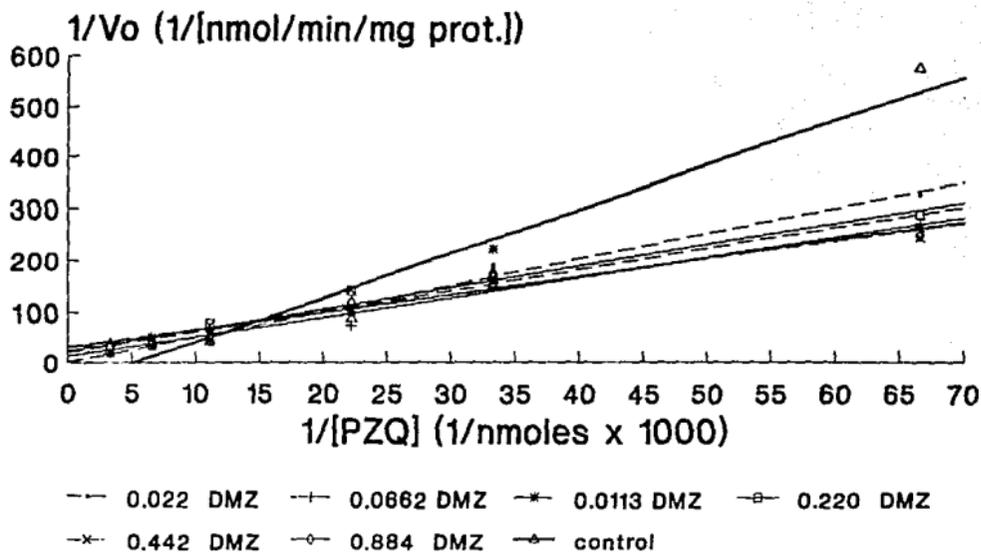


Figura17. Gráfica doble-recíproca del efecto de DMZ sobre la velocidad inicial de oxidación de PZQ.

TABLA XV. Parámetros cinéticos obtenidos de la gráfica doble recíproca de oxidación de PZQ en presencia de DMZ.

DMZ [$\mu\text{mol/ml}$]	K_m [mM]	V_m [nmol/min]
0.022	3.8422	0.76394
0.066	0.2721	0.07081
0.110	0.1902	0.04698
0.220	0.1680	0.04068
0.442	0.1020	0.02995
0.884	0.1128	0.03234

V. ANALISIS DE RESULTADOS

V.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR PZQ EN HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA.

A pesar de que existen en la literatura diferentes métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de PZQ en plasma y orina [85,101,102] estos no pudieron ser utilizados ya que los componentes endógenos del hígado de rata interferían en el análisis, y considerando que para llevar a cabo los estudios de metabolismo y de interacción metabólica de PZQ "in vitro" era necesario utilizar tejidos así como determinar el fármaco sin las interferencias propias del tejido utilizado, primeramente se desarrolló un método analítico que permite cuantificar PZQ en homogenado de hígado de rata.

De los resultados obtenidos se encontró que:

V.1.1. LINEALIDAD.

Al graficar relación de alturas PZQ/Estandar Interno respecto a la concentración de PZQ (fig. 8) se observó una relación lineal entre ambas variables en el rango de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$, con un coeficiente de correlación de 0.99988. El valor de la ordenada al origen fue cercano al cero. Para verificar que no existía diferencia, desde el punto de vista estadístico, entre el valor teórico y el esperado, se realizó una prueba de "t student" cuyos resultados se muestran en la tabla XVI, en la que se observa que el valor calculado es menor al teórico ($p > 0.05$) y que el intervalo de confianza incluye el valor de cero, por lo que se considera que no existe diferencia estadística entre interceptos.

V.1.2 REPETIBILIDAD.

Los resultados de repetibilidad del método (tabla VII), muestran que el coeficiente de variación (CV) máximo encontrado en el mismo día de análisis es de 10% para la concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. El CV

máximo al promediar los resultados de dos días es de 12% para la concentración de 0.125 µg/ml (tabla VIII). Considerando que se está trabajando con un tejido biológico rico en compuestos endógenos, los coeficientes de variación se consideran aceptables dentro de las guías de validación de métodos analíticos para estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética, las cuales especifican valores de coeficiente de variación no mayores de 15% [119]. Para verificar la repetibilidad en días diferentes, se efectuó un análisis de varianza de dos vías de efectos aleatorios con interacción, comparando los resultados de repetibilidad en dos días diferentes, los resultados se muestran en la tabla XVII. No se encontraron diferencias significativas entre días así como tampoco entre curvas ($p > 0.05$) por lo que se considera que el método es repetible tanto el mismo día como en diferentes días cuando lo realiza el mismo analista. Sin embargo, es conveniente realizar una curva estandar el día del análisis, ya que en cada preparación de muestras es necesario medir cantidad de proteínas.

V.1.3. EXACTITUD.

La recuperación promedio en homogenado fue de 86.02% con un coeficiente de variación de 6.53%. Al graficar la concentración adicionada respecto a la concentración recuperada, el coeficiente de correlación fue alto, 0.999, con un valor de pendiente igual a 0.9147, cercano al valor ideal de 1.0. Se aplicó una prueba de "t student" para determinar estadísticamente la igualdad de interceptos y de pendientes, y se encontró que no existe diferencia entre interceptos ($p > 0.05$); así mismo, al comparar las pendientes, se encontró diferencia significativa respecto al valor de cero, resultado que corrobora la existencia de correlación entre las variables graficadas. Se construyeron los intervalos de confianza correspondientes a cada parámetro (tabla XVIII) y los resultados se encontraron dentro del intervalo con una probabilidad de 0.05.

V.1.4. SELECTIVIDAD.

Al comparar los cromatogramas de homogenado blanco y homogenado añadido con PZQ, no se observó interferencia de los compuestos endógenos (Fig. 7). Así mismo, en el análisis de muestras adicionadas con PZQ y DMZ, tampoco se encontró interferencia o superposición de picos de ambos fármacos. En la figura 10 se muestra el cromatograma en donde se observa la señal de la DMZ a los 2.84 min.

Considerando que el PZQ se metaboliza en un 99% a productos hidroxilados [82-84], cabe la posibilidad de que con pequeños cambios en las condiciones cromatográficas sea posible detectar algún metabolito.

En 1992, Blaschke y cols. [85] reportaron un método por CLAR en fase reversa que permite la cuantificación simultánea en suero de PZQ y trans-4-Hidroxiprazicuantel (principal metabolito monohidroxilado en humanos), después de administrar PZQ por vía oral. Para la separación de los compuestos se utiliza gradiente en la elución, iniciando con una mezcla de acetonitrilo-agua 20:80 y después de 13 minutos la composición de la fase cambia a 29:71. Los tiempos de retención fueron de 6.4 y 20.1 min para el metabolito y el PZQ respectivamente.

Con el método desarrollado en el presente trabajo no es posible detectar los metabolitos más polares de PZQ, ya que estos eluyen antes y quizá se pierden en el frente del solvente, sin embargo podría ser posible detectar algún(os) metabolito(s) efectuando algunos cambios en las condiciones cromatográficas, con las ventajas de que la extracción del fármaco en fase sólida es rápida, la separación isocrática es más precisa que la de gradiente y los tiempos de corrida son menores (no es necesario reequilibrar la columna).

V.1.5. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.

Considerando que el criterio para esta determinación es obtener una señal de 2 veces el ruido de fondo, se encontró que la mínima concentración detectable es de 31.2 ng/ml. Esta concentración está muy por debajo de las utilizadas en los estudios de metabolismo, ya que

es necesario observar la saturación del sistema enzimático. El método analítico también fue validado en plasma y orina, demostrando ser lineal, exacto y preciso [120].

TABLA XVI. Análisis estadístico por "t student", de diferencia de interceptos para la linealidad del método por HPLC para la cuantificación de PZQ en homogenado de hígado de rata.

Coefficiente de correlación	= 0.99988
pendiente (m)	= 3.9536
intercepto (b)	= 0.106
t calculada/intercepto	= 2.603
intervalo de confianza para intercepto	= -0.00719 < b < 0.219

TABLA XVII. Análisis de varianza de dos vías, de efectos aleatorios con interacción para la repetibilidad del método en días diferentes

PUENTE DE VARIACION	gl	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F CALCULADA	F tablas 0.05
Curvas	2	19.838	9.919	0.265	19.0
Días	1	641.1024	641.102	17.136	18.51
Curva/Día	2	74.8213	37.4106	0.471	3.32
Error	30	2382.6674	79.422		
Total	35	3118.429			

TABLA XVIII. Análisis estadístico para diferencia de interceptos y diferencia de pendientes por "t student" para la exactitud del método por HPLC para la cuantificación de PZQ en homogenado de hígado de rata.

Coefficiente de correlación	= 0.9994
pendiente (m)	= 0.9147
intercepto (b)	= 0.028
t calculada/intercepto	= 0.9358
intervalo de confianza para intercepto	= -0.05178 < b < 0.111178
t calculada/pendiente	= 57.596
intervalo de confianza para pendiente	= 0.8705 < m < 0.9588

V.2. INTERACCION METABOLICA ENTRE PRAZICUANTEL Y DEXAMETASONA "IN VITRO".

En México, el PZQ se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la neurocisticercosis cerebral. En la clínica usualmente se acompaña de la administración de antiinflamatorios como la dexametasona, antes y/o durante dicho tratamiento debido a la reacción inflamatoria que se presenta tanto por la presencia de los cisticercos como por su destrucción [2]. En un estudio previo [7] se observó una disminución de aproximadamente 50% en los niveles plasmáticos de PZQ al ser administrado simultáneamente con DMZ, tanto después de una dosis única de PZQ como en dosis múltiple, sin embargo, no se observaron cambios en los parámetros farmacocinéticos de absorción ni de velocidad de eliminación.

Estas observaciones condujeron a la hipótesis de una posible interacción entre ambos fármacos, donde la DMZ podría estar induciendo el metabolismo de PZQ, el cual se lleva a cabo en el sistema microsomal hepático mediante el citocromo P450, por lo que se decidió implementar una técnica "in vitro" que permitiera efectuar estudios que apoyaran los resultados.

Existen diferentes preparaciones y fracciones enzimáticas utilizadas en los estudios de metabolismo. Las fracciones más usadas son: los homogenados de tejido, la fracción microsomal y los hepatocitos [121].

Los homogenados de tejidos representan la fracción enzimática más utilizada en la búsqueda inicial de datos metabólicos tanto por su facilidad de preparación como porque permite obtener información global acerca del proceso en estudio, por ello se eligió esta fracción para realizar el estudio.

Considerando la importancia que tienen las condiciones para obtener resultados confiables, fue necesario determinar el tiempo de incubación óptimo para efectuar los estudios de metabolismo de PZQ y de interacción con DMZ. De los resultados obtenidos se encontró:

V.2.1. TIEMPO DE INCUBACION.

De acuerdo a los resultados de la tabla X, después de 2 horas, el

cambio en la concentración remanente de PZQ ya no es significativo, por lo cual se seleccionó este tiempo como el adecuado para efectuar los estudios metabólicos de interacción. En la figura 12 se observa claramente como la velocidad, expresada como cantidad de PZQ oxidado, al utilizar dos cantidades iniciales diferentes, decae con el tiempo, lo cual puede deberse a: a) los productos de la reacción pueden inhibir la enzima, b) conforme procede la reacción, la concentración de sustrato baja, c) en determinado tiempo la reacción inversa puede ser más importante conforme aumenta la concentración de productos y d) la actividad de la enzima (o coenzima) puede disminuir por inestabilidad conforme procede la reacción, o bien, varios de estos factores pueden operar al mismo tiempo [118].

Con la finalidad de corroborar si durante el tiempo de incubación elegido se mantenía lineal la actividad enzimática, se linealizaron los datos de la figura 12 tomando como máximo 2 horas y se obtuvieron altos coeficientes de correlación; al utilizar 90 nmol de PZQ se obtuvo un $r=0.808$ y para 300 nmol, $r=0.975$ (figura 13). Estos resultados validan la elección del tiempo de incubación como adecuado para efectuar los estudios de oxidación de PZQ "in vitro".

V.2.2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PRAZICUANTEL SOBRE SU VELOCIDAD DE OXIDACION.

En la figura 14 se observa claramente que la oxidación de PZQ obedece la ecuación de Michaelis-Menten [118], es decir, el comportamiento asintótico de la curva es característico de un proceso cinético-enzimático específico tipo Michaelis-Menten, sin embargo al linealizar los datos por medio de la representación doble recíproca, se obtuvieron valores negativos tanto para $V_{m\acute{a}x}$ como para K_m (tabla XII). Debido a esto, se aplicaron diferentes transformaciones a la ecuación de Michaelis-Menten y se observaron desviaciones de la linealidad, por lo que los parámetros cinético-enzimáticos se obtuvieron gráficamente de la figura 14. El valor de $V_{m\acute{a}x}$ fue de 24×10^{-3} nmol/min y el valor aproximado de K_m fue de 0.047 mM.

La determinación del tipo de proceso que se lleva a cabo a partir

de las gráficas comunes no es fácil. Se han observado desviaciones de la linealidad [52,118] que pueden ser debidas a varias causas: que el proceso sea de tipo parcial y/o mixto, que el sistema enzimático posea isoenzimas y que la unión del sustrato a la enzima muestre efecto cooperativo. El análisis matemático de los procesos parciales es de mayor complejidad que el de los procesos más comunes, como son los competitivos y no competitivos totales y no es sencillo reconocer gráficamente este tipo de procesos cinéticos. En el caso de la presencia de isoenzimas, las desviaciones de la linealidad se deben a sitios de unión independientes con diferentes afinidades por el sustrato o a la unión cooperativa de más de una molécula de sustrato, lo que ha sido demostrado en un gran número de sistemas enzimáticos [118]. Además de esto, la afinidad de la unión puede cambiar conforme cambia la concentración del sustrato. A pesar de que ha surgido un gran interés en el estudio del metabolismo de PZQ, como lo demuestran algunos reportes [82-85,122], estos estudios se han dirigido hacia la identificación de metabolitos y/o cuantificación de algunos de ellos, más que al tipo de proceso cinético que se está efectuando.

Los datos obtenidos en el presente trabajo, así como su análisis por los métodos comunes, sugieren que para obtener resultados más exactos de K_m y $V_{máx}$ del PZQ, sería necesario utilizar concentraciones por arriba y por debajo del rango aquí utilizado.

V.2.3. EFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LA VELOCIDAD DE OXIDACION DE PRAZICUANTEL.

Se sabe que ciertos glucocorticoides, como la dexametasona, inducen ciertos genes que también son inducidos por el fenobarbital, como el PCN1 de la sub-familia IIIA del citocromo P450 en rata. Esta inducción es el resultado de una activación en la transcripción genética del gene PCN1, así como de un aumento de RNAm [53]. Recientemente [50] se reportó que un gene de la subfamilia IIIA4 del citocromo P450 en humanos es inducido por fenobarbital, por dexametasona y por triacetiloleandomicina. También se ha reportado que la DMZ podría estar actuando como inductor de isoenzimas y que

existe un receptor glucocorticoide que controla una gran variedad de genes en el hígado [121].

De los datos obtenidos en la tabla XIII se puede decir que efectivamente, la dexametasona está activando el proceso de metabolismo de PZQ "in vitro"; en la figura 17 se observa una disminución de pendientes respecto al control, característico de un proceso de activación. Así mismo, los valores obtenidos en la tabla XIV, parecen indicar que a bajas concentraciones de DMZ el efecto en la velocidad es más notorio, mayor activación, sin embargo, conforme aumenta la concentración de DMZ este efecto disminuye. Podría pensarse en varias posibilidades: debido a la similitud en la estructura química de ambos fármacos, quizá exista competencia por el sitio activo enzimático cuando se aumenta la concentración de DMZ, en este caso, la DMZ podría estar actuando como un inductor alostérico mas potente que el PZQ, cuando las concentraciones de PZQ son pequeñas; cuando se aumenta la concentración de PZQ, la competencia es mayor. Galtier y cols. [123] observaron en un estudio "in vitro" con fracción microsomal de ovinos, que la DMZ induce el metabolismo de albendazol, fármaco utilizado también en el tratamiento de la NCC. El efecto fue observado a altas concentraciones de DMZ ($375 \times 10^{-6}M$) y los niveles del sulfóxido de albendazol, principal metabolito, se aumentaron en un 55%. Los autores sugieren que se debe, ya sea a efectos de unión de tipo alostérico o bien, que podría pensarse en un proceso mixto de activación e inhibición dependiente de la concentración de activador.

En la figura 17 se observan las intersecciones de las líneas, en el eje positivo de las abscisas (+ 1/s), este tipo de intersecciones se ha observado en proceso de activación parcial y también en procesos en donde el aumento de la concentración del activador produce inhibición. Esta última explicación es poco probable por el hecho de que la DMZ es inductor enzimático, por lo que sería necesario utilizar preparaciones enzimáticas más específicas, como microsomas o hepatocitos, así como sustancias inhibitoras de sitio específico para poder comprobarlo.

La posibilidad de un proceso de activación de tipo parcial es la

más viable desde el punto de vista cinético, sin embargo existe la hipótesis de que el proceso se lleve a cabo en alguna isoenzima tomando en cuenta los reportes de que la DMZ actúa en isoenzimas individuales.

Sería conveniente experimentar rangos de concentración más amplios, de ambos fármacos, con la finalidad de corroborar la existencia de desviaciones de la linealidad, caracterizar el tipo de proceso enzimático y verificar nuestra hipótesis.

De acuerdo al análisis de resultados podría especularse que el metabolismo de PZQ se lleva a cabo en la misma subfamilia genética del citocromo P450 en donde actúa la DMZ como inductor enzimático.

V.3. ANALISIS RETROSPECTIVO DEL EFECTO "IN VIVO" DE DMZ SOBRE LOS NIVELES PLASMATICOS DE PZQ.

Como ya se había mencionado, en un estudio previo efectuado en pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis (NCC), se encontró una disminución de los niveles plasmáticos de PZQ en aproximadamente 50% cuando se administró conjuntamente con DMZ, sin que los parámetros farmacocinéticos se vieran alterados [7].

El PZQ sufre extenso metabolismo hepático, ya que después de su administración oral, en diferentes especies animales, sólo una pequeña proporción, aproximadamente 1% del fármaco inalterado llega a la circulación general [73], por lo que es altamente probable que tenga un alto cociente de extracción hepático (aclaramiento = flujo sanguíneo al órgano x cociente de extracción; $Cl = Q \times E$). En fármacos con estas características un cambio en el flujo sanguíneo hepático podría alterar la depuración, lo que se reflejaría en la velocidad de eliminación.

Considerando que el hígado es un órgano altamente perfundido, 0.8 ml/min x ml de tejido, es poco probable que el flujo sanguíneo se altere [24].

En el estudio de farmacocinética en pacientes no se determinó la depuración plasmática del PZQ, ya que no es posible administrarlo por vía intravenosa. Considerando que la vida media de eliminación no se vió alterada, la disminución del área bajo la curva y de la concentración máxima parecería contradictoria. Sin embargo, dado que la biodisponibilidad es una relación entre la perfusión y la actividad enzimática, y tomando en cuenta que el PZQ tiene un alto cociente de extracción, la biodisponibilidad disminuye si la actividad enzimática aumenta. El cociente de extracción, en este caso alto, sólo está limitado por la velocidad de perfusión, por lo que la depuración no cambia. En este estudio sólo se calculó la vida media de eliminación, la cual no se alteró, indicando que el volumen de distribución tampoco se vió alterado. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo apoyan los datos obtenidos en el estudio de farmacocinética.

Bittencourt y cols. [90] observaron disminución en los niveles plasmáticos de PZQ, después de dosis única de 25 mg/Kg, en pacientes epilépticos bajo monoterapia con carbamazepina o fenitoína. El área bajo la curva disminuyó 73.9% y 90.3% respectivamente, sin embargo, al igual que el estudio con DMZ [7], no encontraron diferencias en la vida media de eliminación. Los autores sugieren un efecto combinado de inducción del metabolismo y desplazamiento de la unión de PZQ a proteínas por los antiepilépticos. Ellos sugieren incrementar la dosis de PZQ de 25 mg/Kg/día a 50 mg/Kg/día en aquellos pacientes que reciban en conjunto fármacos inductores del metabolismo.

A pesar de que los niveles plasmáticos de PZQ no están relacionados con el efecto farmacológico y de que se ha comprobado su eficacia clínica en pacientes con NCC bajo el régimen de 50mg/Kg/día (90% de efectividad) [2,6], deberán hacerse estudios de eficacia terapéutica antes de modificar un esquema de administración, debido a la gran variabilidad individual encontrada en los niveles plasmáticos de PZQ en diferentes estudios [75,77,78,81].

Así mismo, es de igual importancia el profundizar los estudios de metabolismo en fármacos, que como el PZQ, se administran bajo politerapia lo que aumenta el riesgo de interacciones y que además se administran como mezcla racémica en donde cada enantiómero puede comportarse de diferente manera en los procesos de disposición del fármaco.

Los resultados expuestos, permitirán explorar otras áreas en el estudio del PZQ así como el entendimiento de algunas ya estudiadas.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

El método analítico desarrollado para la cuantificación de Prazi-quantel resultó ser:

- * Lineal en el rango de concentración de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$.
- * Repetible tanto en un día como en días diferentes cuando es realizado por un analista.
- * Exacto en el rango de concentración de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$.
- * Sensible para los objetivos planteados, ya que la concentración mínima detectable fue de 31.2 ng/ml.
- * Selectivo puesto que no se detectaron interferencias endógenas del homogenado respecto a la señal del PZQ, así como tampoco se presentaron interferencias por parte del fármaco utilizado en los estudios de interacción "in vitro".
- * El método presenta las ventajas de ser sensible, sencillo y rápido, ya que pueden ser analizadas hasta 30 muestras por día.

El estudio "in vitro" de interacción metabólica mostró que:

- * El sistema "in vitro" con homogenado de hígado de rata, bajo las condiciones experimentales utilizadas, es adecuado para que se lleve a cabo la oxidación de PZQ.
- * De acuerdo al comportamiento cinético-enzimático observado, la oxidación de PZQ se efectúa por medio de un sistema enzimático específico.
- * La velocidad de oxidación de PZQ es mayor en presencia de DMZ
- * Al aumentar la concentración de DMZ, se observa el comportamiento típico de un proceso de activación enzimática.
- * El proceso cinético de oxidación de PZQ en presencia de DMZ sugiere un proceso de tipo parcial y/o mixto, o bien la presencia de isoenzimas.

- * A concentraciones altas de PZQ, es probable que exista competencia con DMZ por el mismo sitio de oxidación.
- * Dado que la DMZ actúa a nivel de citocromo P450, en la subfamilia IIIA4, es probable que el metabolismo de PZQ se lleve a cabo en el mismo sitio.
- * El sistema "in vitro" desarrollado permitirá el estudio de otros fármacos que se metabolizan por citocromo P450 y de esta manera observar posibles interacciones, ya sea por inhibición o por inducción enzimática.

BIBLIOGRAFIA.

1. King CH y Mahmoud AA. *Ann. Intern. Med.*, 1989;110:290-6.
2. Del Bruto OH y Sotelo J. *Reviews of Infectious Diseases*.1988; 10:1075-87.
3. Robles C y Chavarria M. *Gac. Med. Mex.*, 1980; 116:65-71.
4. Spina-Franca A y De Rezende GL. *Sal. Púb. Mex.*, 1982; 24:633-6.
5. Friedman J. *Arch. Neurol.*, 1983; 40:257.
6. Sotelo J, Escobedo F, Rodríguez-Carbajal J, Torres B, Rubio-Donnadieu F. *N. Engl. J. Med.*, 1984; 310:1001-7.
7. Vásquez ML, Jung H, Sotelo J. *Neurology* 1987; 37:1561-2.
8. Testa B y Jenner P. (Eds.) *Drug Metabolism: Chemical and Biochemical Aspects*, Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1976.
9. Boyer JL. En: *Clinical Pharmacology: Basic Principles and Therapeutics* (Melmon KL y Morrelli HP, Eds.) Macmillan Publ. Co., N.Y., 1976; 388-431.
10. Benet LZ, Mitchell JR y Sheiner LB. En: *Goodman y Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (Goodman GA, Rall TW, Nies AS y Taylor P, Eds.) Panamericana, 1991; 21-48.
11. Gillette JR. *Adv. Pharmacol.*, 1966; 4:219-61.
12. Davies DS, Gigon PL y Gillette JR. *Life Sci.*, 1969; 8:85-91.
13. Connelly JC y Bridges JW. En: *Progress in Drug Metabolism* (Bridges JW y Chasseaud LF, Eds.) Wiley & Sons, 1980; 1-112.
14. Nishibayashi H, Omura T y Sato R. *Biochim. Biophys. Acta*. 1966; 118:651-54.
15. Comai K y Gaylor JL. *J. Biol. Chem.*, 1973; 248:4947-51.
16. Schenkman JB, Remmer H y Estabrook RW. *Mol Pharmacol.*, 1967; 3:113-23.
17. Chaplin MD y Mannering GJ. *Fed Proc.*, 1969; 28:484.
18. Lund J, Zaphiropoulos G, Mode A, Warner M y Gustafsson JA. *Adv. Pharmacol.*, 1991; 22:325-54.
19. Woolf T y Ghang T. En: *Pharmacokinetics* (Welling P y LS Tse F, Eds.), Marcel Dekker, Inc. 1988; 451-72.

20. Mazel P. En: Fundamentals of Drug Metabolism Metabolism and Drug Disposition (La Du BN, Mandel HG y Way EL, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Med., 1971; 527-45.
21. Bogdanska HU, Kranch L y Johnson BC. Arch. Biochem. Biophys., 1965; 109:248-58.
22. Williams RT. En: Fundamentals of Drug Metabolism Metabolism and Drug Disposition (La Du BN, Mandel HG y Way EL, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Med., 1971; 187-205.
23. La Du BN. En: Fundamentals of Drug Metabolism Metabolism and Drug Disposition (La Du BN, Mandel HG y Way EL, Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Med., 1971; 308-27.
24. Rowland M y Tozer TN. Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, Lea & Febiger, Philadelphia. 1989.
25. Kato R y Gillette JR. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1965; 150:285-91.
26. Kato R. J Biochem., 1966; 59:574-9.
27. Beckett AH, Gorrod JW y Jenner P. J. Pharm Pharmacol., 1971; 23:628-32.
28. Neims AH, Warner M, Loughnan FM y Aranda JV. Adv. Pharmacol., 1976; 16:427-45.
29. Conney AH y Burns JJ. Adv. Pharmacol., 1962; 1:31-58.
30. Conney AH. Pharmacol. Rev., 1967; 19:317-66.
31. Schmucker DL. Pharmacol. Rev., 1985; 37:133-48.
32. Dingell JV, Joiner PD y Hurwitz L. Biochem. Pharmacol., 1966; 15:971-6.
33. Conney AH, Bray GA, Evans C y Burns JJ. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1961; 92:115-27.
34. Becking GC y Morrison AB. Biochem. Pharmacol., 1970; 19:2639-42.
35. Campbell TC. Clin. Pharmacol. Ther., 1977; 22:699-706.
36. Litterst CH, Mimnaugh G y Gram T. Biochem Pharmacol., 1977; 26:749-55.
37. Vesell ES. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1968; 151:900-12.
38. Ritschel W.A. Pharm. Int., 1984; May. 116-22.
39. Neale MG y Parke DV. Biochem. Pharmacol., 1973; 22: 1451-55.

40. Parker WA. En: Pharmacokinetics Basis for Drug Treatment (Benet L, Massoud N y Gambertoglio JG, Eds.), Raven Press, 1984; 249-68.
41. Wilkinson GR y Branch RA. En: Pharmacokinetics Basis for Drug Treatment (Benet L, Massoud N y Gambertoglio JG, Eds.), Raven Press, 1984; 49-62.
42. Murray M. Clin. Pharmacokinet., 1992; 23:132-46.
43. Schimassek H, Walli AK, Ferraudi M y Jost U. En: Regulation of Hepatic Metabolism (Lundquist F y Tygstrup N, Eds.), Munksgaar, Copenhagen. 1974; 715-25.
44. Pond SM. En: Pharmacokinetics Basis for Drug Treatment (Benet L, Massoud N y Gambertoglio JG, Eds.), Raven Press, 1984; 195-219.
45. May PE, Stewart RB y Cluff LE. Clin. Pharmacol. Ther., 1977; 22:322-8.
46. Rowland M. J Pharmacokin. Biopharm., 1973; 1:553-68.
47. Levine RR. Pharmacology: Drug Actions and Reactions. Little Brown & Co. 1973; 278-91.
48. Rubin A, Biochem. Pharmacol., 1964; 13:1007-16.
49. Anders M. Annu. Rev Pharmacol., 1971; 1:37-56.
50. Murray M y Reidy GM. Pharmacol. Rev., 1990; 42:85-101.
51. Bresnick E, Foldes E y Hines R. Pharmacol. Rev., 1984; 36:43S-51S.
52. La Du BN, Mandel HG y Way EL. (Eds.), Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition, Williams and Wilkins, Baltimore, Med., 1971; 279-307.
53. Gonzalez F. Pharmacol. Rev., 1989; 40:243-88.
54. Webster LT. En: Goodman and Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (Goodman GA, Rall TW, Nies AS y Taylor P, Eds.) Panamericana, 1991; 929-52.
55. Seubert R, Pohlke R y Loebich F. Experientia 1977; 33:1036-7.
56. Martindale W. The Extra Pharmacopoeia. 29a. ed. The Pharmaceutical Press, London. 1989.
57. Groll E. Adv. Pharmacol. Chemother., 1984; 20:219-38.
58. Rezende de G y Groll E. Sal. Pub. Méx., 1982; 24:683-90.

59. Xiao SH , You JQ, Guo HF y Catto BA. *J. Parasitol.*, 1991; 77: 241-45.
60. Andrews P, Thomas H, Pohlke R y Seubert R. *Med. Res. Rev.*, 1983; 3:147-200.
61. Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN y cols. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991; 45:345-9.
62. Xiao SH, Catto BA y Webster L. *J. Infect. Dis.*, 1985; 151: 1130-7.
63. Chub JM, Bennett JL, Akera T y Brody TM. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1978; 207:284-93.
64. Coles GC. *J. Helminthol.*, 1979; 53:31-3.
65. Andrews P, Tomas H y Weber H. *J. Parasitol.*, 1980; 66:920-5.
66. Terada M, Ishii AI, Kino H, Fujii Y y Sano M. *Experientia.* 1982; 38:549-52.
67. Xiao SH, Friedman PA, Catto BA y Webster LT. *J. Parasitol.*, 1984; 70:177-9.
68. Brindley PJ, Strand M, Norden AP y Sher A. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 34:99-108.
69. Sabah AA, Fletcher C, Webbe G y Doenhof MJ. *Exp. Parasitol.*, 1985; 60:348-54.
70. WHO Drug information. 1987; 1:163-5.
71. Frohberg H. *Sal. Púb. Méx.*, 1982; 24:605-24.
72. Jung H, Vásquez ML, Sánchez M, Penagos P y Sotelo J. *Proc. West. Pharmacol Soc.*, 1991; 34:335-40.
73. Steiner K y Garbe A. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 1976; 2:97-106.
74. Andrews P. *Vet. Med Res.*, 1976; 2:154-65.
75. Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina MT y Sotelo J. *Clin. Neuropharm.*, 1990; 13:559-64.
76. Xiaozhang P. *Chinese J. Infect. Dis.*, 1987; 2:76-9.
77. Spina-Franca A, Machado LR, Nobrega JPS, Livramento JA, Diekmann HW, Groll E y de Rezende GL. *Arq. Neuro-Psiquiatria (Sao Paulo)* 1985; 43:243-59.
78. Overbosch D, van de Nes JCM, Groll E, Diekmann HW, Polderman AM y Mattie H. *Eur. J. Clin. Neuropharm.*, 1987; 33:287-92.

79. Patzschke KE, Putter J, Wegner LA, Horster FA y Diekmann HW. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 1979;3:149-56.
80. Leopold G, Ungethüm W, Groll E, Diekmann HW, Nowak H y Wegner DHG. Eur. J. Clin. Pharmacol., 1978; 14:281-91.
81. Bittencourt PRM, Gracia CM, Gorz AM y Oliveira TV. Acta Neurol. Scand., 1990; 82:28-33.
82. Ali MH, Fetterolf DD, Abramson FP y Cohn VH. Biomed. Environ. Mass. Spectrom., 1990; 19:179-85.
83. Ali MH, Abramson FP, Fetterolf DD, y Cohn VH. Biomed. Environ. Mass. Spectrom., 1990; 19:186-90.
84. Buhring KU, Diekmann HW, Muller H, Garbe A y Nowak H. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 1978; 3:179-90.
85. Westhoff F y Blaschke G. J. Chromatogr., 1992; 578:265-71.
86. Mostafa MH, Swelem SM y Farag HF. Biochem. Pharmacol., 1989; 38:251-5.
87. Ebeid F, Farghali H, Botros S y Metwally A. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1990; 84:262-4.
88. Ofori-Adjei D, Adjepon-Yamoah KK y Lindstrom B. Ther. Drug. Monitor., 1988; 10:45-50.
89. Qian MX, Liu YH, Quan YZ y Qiu ZY. Acta Pharmacol. Sin., 1989; 10:92-6.
90. Bittencourt PRM, Gracia CM, Martins R, Fernandes AG y Diekmann HW. Neurol., 1992; 42:492-6.
91. Diekmann HW, Schneidereit M y Overbosch D. Acta Leiden. 1989; 57:217-28.
92. Pearson RD y Guerrant RL. Ann. Int. Med., 1983; 99:195-8.
93. USP DI 1988;1810-11.
94. Wong LJ, Tsao GC, Bruce JI y Wong SS. Experientia 1990; 46:461-4.
95. Anwar WA, Au WW, Ramanujam Vm y Legator MS. Mutat. Res., 1989; 222:283-9.
96. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ediciones PLM, 1993.

97. Morano OC. Desarrollo y Validación de un método analítico para cuantificar Prazicuantel en Fluidos Biológicos. Tesis Licenciatura. Fac. Química, UNAM. 1992.
98. Vasquez ML. Interacción Farmacocinética del Prazicuantel con Dexametasona. Tesis Maestría. Fac. Química, UNAM. 1987.
99. Putter J. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 1979; 3:143-8.
100. Diekmann HW. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 1979; 3:139-42.
101. Xiao SH, Catto BA y Webster LT. J. Chromatogr. 1983; 275: 127-32.
102. Mandour ME, Turabi HE, Homeida MMA, El Sadig T, Ali HM, Bennett JL, Leahey WJ y Harron DWG. Trans. R. Soc. Trop., Med. Hyg., 1990; 84:389-93.
103. Sotelo J. En: Handbook of Clinical Neurology (Harris AA, Ed.) Elsevier Sci. Publ., 1988; 8:529-34.
104. Ciferri F. N. Engl. J. Med., 1984; 311:733.
105. De Ghetaldi LD, Norman RM, Douville AW Jr. N. Engl. J. Med., 1984;311:732-3.
106. Robles C. Sal.. Pub. Méx., 1981; 23:442-50.
107. Cohen EM. En: Analytical Profiles of Drug Sustances (Florey K. Ed.) Academic Press, 1973; 2:163-97.
108. Haynes RC. En: Goodman y Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (Goodman GA, Rall TW, Nies AS y Taylor P, Eds.) Ed. Panamericana, 1991; 1384-414.
109. McMahon M, Gerich J y Rizza R. Diabetes Metab. Rev., 1988; 4:17-30.
110. Bowman WC y Rand MJ. Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. Interamericana, 1984.
111. Funder JW y Sheppard K. Annu. Rev. Physiol. 1987; 49:397-411.
112. Parrillo JE y Fauci AS. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1979; 19:179-201.
113. Tsuci SE, Moore RG, Ashley JJ y McBride WG. J. Pharmacokin. Biopharm., 1979; 7:249-69.
114. Brooks SM, Werk EE, Ackerman SJ, Sullivan I y Thrasher K. New Engl. J. Med., 1972; 286:1125-8.

115. Jubiz W, Meikle AW, Levinson RA, Mizutani S, West CD y Tyler FH. *New. Engl. J. Med.*, 1970; 283:11-18.
116. Köbberling J y V zur Muhlen A. *Acta Endocr.*, 1973; 72:308-18.
117. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193:265-75.
118. Dixon M y Webb EC. *Enzymes*. Longman Group Ltd. 1979.
119. Shah VP, Midha KR, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP et al. *J. Pharm Sci.*, 1992; 81:309-12.
120. González-Esquivel DF, Morano OC, Sánchez RM, Sotelo MJ y Jung CH. *J. Chromatogr.*, 1993; 613:174-8.
121. Fabre G, Combalbert J, Berger Y y Cano JP. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.*, 1990; 15:165-71.
122. Högemann K, Kiec-Kononowicz K, Westhoff F y Blaschke G. *Arzneim. Forsch.*, 1990; 40:1159-62.
123. Galtier P, Alvinerie M y Delatour P. *Am. J. Vet. Res.*, 1986; 47: 447-50.