



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"ASPECTOS BIOFARMACEUTICOS  
DEL HEPP."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN FARMACIA (BIOFARMACIA)  
P R E S E N T A  
Q.F.B. LIZ JANNET MEDINA REYES



Biofarmacia



CIUDAD UNIVERSITARIA

1997



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 esta 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.

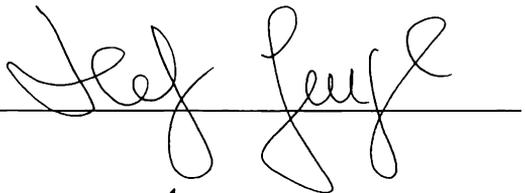
## JURADO ASIGNADO

**Presidente:** M. en C. Inés Fuentes Noriega.  
**Primer vocal:** M. en C. Ma. de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.  
**Secretario:** M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado.  
**Primer suplente:** M. en C. Guadalupe Clara Espinosa Martínez.  
**Segundo suplente:** M. en C. Adriana M. Domínguez Ramírez.

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM Y LABORATORIO DE  
NEUROPSICOFARMACOLOGIA, INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA "MANUEL VELASCO SUAREZ".**

**ASESOR:**

**M. en C. Helgi Jung Cook**



**SUSTENTANTE:**

**Q.F.B. Liz Jannet Medina Reyes**



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“ASPECTOS BIOFARMACEUTICOS DEL HEPP”**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN FARMACIA (OPCION BIOFARMACIA)**  
**P R E S E N T A :**  
**Q.F.B. LIZ JANNET MEDINA REYES**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D.F.**

**1997**

*Aprender es un tesoro que acompaña a su dueño por doquier.*

**Dedico ésta tesis a los seres que más amo:**

**A Dios, porque me ha permitido llegar hasta aquí con bien.**

**A mi madre, pilar de mi vida, por su su inmenso amor y apoyo, sin el cual no hubiera logrado ninguno de mis sueños.**

**A mi abuelita, porque a pesar de sus dolencias cada día nos demuestra su amor a la vida, dandonos un ejemplo de amor y fortaleza.**

**A mi hermano, por ser el gordito que es y para ver si así se aplica.**

**Y sobre todo a tí mi amor, por el maravilloso tiempo que hemos pasado juntos, por el que nos resta pasar, porque eres todo para mí y porque sabes que éste trabajo también es tuyo. Te amo.**

**¡ GRACIAS !**

### ***Agradecimientos:***

A la M. en C. Helgi Jung Cook por darnos a Luis y a mí la oportunidad de trabajar con usted, por transmitirnos su conocimiento, por confiar en nosotros y por ser una gran persona y una gran profesora. Gracias.

A la maestra Inés y la maestra Margarita, porque en el tiempo que hemos convivido nunca han dejado de darnos su apoyo, su confianza y sus consejos. Gracias.

A los miembros del jurado por sus consejos para terminar de escribir éste trabajo.

A todos los profesores que a lo largo de la maestría me hicieron el favor de transmitirme sus conocimientos.

A mi tía Lucha y mis primos Luis A., Mauricio y Víctor porque seguimos siendo hermanos a pesar de que nuestras vidas han cambiado.

A mis suegros por haber educado a un hombre tan maravilloso.

A Dinora y Nelly por todos los momentos que hemos pasado en el laboratorio y por todo el apoyo que he recibido de su parte.

A mis latosos compañeros de la licenciatura, esperando nunca separarnos.

A todos mis compañeros de los laboratorios 112 y 113, a mis compañeros de la maestría y a todos aquéllos con los que haya compartido momentos felices y momentos difíciles en nuestro trayecto por nuestra querido Facultad.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por dejarme desarrollar en el área de la investigación.

Al M.V.Z. Rodolfo Madrigal y a la Q.F.B. Angeles Fernández por su incalculable ayuda para la realización de éste trabajo.

A la Facultad de Química y a todos sus profesores por haberme permitido desarrollarme en sus aulas.

A CONACyT por su invaluable apoyo para poder cursar la maestría.

## INDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.</b>	<b>2</b>
<b>II. GENERALIDADES.</b>	<b>5</b>
2.1. Epilepsia.	5
2.2. D, L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP).	7
2.2.1. Propiedades fisicoquímicas.	7
2.2.2. Antecedentes.	8
2.2.3. Perfil anticonvulsivante y neurotóxico.	9
2.2.4. Mecanismo de acción.	12
2.2.5. Estudios Preclínicos.	13
2.2.6. Estudios clínicos Fase I en voluntarios sanos.	15
2.3. Fenitoína (difenilhidantoína).	15
2.3.1. Efectos farmacológicos.	16
2.3.2. Propiedades farmacocinéticas.	17
2.3.3. Diferencias interespecies en el metabolismo de la fenitoína.	19
2.3.4. Toxicidad.	19
2.3.5. Concentraciones plasmáticas.	20
2.3.6. Interacciones con otros fármacos.	20
2.3.6.1. Alteración de la cinética de la fenitoína por otros fármacos.	
2.3.6.2. Alteración en la cinética de algunos fármacos, provocada por fenitoína.	
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.</b>	<b>27</b>
3.1. Método analítico para la cuantificación de 3-hidroxi-3-etil-fenil propionamida (HEPP).	27
3.1.1. Material y equipo.	27
3.1.2. Reactivos.	28
3.1.3. Estándares.	28
3.1.4. Soluciones.	28
3.1.5. Preparación de los estándares de referencia.	29
3.1.6. Preparación de la curva patrón de HEPP.	30
3.1.7. Método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma y albúmina.	30
3.1.8. Condiciones cromatográficas.	31

<b>3.1.9. Validación del método analítico.</b>	<b>33</b>
3.1.9.1. Selectividad.	
3.1.9.2. Linearidad.	
3.1.9.3. Exactitud.	
3.1.9.4. Repetibilidad.	
3.1.9.5. Reproducibilidad.	
3.1.9.6. Estabilidad.	

**ESTUDIO No. 1:**

<b>3.2. Unión de HEPP a proteínas plasmáticas.</b>	<b>35</b>
3.2.1. Cuantificación de proteínas plasmáticas totales.	<b>35</b>
3.2.1.1. Material y equipo.	
3.2.1.2. Reactivos.	
3.2.1.3. Preparación de soluciones.	
3.2.1.4. Preparación de la curva patrón para cuantificar proteínas plasmáticas.	
3.2.1.5. Método.	
3.2.2. Estudios de unión a proteínas " <i>in vitro</i> ".	<b>39</b>
3.2.2.1. Material y equipo.	
3.2.2.2. Reactivos.	
3.2.2.3. Preparación de soluciones.	
3.2.2.4. Estudios " <i>in vitro</i> ".	
3.2.2.4.1. Tiempo de equilibrio.	
3.2.2.4.2. Determinación de unión del HEPP a la membrana de diálisis.	
3.2.2.4.3. Integridad de la membrana.	
3.2.2.4.4. Determinación del volumen de Shift o volumen desplazado.	
3.2.2.4.5. Grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas.	
3.2.2.4.6. Grado de unión de HEPP a albúmina.	

**ESTUDIO No. 2:**

<b>3.3. Interacción farmacocinética entre HEPP y fenitoína (DFH).</b>	<b>42</b>
3.3.1. Fármacos administrados.	<b>42</b>
3.3.2. Sujetos de estudio.	<b>43</b>
3.3.3. Diseño experimental del estudio.	<b>43</b>
3.3.4. Horario de toma de muestra.	<b>44</b>
3.3.5. Análisis de las muestras.	<b>46</b>
3.3.6. Análisis estadístico del estudio de interacción.	<b>46</b>

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.</b>	<b>47</b>
4.1. Validación del método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma y albúmina bovina.	<b>47</b>
4.1.1. Selectividad.	<b>47</b>
4.1.2. Linealidad.	<b>50</b>
4.1.3. Exactitud.	<b>51</b>
4.1.4. Repetibilidad.	<b>52</b>
4.1.5. Reproducibilidad.	<b>53</b>
<b>ESTUDIO No. 1:</b>	
4.2. Estudios de unión a proteínas "in vitro".	<b>55</b>
4.2.1. Factores evaluados antes de realizar la unión a proteínas.	<b>55</b>
4.2.1.1. Tiempo de equilibrio.	
4.2.1.2. Unión del HEPP a la membrana de diálisis.	
4.2.1.3. Integridad de la membrana.	
4.2.1.4. Determinación del volumen de Shift.	
4.2.5. Determinación del grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas.	<b>59</b>
4.2.6. Determinación del grado de unión a albúmina del HEPP.	<b>61</b>
<b>ESTUDIO No. 2:</b>	
4.3. Interacción farmacocinética entre el HEPP y la fenitoína (DFH).	<b>66</b>
4.3.1. Influencia del HEPP en la farmacocinética de la fenitoína (DFH).	<b>67</b>
4.3.2. Influencia de la fenitoína (DFH) en la farmacocinética del HEPP.	<b>71</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>81</b>
<b>VII. APENDICE</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura del D, L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida.	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b>	Estructura química de la fenitoína (DFH).	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b>	Diagrama para la cuantificación de HEPP en muestras plasmáticas o albúmina.	<b>32</b>
<b>Figura 4.</b>	Diagrama de flujo para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales en muestras.	<b>38</b>
<b>Figura 5.</b>	Selectividad del método analítico para la cuantificación de HEPP en albúmina.	<b>48</b>
<b>Figura 6.</b>	Selectividad del método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma.	<b>49</b>
<b>Figura 7.</b>	Linealidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.	<b>50</b>
<b>Figura 8.</b>	Linealidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en albúmina.	<b>51</b>
<b>Figura 9.</b>	Determinación del tiempo de equilibrio del HEPP.	<b>56</b>
<b>Figura 10.</b>	Gráfica de la doble recíproca para la obtención de la constante de asociación fármaco-proteína y los sitios de unión.	<b>63</b>
<b>Figura 11.</b>	Gráfica de Scatchard para la obtención de la constante de asociación fármaco-proteína y los sitios de unión.	<b>64</b>
<b>Figura 12.</b>	Gráfica tipo Woolf para la obtención de la constante de asociación fármaco-proteína y los sitios de unión.	<b>64</b>
<b>Figura 13.</b>	Valores promedio ( $\pm$ d.e.) de los niveles plasmáticos de DFH en 6 conejos después de la administración de DFH y DFH+HEPP.	<b>69</b>
<b>Figura 14.</b>	Valores promedio ( $\pm$ d.e.) de los niveles plasmáticos de HEPP en 6 conejos después de la administración de HEPP solo.	<b>72</b>
<b>Figura 15.</b>	Valores promedio ( $\pm$ d.e.) de los niveles plasmáticos de HEPP en 6 conejos después de la administración de HEPP + DFH.	<b>74</b>
<b>Figura 16.</b>	Valores promedio ( $\pm$ d.e.) de los niveles plasmáticos de HEPP en 6 conejos después de la administración de HEPP y HEPP + DFH.	<b>75</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de las crisis epilépticas.	<b>6</b>
<b>Tabla 2.</b>	Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales.	<b>37</b>
<b>Tabla 3.</b>	Diseño de bloques incompleto balanceado utilizado para el estudio.	<b>44</b>
<b>Tabla 4.</b>	Tiempo de muestreo para cada fármaco y para la administración conjunta de éstos (volumen colectado: 3 mL).	<b>45</b>
<b>Tabla 5.</b>	Exactitud del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.	<b>52</b>
<b>Tabla 6.</b>	Exactitud del método analítico para cuantificar HEPP en albúmina.	<b>52</b>
<b>Tabla 7.</b>	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.	<b>53</b>
<b>Tabla 8.</b>	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en albúmina.	<b>53</b>
<b>Tabla 9.</b>	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.	<b>54</b>
<b>Tabla 10.</b>	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en albúmina.	<b>54</b>
<b>Tabla 11.</b>	Unión del HEPP a la membrana de diálisis a concentración de 50 µg/mL, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.	<b>57</b>
<b>Tabla 12.</b>	Unión del HEPP a proteínas plasmáticas (3.0 hrs., 37°C y 30 rpm).	<b>60</b>
<b>Tabla 13.</b>	Unión del HEPP a albúmina, utilizando el método de diálisis al equilibrio.	<b>62</b>
<b>Tabla 14.</b>	Resultados obtenidos de las gráficas de la doble recíproca, Scatchard y Woolf.	<b>65</b>
<b>Tabla 15.</b>	Valores promedio de concentración plasmática de DFH a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de DFH y DFH + HEPP a conejos.	<b>68</b>
<b>Tabla 16.</b>	Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos después de la administración de DFH y DFH + HEPP en conejos.	<b>70</b>
<b>Tabla 17.</b>	Resultados obtenidos al aplicar las pruebas de ANADEV A y t de Student para comparar cada uno de los parámetros farmacocinéticos promedio de cada tratamiento.	<b>71</b>
<b>Tabla 18.</b>	Valores promedio de concentración plasmática de HEPP a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de HEPP solo a conejos.	<b>71</b>
<b>Tabla 19.</b>	Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos después de la administración de HEPP solo en conejos.	<b>73</b>

<b>Tabla 20.</b> Valores promedio de concentración plasmática de HEPP a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de HEPP + DFH a conejos.	<b>74</b>
<b>Tabla 21.</b> Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos después de la administración de HEPP + DFH en conejos.	<b>75</b>
<b>Tabla 23.</b> Parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos después de la administración de HEPP y HEPP + DFH en conejos.	<b>76</b>
<b>Tabla 24.</b> Resultados obtenidos al aplicar las pruebas de ANADEVVA y t de Student para comparar los parámetros farmacocinéticos promedio de cada tratamiento.	<b>76</b>

En el presente trabajo, se efectuó un estudio in vitro para determinar el grado de unión del HEPP (un nuevo fármaco con actividad antiepiléptica) a proteínas plasmáticas. La determinación del grado de unión a proteínas se llevó a cabo en un dializador de cinco celdas, evaluándose la unión tanto a proteínas plasmáticas totales como a albúmina. Los resultados demostraron que el HEPP se une únicamente a albúmina (30.0-39.0%), presenta una constante de afinidad  $KA = 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y 0.3028 sitios de unión por molécula de proteína, lo cual indica que el grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas no es de importancia farmacológica.

Así mismo, se realizó un estudio para determinar si existía interacción farmacocinética entre el HEPP y la fenitoína, utilizándose para ello nueve conejos macho, los cuales fueron divididos al azar de acuerdo a un diseño de bloques incompleto balanceado. Se tomaron muestras sanguíneas a diferentes tiempos después de la administración de los fármacos. El HEPP se cuantificó utilizando un método de CLAR y la fenitoína se analizó por el método de EMIT. Los parámetros farmacocinéticos de ambos fármacos se determinaron utilizando el paquete PCNONLIN 4.0.

Los resultados demostraron que el HEPP no altera la farmacocinética de la fenitoína.

En el caso del HEPP, el Area Bajo la Curva (ABCo $\rightarrow$ inf), el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) y el tiempo medio de residencia (TMR) disminuyeron aproximadamente un 56.0% cuando éste se administró junto con fenitoína. Por otro lado, la depuración (Cl) aumentó en un 43.9%.

Lo anterior nos sugiere que la fenitoína interacciona con el HEPP, incrementando el metabolismo de éste, probablemente por la inducción de las isoformas CYP2C9 y CYP2C10, responsables de la hidroxilación de fenitoína en el citocromo P-450.

# **I**

## ***Introducción y objetivos.***

---

---

El término epilepsia designa en conjunto a un grupo de trastornos del sistema nervioso central (SNC) que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios (crisis) de fenómenos anormales de origen motor (convulsión), sensitivo, autónomo o psíquico.<sup>1</sup>

Un fármaco antiepiléptico ideal suprimiría todas las crisis sin causar ningún efecto indeseable. Desgraciadamente, los fármacos usados en la actualidad en algunos casos no solo no controlan las crisis sino que con frecuencia producen efectos secundarios que van desde el mínimo deterioro del SNC hasta la muerte por anemia o insuficiencia hepática. El médico que trata enfermos epilépticos tiene que seleccionar un fármaco, o una combinación de fármacos apropiados para controlar las crisis lo mejor posible con un nivel aceptable de efectos desfavorables, sin embargo, generalmente el control completo de las crisis solo se logra en un 50% de los pacientes, y posiblemente un 25% más puede mejorar notablemente.<sup>1</sup>

En 1964 el Dr. Carvajal del IPN sintetizó la primera generación de compuestos anticonvulsivantes, de los cuales el HEPP resultó ser el más eficaz y menos tóxico utilizando varios modelos experimentales de

epilepsia. El perfil farmacológico de este fármaco resultó muy interesante, debido a que resulta efectivo para convulsiones producidas por diferentes mecanismos, lo cual lo convirtió en un excelente candidato a la experimentación en humanos.<sup>2-4</sup>

Para que un nuevo fármaco antiepiléptico pueda ser utilizado en la terapia en humanos, se requiere probar su eficacia y seguridad a partir de una amplia investigación experimental, tanto en animales como en voluntarios sanos. Dentro de los estudios de evaluación que se realizan a los nuevos fármacos se encuentran los relacionados a la unión de un fármaco a las proteínas plasmáticas ya que se sabe que solo el fármaco libre tiene la capacidad de atravesar membranas y llegar a su sitio de acción o bien, ser eliminado. La determinación del grado de unión a proteínas puede ser de gran utilidad para seleccionar los regímenes de dosificación óptimos, para monitorear el fármaco utilizando las concentraciones de fármaco libre o para ajustar las dosis de acuerdo a la capacidad de unión a proteínas plasmáticas y así, evitar efectos secundarios.<sup>5-8</sup>

Considerando que el control de un paciente que presenta crisis convulsivas es fundamental, antes de administrar un nuevo fármaco antiepiléptico se tiene que disminuir lentamente la dosis del fármaco original a la vez que se incrementa la del fármaco nuevo, para evitar una recaída del paciente, lo cual podría ser ocasionado por una interacción entre ambos fármacos ya sea, en los procesos de absorción, distribución, metabolismo o excreción, pudiendo ocasionar efectos secundarios graves en algunos pacientes o bien, simplemente no alcanzar la concentración plasmática necesaria para lograr su efecto terapéutico. Los estudios de interacción entre fármacos resultan por lo tanto, de gran utilidad para evitar éste tipo de interacciones en donde las consecuencias pueden ser muy graves.

Con base en lo anterior, se desarrolló el presente trabajo con los siguientes **objetivos:**

→ Determinar el grado de unión del HEPP, tanto a proteínas plasmáticas totales como a albúmina bovina, utilizando el método de diálisis al equilibrio.

→ Evaluar la posible interacción farmacocinética entre HEPP y fenitoína en conejos.

# II

## Generalidades.

---

---

### 2.1. EPILEPSIA.

El término epilepsia designa en conjunto a un grupo de trastornos del sistema nervioso central (SNC) que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios (crisis) de fenómenos anormales de origen motor (convulsión), sensitivo, autónomo o psíquico.<sup>1</sup>

La frecuencia de la epilepsia es de 3 a 6 por cada 1000 habitantes. La epilepsia primaria o idiopática indica los casos en que no es posible identificar la causa de las crisis. La epilepsia secundaria o sintomática es el trastorno en el cual factores como trauma, neoplasia, infección, anomalías del desarrollo, enfermedad cerebrovascular, neurocisticercosis o diversos estados metabólicos contribuyen a la etiología. La detección de factores que contribuyen a la epilepsia secundaria se ha facilitado con el advenimiento de mejores procedimientos de diagnóstico, como la tomografía axial computarizada y la resonancia magnética nuclear del encéfalo.

Con fines de tratamiento farmacológico, se clasifican a los pacientes de acuerdo con el tipo de crisis que experimentan. Una forma de

clasificarlos se presenta en la tabla 1. Esta forma simplificada de clasificarlas fue propuesta por la Comisión de Clasificación y terminología de la Liga Internacional contra la Epilepsia y está basada en las manifestaciones clínicas de los ataques y en el cuadro del electroencefalograma (EEG). El diagnóstico preciso es esencial porque la farmacoterapia es selectiva para un determinado tipo de crisis.<sup>1,9</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de las crisis epilépticas.

<b>Tipo de crisis</b>	<b>Clasificación</b>
1. Crisis parciales (focales locales)	A. Crisis parciales simples. B. Crisis parciales complejas. C. Crisis parciales secundariamente generalizadas.
2. Crisis generalizadas (convulsivas o no convulsivas)	A. Ausencias. B. Ausencias atípicas. C. Crisis mioclónicas. D. Crisis clónicas. E. Crisis tónico-clónicas (Gran mal) F. Crisis atónicas.

Hace casi un siglo se propuso que las crisis eran consecuencia de descargas ocasionales, repentinas, excesivas, rápidas y locales de sustancia gris y que una convulsión generalizada se producía cuando el tejido encefálico normal era invadido por la actividad iniciada en el foco anormal. Actualmente, por medio del EEG se demuestra que las crisis se asocian con descargas eléctricas anormales y a veces masivas del encéfalo y éste método es básico para el diagnóstico diferencial moderno de las epilepsias.<sup>1,9</sup>

## 2.2. D, L-3-HIDROXI-3-ETIL-3-FENILPROPIONAMIDA (HEPP).

### 2.2.1. Propiedades fisicoquímicas. <sup>2, 3, 10, 11</sup>

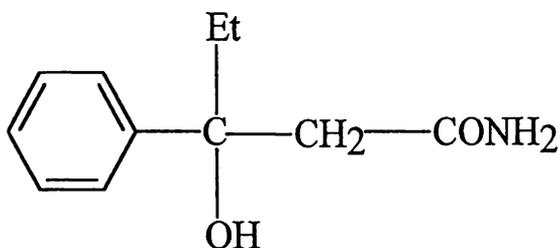
**Descripción:**

Polvo blanco grisáceo, cristalino, con ligero olor característico.

**Formula condensada:**



**Formula desarrollada:**



**Figura 1.** Estructura del D, L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida.

**Peso molecular:**

193.126 g/mol

**Solubilidad:**

Soluble en etanol, cloroformo, éter y acetonitrilo; ligeramente soluble en agua.

**Punto de fusión:**

90-100°C.

**Coefficiente de partición lípido/agua:**

Log de P = 1.83

**Propiedades espectrales:**

El espectro de absorción del infarrojo presenta los siguientes máximos: 503, 732, 872, 1163, 1365, 1452, 1660, 2936, 3008, 3042, 3150, 3419.

**2.2.2. Antecedentes.**

El interés en la epilepsia, ya sea a través de la búsqueda de sus causas o de tratamientos eficaces para su control, fomentó en 1978 la creación de un proyecto de cernimiento de antiepilépticos por parte de los institutos nacionales de salud (NIH) de EUA, el cual propone pruebas estandarizadas para unificar los criterios metodológicos e identificar los antiepilépticos más potentes y menos tóxicos.

Dentro de este programa, en México se ha sintetizado una serie homóloga de fenil-alquil-amidas <sup>2</sup> con marcada actividad anticonvulsivante (IPN, Dr. Guillermo Carbajal) a la que pertenece el compuesto 3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP), el cual ha sido evaluado de acuerdo a las normas propuestas por NIH (EUA) y ha cumplido con las pruebas preclínicas de eficacia y seguridad. <sup>2, 4, 12</sup>

El HEPP fue elegido por su menor neurotoxicidad y por su amplio espectro de acción, comparable al del fenobarbital y mayor que el del valproato. Además, a diferencia de otros antiepilépticos ha mostrado un interesante efecto contra el "síndrome de abstinencia al GABA" (SAG), por

lo que después de haber realizado los estudios preclínicos actualmente se encuentra bajo estudios en Fase Clínica I, donde ya se ha caracterizado la farmacocinética después de dosis únicas, así como la proporcionalidad de dosis en voluntarios sanos.<sup>3, 4, 12-16</sup>

De acuerdo a los lineamientos internacionales, los estudios que se requieren para validar la eficacia y la seguridad de un fármaco candidato a ser un nuevo antiepiléptico (dentro del cernimiento de compuestos antiepilépticos), son los siguientes:<sup>15</sup>

- 1.-Detección de la actividad anticonvulsionante.
- 2.-Cuantificación de actividad anticonvulsiva y neurotoxicidad.
- 3.-Diferenciación de la actividad anticonvulsionante.
- 4.-Evaluación del potencial antiepiléptico.
- 5.-Estudios mecanísticos.

Así mismo, dentro de los estudios de fase preclínica que se realizan a nuevos fármacos se encuentran las pruebas farmacológicas iniciales en animales, los estudios de toxicología (crónica, aguda, subaguda), estudios sobre la farmacocinética del fármaco en por lo menos dos especies animales, estudios de interacción entre fármacos, etc.

### **2.2.3. Perfil anticonvulsivante y neurotóxico.**

Actualmente existe una amplia disponibilidad de modelos experimentales de epilepsia, por medio de los cuales se puede probar la actividad anticonvulsivante de los fármacos antiepilépticos. Estos modelos pueden ir desde los electrochoques supramáximo (ESM) y pentilentetrazol, hasta los animales con epilepsia congénita, el kindling y el síndrome de abstinencia al GABA. Así mismo, se prueba la efectividad del fármaco ante

un conjunto de convulsiones producidas con compuestos químicos con diferente mecanismo de acción como: bicuculina (**BIC**) que bloquea los receptores GABA<sub>A</sub>, 4-amino-piridina (**4-AP**) que altera los canales de potasio y calcio, picrotoxina (**PIC**) que afecta los receptores de cloro asociados al receptor GABA<sub>A</sub>, estriknina (**EST**) que bloquea los receptores de glicina y tiosemicarbazida (**TSC**).<sup>15</sup>

Para determinar el espectro de acción del HEPP se le realizaron toda esta serie de estudios, cuyos resultados fueron los siguientes:

Los índices de terapéuticos para varios modelos de convulsiones (DL50/DE50), determinados en base a los resultados de neurotoxicidad mínima fueron: 0.75, 1.52, 1.76, 3.70 y 3.82 para ESM, TSC, PTZ, BIC, y 4-AP, respectivamente, lo cual permitió considerar al HEPP como un anticonvulsivante de amplio espectro.<sup>3, 15</sup>

De la comparación de la actividad anticonvulsionante y la toxicidad aguda del HEPP con otros fármacos de uso clínico, se observaron ciertas similitudes con el espectro de actividad del ácido valpróico, pero en todas las pruebas se utilizaron dosis menores de HEPP para lograr el mismo efecto. Aunque para picrotoxina y estriknina, el HEPP solo mostró protección parcial y presentó altos índices de protección para 4-AP y para TSC.

Brailowsky y cols.<sup>17</sup> demostraron que la administración crónica intracortical (durante 7 días) del ácido γ aminobutírico (GABA) presentaba efectos anticonvulsivantes en determinados modelos y que, al cesar la infusión, se manifestaba una excitabilidad exacerbada, en forma de descargas epileptiformes localizadas en el área cortical infundida. A este fenómeno le llamaron Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG). Aquellos fármacos que presenten propiedades anticonvulsivantes, deben ser capaces de eliminar o disminuir estas crisis al ser administrados a los animales de estudio. El HEPP fue diseñado con el propósito de que actuara como agonista a nivel del receptor del neurotransmisor GABA o bien, que

modulara su metabolismo. En este modelo, el HEPP logró disminuir la frecuencia de descarga del foco epiléptico en las primeras horas de su administración. La actividad se mantuvo entre 60 y 90 minutos y el efecto máximo se logró aproximadamente a los 30 min después de su aplicación. Ninguno de los fármacos antiepilépticos de uso común en la clínica (fenitoína, barbitúricos, valproato, carbamazepina) modificaron en forma significativa el patrón convulsivo en este modelo, lo cual lo hace más interesante ya que se demostró el efecto GABA-mimético del HEPP.

Los resultados obtenidos de los estudios anteriores indicaron que el HEPP podría actuar suprimiendo crisis convulsivas generadas por fallas en el sistema GABAérgico, específicamente a través del receptor GABA<sub>A</sub>. Así mismo, este anticonvulsivante podría actuar contra alteraciones de los canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> al bloquear efectivamente las convulsiones inducidas por 4-AP.<sup>15, 16</sup>

Las pruebas de neurotoxicidad fueron determinadas utilizando el modelo experimental "rotarod". Esta prueba se lleva a cabo exclusivamente en ratones y para ello éstos son colocados sobre una especie de rodillo de 1 pulgada de diámetro y el cual va a rotar a 6 rpm. Un ratón normal debe mantener el equilibrio durante largos periodos de tiempo, pero un ratón con deficiencias neurológicas estará inhabilitado para mantener el equilibrio por más de un minuto en cada una de tres pruebas. Dentro de estos estudios farmacológicos se encontró que la dosis tóxica 50 (DT50) evaluada en el rotorod fue de 214 mg/Kg. La dosis letal 50 (DL50) de este compuesto después de administración intraperitoneal fue de 767 mg/Kg y después de administración oral resultó de 858 mg/Kg.<sup>3,9</sup>

Para las pruebas de toxicidad subcrónica se valoraron los siguientes parámetros: consumo de agua y alimento, peso, química sanguínea, colesterol, histopatología, fosfatasa alcalina, ácido oxaloacético y pirúvico y pruebas funcionales renales. En estos estudios no se observaron cambios significativos a dosis menores de 550 mg/Kg. Las pruebas de fertilidad y

teratogénesis realizadas durante 12 meses tampoco mostraron diferencias significativas a los controles a dosis menores de 500 mg/Kg. En pruebas de genotoxicidad tampoco se observó actividad mutagénica a dosis menores de 5000 µg de HEPP por placa.<sup>3</sup>

Estudios de hepatotoxicidad realizados *in vitro* mediante cultivo de hepatocitos mostraron que a partir de 250 mg/L de cultivo, se produjo acumulación de triglicéridos y con dosis de 500 mg/L se presentaron alteraciones morfológicas de consideración.<sup>3, 18</sup>

#### **2.2.4. Mecanismo de acción.**

Dado a que el HEPP fue efectivo contra crisis inducidas por antagonistas a GABA, se propuso como mecanismo de acción, la modificación de receptores GABAérgicos.

Con el método de *binding* (unión), Chávez y cols.<sup>16</sup> descartaron la posible inhibición de la unión de noradrenalina, espiroperidol y serotonina a sus receptores específicos por parte del HEPP. Sin embargo, en ese estudio también se encontró que concentraciones micromolares inhiben la formación del complejo ligando-receptor de flunitrazepam y de picrotoxina. Estos datos sigieren como probable mecanismo de acción para el HEPP una modificación del polireceptor GABA<sub>A</sub> en los sitios correspondientes a benzodiazepinas y picrotoxina. Chávez observó que el tratamiento prolongado de HEPP, produjo cambios importantes en los receptores GABA<sub>A</sub> de corteza cerebral que consistieron en disminución considerable (30%) del número de receptores a benzodiazepinas y del canal de cloro, acompañados de un aumento de la constante de afinidad de los receptores a benzodiazepinas.

En conclusión, el HEPP modifica el receptor GABA<sub>A</sub> en los sitios correspondientes a las benzodiazepinas, así como al canal de cloro.

### **2.2.5. Estudios Preclínicos.**

Gómez, L y cols.<sup>3</sup>, realizaron una serie de estudios preclínicos para determinar los parámetros farmacocinéticos del HEPP en 3 diferentes especies animales, así como para estimar la biodisponibilidad, determinar el efecto del tratamiento crónico del HEPP sobre sus patrones de disposición y determinar los patrones de acumulación de HEPP.

Al administrar a ratas Wistar una dosis de 50 mg/Kg de HEPP por vía intravenosa, oral e intraperitoneal, encontraron que el HEPP se ajustó a un modelo bicompartimental y que la biodisponibilidad oral e intraperitoneal (F) fue de 0.6 y 0.8 respectivamente.<sup>3, 12</sup>

La estimación de la linealidad farmacocinética la efectuaron administrando tres diferentes dosis de HEPP por bolo i.v. en perros. El área bajo la curva de la concentración plasmática vs tiempo mostró una relación lineal con respecto a la dosis, y en todos los casos la cinética fue de primer orden.<sup>3, 13</sup>

Con el fin de obtener información sobre la cinética del HEPP después de dosis múltiples y para determinar si la administración crónica de este compuesto modifica sus propios patrones de disposición, los autores administraron HEPP vía i.p. durante cuatro días a conejos previamente tratados por bolo i.v. Finalmente, un día después de suspendido el tratamiento crónico, les fue administrado nuevamente HEPP por bolo i.v. Al comparar los resultados obtenidos antes y después de la administración crónica observaron diferencias significativas en la depuración y en el área bajo la curva, pero no en la vida media de la fase de eliminación, y proponen que el HEPP podría inducir sus propios patrones de eliminación, aunque sugieren que se deberán efectuar otros estudios que permitan comprobar lo anterior, debido a la gran variabilidad interindividual que se presentó.

En el estudio en dosis múltiple en conejo, el estado estacionario se alcanzó a partir de la tercera dosis, aproximadamente 10 horas después de iniciado el tratamiento con una concentración mínima aproximada de 10 µg/mL y una concentración máxima estimada de 50 µg/mL. Teóricamente las fluctuaciones entre la concentración máxima y mínima fueron del 84% y el factor de acumulación en la meseta fue de 0.4, valores que estuvieron de acuerdo con lo obtenido experimentalmente. De acuerdo a sus resultados, el fármaco no mostró acumulación notoria en esta especie y recomiendan dosis más altas e intervalos más cortos para lograr menores fluctuaciones en el estado estacionario.<sup>3, 4, 12</sup>

Los mismos autores realizaron un estudio de correlación farmacocinética-farmacodinámica en ratas<sup>12</sup>. Para ello, determinaron la concentración del fármaco en suero y cerebro a diferentes tiempos después de una administración i.v. Así mismo, en los mismos animales determinaron el curso temporal del efecto anticonvulsivante utilizando para ello un modelo de convulsiones generalizadas tónico-clónicas inducido por la administración subcutánea de 85 mg/Kg de pentilentetrazol (PTZ). Se consideró como índice de protección completa la ausencia de cualquier tipo de manifestación convulsiva durante los 10 min. Se encontró una relación directa de la concentración tanto en suero como en cerebro con el efecto anticonvulsivante del HEPP. Debido a que la administración fue por vía intravenosa, las concentraciones de HEPP que se lograron tanto en sangre como en cerebro fueron lo suficientemente altas como para mantener el efecto anticonvulsivante durante una hora a pesar de los grandes cambios en la concentración. A partir de ese tiempo observaron una rápida declinación del efecto relacionado directamente con la declinación en las concentraciones del fármaco tanto en cerebro como en suero. Esta relación permitió modelar el efecto anticonvulsivante de HEPP en base a las concentraciones en cerebro o en suero. Según su modelo efecto-concentración, la concentración mínima efectiva (CE<sub>min</sub>) en

suero es de 65 µg/mL. Los autores sin embargo recomiendan, que debido a las diferencias entre especies en la eliminación del fármaco es conveniente realizar estudios que relacionen la farmacocinética-farmacodinamia en otras especies.<sup>3, 12</sup>

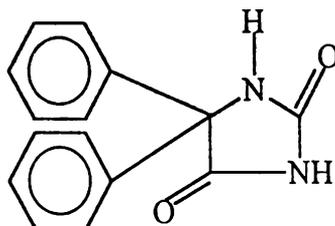
### **2.2.6. Estudios clínicos Fase I en voluntarios sanos.**

Una vez demostrada la seguridad y eficacia del HEPP, González-Esquivel y col.<sup>14</sup> iniciaron los estudios clínicos Fase I en voluntarios sanos. En la primera etapa se caracterizó la farmacocinética del fármaco en dosis única y la proporcionalidad de dosis. Los resultados demostraron que el fármaco se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal, con una vida media de absorción entre 0.6 y 1.8 hrs, alcanzándose la concentración máxima promedio entre las 2.0 y las 4.0 hrs. La concentración máxima osciló entre 5 y 9 µg/mL y la vida media de eliminación varió entre 10 y 25 hrs. Los estudios de proporcionalidad de dosis, después de administrar 250, 375 y 625 mg demostraron que existía superposición de datos plasmáticos respecto a las dosis y que las áreas bajo la curva de concentración contra tiempo respecto a la dosis (ABC/D), eran semejantes.

### **2.3. FENITOÍNA (DIFENLHIDANTOÍNA).<sup>9, 19</sup>**

Uno de los objetivos del presente trabajo fue realizar un estudio de interacción farmacocinética entre el HEPP y la fenitoína razón por la cual es importante conocer ciertos aspectos de éste fármaco antiepiléptico de uso común.

La fenitoína es uno de los agentes antiepilépticos más usados, efectivo contra todos los tipos de crisis parcial y tonico-clónicas, excepto en las crisis de ausencia. La estructura de este fármaco se presenta a continuación:



**Figura 2.** Estructura química de la fenitoína (DFH)

Un grupo 5-fenil u otro sustituyente aromático parece ser esencial para la actividad contra las crisis tónico-clónicas generalizadas clínicas y para la abolición del cuadro de crisis máxima por electroshock en los animales de laboratorio.

### 2.3.1. Efectos farmacológicos. <sup>1,9</sup>

La fenitoína ejerce su actividad antiepiléptica sin causar depresión general del SNC. En dosis tóxicas puede producir signos excitatorios y a niveles letales un tipo de rigidez. Las propiedades más fácilmente demostrables de la fenitoína son su capacidad para limitar el desarrollo de la actividad máxima de la crisis y para reducir la difusión del proceso comicial desde un foco activo. Ambos rasgos tienen indudable relación con su utilidad clínica. La fenitoína puede inducir la remisión total de las crisis

tónico-clónicas generalizadas y de algunas otras parciales, pero no elimina totalmente el aura sensitiva ni otros signos prodrómicos.

### 2.3.2. *Propiedades farmacocinéticas.* <sup>1, 9, 20, 21</sup>

Las características farmacocinéticas de fenitoína están marcadamente influenciadas por su limitada solubilidad acuosa y por que su eliminación es dosis-dependiente. Su inactivación por el sistema enzimático microsomal hepático se ve suceptiblemente alterado por otros fármacos.

La fenitoína es un ácido débil con un pKa de alrededor de 8.3; su solubilidad acuosa es muy baja. Después de una inyección intramuscular, el fármaco precipita en el sitio de inyección y es absorbido lenta e impredeciblemente, por lo que este fármaco nunca debe ser administrado por esta vía. <sup>1</sup>

La absorción de fenitoína después de una ingestión oral es lenta, algunas veces variable y ocasionalmente incompleta. Se han encontrado diferencias significativas en la biodisponibilidad de preparaciones farmacéuticas orales. La concentración máxima en plasma después de una dosis única va desde las 3.0 h hasta las 12.0 h. La absorción lenta durante la medicación crónica disminuye las fluctuaciones de la concentración del fármaco entre dosis. Después de su absorción, la fenitoína se distribuye rápidamente en todos los tejidos y las concentraciones en el plasma y en el encéfalo se igualan a los pocos minutos de la inyección intravenosa.

La fenitoína se une ampliamente a proteínas plasmáticas (alrededor del 90%), principalmente a albúmina, con un proceso de unión no saturable, una constante de asociación KA de  $10^2$  a  $10^3$  M<sup>-1</sup> y varios sitios de unión por mol de proteína. <sup>22, 23</sup> Una fracción mayor permanece libre en el neonato, en pacientes con hipoalbuminemia y en pacientes urémicos. La

fracción unida a tejidos, incluyendo cerebro, es semejante a la del plasma. Así, su volumen aparente de distribución es de aproximadamente 0.6 a 0.7 L/Kg, pero es casi 10 veces mayor cuando se calcula en base al fármaco libre. La concentración en el líquido cefaloraquídeo es igual a la fracción libre en plasma.

La fenitoína se elimina casi completamente por transformación metabólica. El 1% de la dosis administrada se excreta inalterada en la orina por filtración glomerular y reabsorción tubular. El principal metabolito en humanos es el derivado 5-(4-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína (*p*-HPPH), el cual constituye del 68 al 81% de la fenitoína administrada. El *p*-HPPH es inactivo y se excreta inicialmente en la bilis y subsecuentemente en la orina, en gran parte como glucurónido, por filtración glomerular y secreción tubular. Otros metabolitos aparentemente inactivos incluyen el dihidroxicatecol (1%), su derivado 3-metoxi (2.5%) y el dihidrodiol (7-11%). Se sugiere que isoformas del citocromo P-450 de la subfamilia CYP2C y más específicamente las isoformas CYP2C9 y CYP2C10, son los responsables de la hidroxilación de la fenitoína. Sin embargo, estudios más recientes en conejo <sup>9, 61</sup>, han demostrado que el CYP2C9 contribuye de manera más significativa a la hidroxilación de la fenitoína.

Cuando las concentraciones plasmáticas son menores a 10 µg/mL, la eliminación es de primer orden; la vida media plasmática se encuentra entre 6 y 24 h. A concentraciones más altas se presenta una cinética dosis-dependiente; la vida media plasmática se incrementa con la concentración (dosis), quizás debido a la saturación de la reacción de hidroxilación. <sup>1, 9, 21, 24</sup>

### 2.3.3. Diferencias interespecies en el metabolismo de la fenitoína.

En algunas especies animales se ha detectado una limitación determinada genéticamente en la habilidad para metabolizar fenitoína. Con excepción del perro y el gato, el principal producto metabólico de la fenitoína en especies como el mono, ratones, ratas, conejo y el hombre es el conjugado glucurónico del *p*-HPPH. Se encontraron cantidades significativas del *p*-HPPH libre en la orina de ratones, ratas y conejos, pero no así en la orina de perro, en donde el principal metabolito fue el conjugado glucurónico del *m*-HPPH. En el gato, el principal metabolito encontrado fue el glucurónico de la fenitoína.<sup>1,9,21</sup>

### 2.3.4. Toxicidad<sup>1,9</sup>

Los efectos tóxicos de la fenitoína dependen de la dosis, de la vía de administración y de la duración de la exposición. Cuando se administra por vía intravenosa a velocidad excesiva, los signos tóxicos más notables son arritmias cardíacas acompañadas o no de hipotensión, o depresión del SNC. Aunque la toxicidad cardíaca se presenta con mayor frecuencia en pacientes ancianos y en los que tienen una cardiopatía comprobada, también puede presentarse en pacientes jóvenes y sanos. La sobredosis por vía oral produce generalmente signos imputables al cerebelo y al sistema vestibular. Los principales efectos tóxicos de la medicación crónica son efectos cerebrovestibulares relacionados con la dosis, pero incluyen también otros efectos sobre el SNC, como cambios en la conducta, mayor frecuencia de las crisis, síntomas gastrointestinales, hiperplasia gingival, osteomalasia y anemia megaloblástica.

### 2.3.5. Concentraciones plasmáticas. <sup>1, 9, 19</sup>

Por lo general se observa buena correlación entre la concentración plasmática total de la fenitoína y el efecto clínico. De éste modo, el control de las crisis se obtiene generalmente con concentraciones mayores de 10µg/mL, y los efectos tóxicos como nistagmo aparecen alrededor de los 20µg/mL. La ataxia se manifiesta con 30 µg/mL y el letargo con 40µg/mL.

### 2.3.6. Interacciones con otros fármacos. <sup>1, 9, 21, 25-27</sup>

Se han reportado numerosas interacciones entre fenitoína y otros fármacos. La mayoría de éstas interacciones son farmacocinéticas e involucran procesos de inducción o inhibición metabólica o interacción en la unión a proteínas. El resultado de éstas interacciones afecta los niveles plasmáticos de la fenitoína o de los otros fármacos.

#### 2.3.6.1. Alteración de la cinética de la fenitoína por otros fármacos. <sup>1, 7, 19-22, 25-30</sup>

Existen muchos fármacos que pueden afectar a la fenitoína. Las determinaciones de los niveles de fenitoína son especialmente útiles cuando se sospecha alguna interacción.

El metabolismo de la fenitoína puede verse alterado por uso concomitante de otros fármacos, por ejemplo: <sup>1, 7, 19-22, 25-30</sup>

- 1) Los barbitúricos aumentan su velocidad de metabolismo.
- 2) Los anticoagulantes cumarínicos, el disulfiram, el cloramfenicol, la cimetidina, la fenilbutazona, la isoniacida y el sulfafenazol inhiben su metabolismo, aumentando las concentraciones séricas del fármaco.

3) Los antidepresivos tricíclicos, a dosis elevadas, pueden precipitar crisis, por lo cual habrá necesidad de un reajuste en la dosis de fenitoína.

El sulfisoxazol, los salicilatos, la fenilbutazona, la tolbutamida y el valproato pueden competir por los sitios de unión a las proteínas plasmáticas.

La carbamazepina, la cual puede aumentar el metabolismo de fenitoína, provoca una disminución en su concentración. Así mismo, la fenitoína reduce la concentración de carbamazepina.<sup>9,26</sup>

La fenitoína incrementa la depuración de la teofilina, y las concentraciones plasmáticas de fenitoína se ven también reducidas cuando los dos fármacos se administran conjuntamente. Ello puede deberse al metabolismo acelerado y/o a la absorción disminuida de la fenitoína.<sup>1, 9, 19, 31</sup>

El fenobarbital aumenta la biotransformación de la fenitoína por inducción del sistema enzimático microsomal hepático, pero también puede disminuir su activación, aparentemente por inhibición competitiva. Además el fenobarbital puede reducir la absorción oral de la fenitoína. A la inversa, la concentración de fenobarbital se ve incrementada por fenitoína.

El etanol tiene efectos similares a los anteriores sobre la inactivación de la fenitoína.<sup>1, 9, 19</sup>

Estudios recientes han demostrado que el felbamato incrementa la concentración de la fenitoína, pudiéndose entonces disminuir la dosis de ésta de un 10 a 30%, al mismo tiempo la fenitoína provoca una disminución en los niveles del felbamato.<sup>29, 30</sup>

El dezimol provoca inhibición enzimática de la fenitoína, aumentando los niveles enzimáticos de ésta, al administrarlos conjuntamente durante cinco semanas.<sup>25</sup>

Otro antiepiléptico que también altera la farmacocinética de la fenitoína es la nafimidona, ésta y su principal metabolito inhiben potentemente el metabolismo de la fenitoína.<sup>28</sup>

### 2.3.6.2. Alteración en la cinética de algunos fármacos, provocada por fenitoína. <sup>1, 7, 19-22, 25-31</sup>

Así como muchos fármacos alteran la farmacocinética de la fenitoína, ésta también modifica la farmacocinética de muchos de ellos.

Una vía común del metabolismo de estos fármacos es la hidroxilación aromática donde la fenitoína es un conocido inductor del sistema del citocromo P-450. <sup>9, 30</sup>

- Analgésicos y antipiréticos.

Después de la administración de fenitoína, el tiempo de vida media del meperidino disminuye de 6.4 a 4.3 hr y el ABC de su metabolito primario se incrementa, por lo que es necesario aumentar las dosis de meperidino cuando éste sea administrado junto con fenitoína. <sup>9</sup>

Los niveles de metadona disminuyen en un 50% en pacientes bajo terapia con fenitoína. Los pacientes presentan signos y síntomas parecidos a los que presentaban antes de que se les hubiera administrado la metadona. En este caso existe una inducción en el metabolismo de la metadona. <sup>1, 9</sup>

La eliminación del acetaminofén y de la antipirina aumenta después de la administración de fenitoína debido al incremento de su biotransformación. <sup>1, 9</sup>

- Agentes antiasmáticos.

El tiempo de vida media de la teofilina se reduce en un 40% y su depuración se incrementa cuando es administrada con dosis de fenitoína de 300 a 400 mg. <sup>1, 9, 31</sup>

- **Antibióticos y antihelmínticos.**

La fenitoína reduce los niveles de cloranfenicol en los pacientes que las reciben conjuntamente. <sup>1,9</sup>

La velocidad de eliminación de la doxiciclina aumenta en pacientes que reciben también fenitoína. <sup>1,9</sup>

Los niveles máximos y el ABC del prazicuantel se reducen durante la coadministración con fenitoína, probablemente por un proceso de inducción metabólica. Se recomiendan dosis de 50 mg/Kg de prazicuantel para aquellos pacientes a los cuales se les tienen que administrar ambos fármacos durante el tratamiento para la neurocisticercosis, para que se produzcan concentraciones efectivas tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo. <sup>32</sup>

- **Anticoagulantes.**

La fenitoína reduce los niveles plasmáticos del dicumarol por lo que es necesario incrementar la dosis de anticoagulante. Sin embargo, las dosis de anticoagulantes generalmente se ajustan de acuerdo al tiempo de protrombina para evitar problemas clínicos, de tal manera que se evitan los problemas por interacción. <sup>1,9,31</sup>

El efecto de la fenitoína sobre la warfarina es variable; en algunos pacientes, la fenitoína incrementa los efectos del anticoagulante, lo cual puede ser explicado por un metabolismo estereoselectivo en los racematos R-S de la warfarina. <sup>1,9</sup>

- **Antidiuréticos.**

La eficacia de la furosemida disminuye al ser administrada junto con fenitoína. Existen evidencias de que la fenitoína reduce la absorción de la furosemida. <sup>1,9</sup>

- **Fármacos cardiotónicos.**

La fenitoína reduce el tiempo de vida media de la quinidina en un 50%, por lo que se requiere aumentar las dosis de quinidina para mantener los niveles efectivos en plasma. El problema potencial de ésta situación es que cuando se suspende la fenitoína, los niveles de quinidina resultan excesivos, pudiendo traer consecuencias fatales. Lo mismo sucede con digoxina.

La fenitoína también acelera la velocidad del metabolismo de la disopiramida, pero en éste caso, el metabolito es farmacologicamente activo, por lo que no ocurren efectos adversos. <sup>1,9, 19</sup>

- **Inmunosupresores.**

La fenitoína reduce la concentración máxima, el ABC, el tiempo de vida media e incrementa el aclaramiento de la ciclosporina, reduciendo como consecuencia su eficacia. <sup>1,9</sup>

- **Otros fármacos antiepilépticos.**

La fenitoína es un potente inductor de la biotransformación de la carbamazepina. Las concentraciones plasmáticas de la carbamazepina se reducen al administrar en conjunto éstos fármacos. <sup>9, 26</sup>

La biotransformación de la primidona se induce por la fenitoína. <sup>20, 22</sup> También se ha reportado que la fenitoína provoca que los niveles de fenobarbital de algunos pacientes aumenten, sin embargo, en la mayoría de los pacientes, los cambios en los niveles plasmáticos de fenobarbital no son significativos y no resulta necesario ajustar las dosis. El mecanismo que actúa en este caso es una inhibición competitiva. <sup>1,9</sup>

Los niveles plasmáticos de valproato disminuyen en un 50% cuando éste es administrado junto con fenitoína. Consecuentemente, los niveles del metabolito hepatotóxico del valproato aumentan pudiendo presentarse efectos secundarios que pueden ir desde envenenamiento agudo (nauseas,

vómito, anorexia, etc.), hasta envenenamiento crónico (perdida de peso, hígado crecido o atrófico, ictericia, etc.), dependiendo de la dosis y la duración de la administración de estos fármacos.<sup>1,9,31</sup>

La fenitoína incrementa los niveles del metabolito farmacológicamente activo de la metosuximida (N-desmetilmetosuximida), durante el tratamiento combinado en pacientes epilépticos.<sup>1,9</sup>

- **Fármacos nuevos o fármacos en etapa experimental.**

Los niveles de fluorazina disminuyen en aquéllos pacientes que reciben terapia múltiple, incluyendo fenitoína.

El aclaramiento, el tiempo de vida media y los niveles plasmáticos de la lamotrigina, disminuyen cuando los pacientes reciben comedición con fenitoína, lo cual nos indica que la fenitoína provoca inducción metabólica. En un estudio dosis única, se demostró que la fenitoína disminuye el tiempo de vida media de la lamotrigina de 24 a 15 hrs cuando éstas se administran conjuntamente.<sup>9</sup>

La cinética de la milacemida no se ve alterada significativamente por la fenitoína. Los niveles de zonizamida se ven disminuídos en los pacientes que reciben comedición con fenitoína.<sup>9</sup>

La fenitoína induce el metabolismo del clobazam y en adición, los niveles de este compuesto se ven disminuídos en contraste con los de su metabolito activo (nor-clobazam), los cuales aumentan al administrarlos conjuntamente.<sup>9</sup>

El tiempo de vida media de eliminación del lorecazol se reduce por inducción de varios fármacos, incluyendo fenitoína. El ABC de la tiagabina se reduce durante la coadministración con fenitoína y también aumenta el aclaramiento de la 10-monohidroxicarbamazepina, el metabolito activo de la oxicarbamazepina.<sup>9</sup>

- Esteroides.

La fenitoína induce considerablemente el metabolismo de la dexametasona, su tiempo de vida media de eliminación se reduce de 3.5 a 1.8 hrs. después de la administración conjunta de estos fármacos. Los niveles efectivos de prednisona y prednisolona se reducen en algunos pacientes, después de la administración de fenitoína.<sup>9</sup>

# **III**

## **Parte**

### **experimental.**

---

---

#### **3.1. Método analítico para la cuantificación de 3-hidroxi-3-etil-fenil propionamida (HEPP)**

##### **3.1.1. Material y equipo.**

- Balanza analítica Ohaus, modelo AS200
- Centrífuga Eppendorf, modelo 5416.
- Agitador Vortex Thermolyne, modelo 37600.
- Potenciómetro Orion, modelo 290A.
- Agitador horizontal Kline, modelo 225.
- Cromatógrafo de líquidos Beckman System Gold, equipado con:
  - Detector UV-Vis, modelo 166
  - Inyector automático, modelo 507.
  - Bomba, modelo 116

### **3.1.2.Reactivos.**

- Albúmina bovina (Sigma, lote 119F9300).
- Hidróxido de sodio R.A. (Baker, lote 3722-01).
- Fosfato de potasio monobásico R.A. (Baker, lote 3246-01).
- Metanol R.A (Baker, lote 9093-03)
- Acetonitrilo HPLC (Mallinckrodt, lote 2856KPHY)
- Diclorometano R.A. (Merck, lote 2342645)
- Agua destilada, desionizada y filtrada.
- Plasma humano libre de pirógenos y certificado de pruebas de VDRL, VIH, factor Rh y grupo sanguíneo, donado por el INNN.

### **3.1.3.Estándares.**

- Estándar secundario de 3-hidroxi-3-etil-fenilpropionamida (HEPP), Armstrong (México).
- Estándar secundario de 2-hidroxi-2-etil-2 fenilacetamida (HEPA), Armstrong (México).

### **3.1.4.Soluciones**

- Solución de hidróxido de sodio 2.0M.

Pesar 8.2 g de hidróxido de sodio R.A., disolver y aforar a 100 mL con agua destilada.

→ Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 8.

Pesar 1.4 g de fosfato de potasio, disolver y aforar a 100 mL con agua grado HPLC. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 0.8M.

→ Solución de hidróxido de sodio 0.8M.

Pesar 3.3 g de hidróxido de sodio R.A., disolver y aforar a 100 mL con agua destilada.

→ Solución de albúmina bovina al 0.01%.

Pesar 0.01 g de albúmina bovina, disolver y aforar a 100 mL con agua grado HPLC.

### ***3.1.5. Preparación de los estándares de referencia***

→ Solución estándar de D,L-2-hidroxi-2-etil-2-fenilacetamida (HEPA: estándar interno) en MeOH.

Pesar 1.0 mg de HEPA, disolver y aforar a 10 mL con metanol HPLC para obtener una concentración de 100 µg/mL.

→ Solución estándar de D,L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP) en plasma, solución amortiguadora de fosfatos o albúmina bovina.

Pesar 1.0 mg de HEPP y depositarlo en un matraz volumétrico de 1 mL, disolver y aforar con metanol HPLC (conc.=1000 µg/mL). De la solución anterior transferir con micropipeta 200 µL a un matraz volumétrico de 2.0 mL y aforar al volumen con metanol R.A, plasma o albúmina bovina al 0.01%, según sea el caso, para obtener una concentración final de 100 µg/mL.

### **3.1.6. Preparación de la curva patrón de HEPP.**

De la solución de 100 µg/mL tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=50 µg/mL), de la solución anterior tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=25 µg/mL), de esta solución tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=12.5 µg/mL), de la solución anterior tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=6.25 µg/mL), de esta solución tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=3.12 µg/mL), de la solución anterior tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=1.56 µg/mL), de esta solución tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* (conc.=0.78 µg/mL), de esta última solución tomar 1 mL y aforar a 2 mL con metanol R.A, plasma o albúmina\* para obtener una concentración final de 0.39 µg/mL.

\*Para cada una de las soluciones utilizar albúmina bovina al 0.01%.

### **3.1.7. Método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma y albúmina.**

El método analítico utilizado para la cuantificación de HEPP en plasma y albúmina bovina, fue el reportado por Gómez L y cols.<sup>3</sup>

Las muestras biológicas de albúmina bovina y plasma se prepararon como a continuación se especifica: A 0.5 mL de plasma o albúmina bovina al 0.01% se le añadieron 50 µL de estándar interno (E.I.) de HEPA (100 µg/mL), 0.5 mL de solución de hidróxido de sodio 2.0 M, 0.5 mL de sol.

amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 8 y 5 mL de diclorometano R.A. y se agitó a 80 rpm durante 15 min. Una vez terminado este proceso la muestra se centrifugó a 1650g durante 15 min. Después de centrifugar se separó la fase orgánica y se evaporó en baño maría a 40°C bajo corriente de nitrógeno. La muestra se reconstituyó con 200  $\mu$ L de fase móvil y se inyectaron 100  $\mu$ L al cromatógrafo. En la figura 3 se presenta el diagrama correspondiente a la preparación de las muestras.

### **3.1.8. Condiciones cromatográficas.**

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

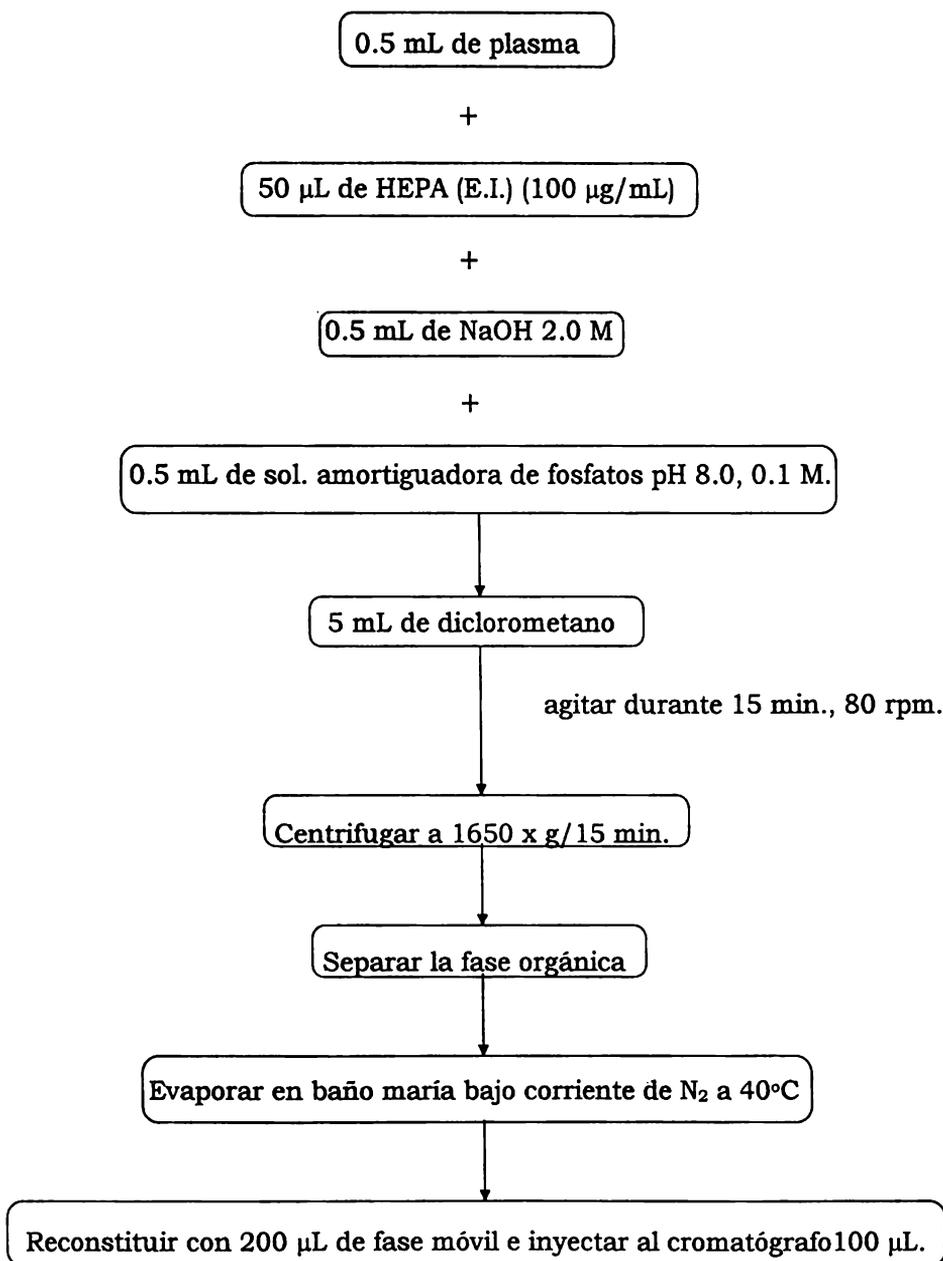
→Columna de octadecil silano C<sub>18</sub> de 200 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro y tamaño de partícula de 5 $\mu$ . Spherisorb.

→Fase móvil: Acetonitrilo-Agua (25:75 v/v)

→Flujo: 0.8 mL/min.

→Longitud de onda: 219 nm.

→Sensibilidad del detector: 2.0 auf



**Figura 3.** Diagrama para la cuantificación de HEPP en muestras plasmáticas o albúmina.

### **3.1.9. Validación del método analítico.**

Los parámetros seleccionados para la validación del método analítico fueron los siguientes:

#### **3.1.9.1. Selectividad.**

Con el fin de observar si los compuestos endógenos interferían en la determinación de HEPP o su estándar interno HEPA, se prepararon, por duplicado y en forma individual, muestras de plasma blanco (sin fármaco), así como muestras conteniendo HEPP, HEPA y fenitoína. Las muestras se analizaron de acuerdo a lo especificado en la sección 3.1.7.

#### **3.1.9.2. Linearidad.**

Para determinar si la respuesta (dada por la relación de alturas HEPP/HEPA) era lineal, se prepararon 3 curvas patrón en plasma en el intervalo de concentraciones de 0.78-100 $\mu$ g/mL y 3 curvas en albúmina bovina en el intervalo de concentraciones de 0.39-100 $\mu$ g/mL, de acuerdo a lo especificado en la sección 3.1.6. El análisis de las muestras se llevó a cabo de acuerdo a lo especificado en la sección 3.1.7. Para cada curva se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente ( $b$ ) y la ordenada al origen ( $a$ ).

#### **3.1.9.3. Exactitud.**

Se preparó por triplicado la curva de HEPP en plasma y en albúmina bovina en el rango de concentraciones antes mencionado, de acuerdo a la sección 3.1.6. Al mismo tiempo se prepararon tres curvas estándar en

metanol a las mismas concentraciones y se determinó el rendimiento en la extracción a cada concentración, así como el coeficiente de variación.

#### **3.1.9.4. Repetibilidad.**

El parámetro se evaluó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se prepararon 3 curvas patrón de HEPP en los intervalos de concentraciones antes mencionados, tanto en plasma como en albúmina bovina, siguiendo el procedimiento descrito en 3.1.6. y se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por ciento de los resultados obtenidos.

#### **3.1.9.5. Reproducibilidad.**

Este parámetro se evaluó en dos días de trabajo continuos, variando solo el analista y conservando condiciones de equipo y laboratorio. Se prepararon 3 curvas patrón de HEPP por cada analista, en los intervalos de concentraciones antes mencionados, tanto en plasma como en albúmina bovina, siguiendo el procedimiento descrito en 3.1.6. Se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación por ciento. Se efectuó un análisis de varianza de dos factores (ANADEVA) con una  $p = 0.05$ , para los resultados obtenidos por cada analista.

#### **3.1.9.6. Estabilidad.**

La estabilidad del HEPP en plasma, tanto a temperatura ambiente, refrigeración y ciclos congelación-descongelación, fue reportado anteriormente<sup>3</sup> como de 1 semana a temperatura ambiente, 1 semana en refrigeración y 1 mes bajo ciclos congelación-descongelación, por lo que no se consideró necesario realizar este parámetro de nuevo.

## **ESTUDIO No. 1**

### **3.2. Unión de HEPP a proteínas plasmáticas.**

#### **3.2.1. Método analítico para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales.**

El método analítico utilizado para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales fue el reportado por Guerci y cols.<sup>33</sup>

##### **3.2.1.1. Material y Equipo.**

- Agitador Vortex Thermolyne Modelo M37615
- Espectrofotómetro Beckman Modelo DU-68.

##### **3.2.1.2. Reactivos.**

- Albúmina bovina (Sigma, lote 79F9303)
- Sulfato de cobre R.A. (J.B.Baker, lote E16348)
- Tartrato de sodio y potasio R.A. (J.B. Baker, lote M36186)
- Cloruro de sodio R.A. (Mallinckrodt, lote 7581 KEAK)
- Yoduro de potasio R.A. (Mallinckrodt, lote 7536 KEBK)
- Hidróxido de sodio R.A. (Mallinckrodt, lote 7708 KEVC)
- Ácido clorhídrico R.A. (J.B.Backer, lote F31454)
- Fenofaleína.

### **3.2.1.3. Preparación de soluciones.**

→ Solución patrón de proteína.

Pesar 0.07 g de albúmina bovina y colocarla en un matraz volumétrico de 10 mL, agregar 5 mL de agua destilada hasta disolver y llevar al aforo (conc.= 0.007 g/mL).

→ Reactivo de Biuret.

Sulfato de cobre	1.5 g
Tartrato de sodio y potasio	6.0 g
Yoduro de potasio	1.0 g
Hidróxido de sodio 2.5 N	

En un matraz volumétrico de 1000 mL colocar el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio, agregar 500 mL de agua destilada y agitar a disolución. Agregar, bajo agitación constante, 300 mL de hidróxido de sodio 2.5N previamente titulado y mezclar. Agregar yoduro de potasio y agitar hasta disolución. Aforar y conservar en frasco obscuro.

→ Solución salina al 0.85%.

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio, colocarlo en un matraz de 1000 mL, agregar 500 mL de agua destilada, disolver y llevar al aforo.

### **3.2.1.4. Preparación de la curva patrón para cuantificar proteínas plasmáticas.**

La preparación de la curva se resume en la tabla 2.

**Tabla 2.** Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales.

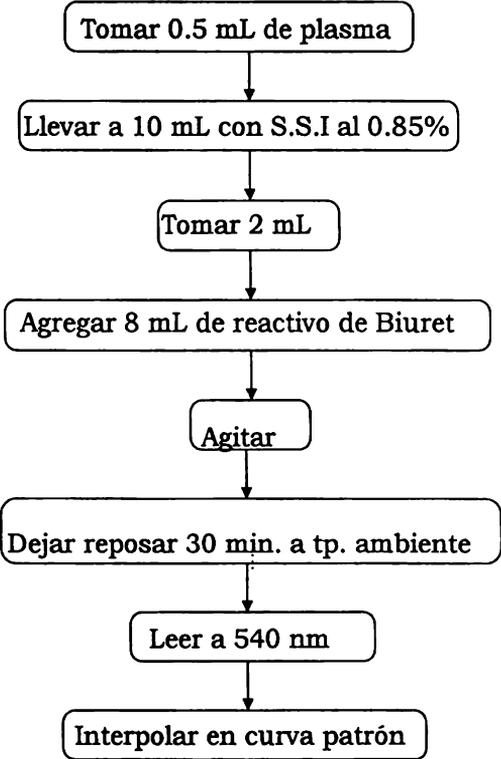
<b>Tubo No.</b>	<b>Sol.salina al 0.85%(mL)</b>	<b>mL de sol. patrón de proteína (7 g/100 mL).</b>	<b>Concentración de proteínas (g/100 mL)</b>
1	2.0	0	0 (bco)
2	1.7	0.3	2.1
3	1.5	0.5	3.5
4	1.2	0.8	5.6
5	1.0	1.0	7.0
6	0.7	1.3	9.1
7	0.5	1.5	10.5
8	0.0	2.0	14.0

Una vez preparada la curva, a cada tubo se agregaron 8 mL de reactivo de Biuret y se mezcló en vortex 30 s. Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm.

### **3.2.1.5. Método analítico.**

Se tomaron 0.5 mL de plasma, se colocaron en un tubo y se llevó a 10 mL con solución salina al 0.85%. De la solución anterior se tomaron 2 mL, se colocaron en un tubo y se le agregaron 8 mL de reactivo de biuret, se agitaron en vortex 30 s y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro en la región del

visible a una longitud de onda de 540 nm y los resultados se interpolaron en la curva patrón de la sección 3.2.1.4. En la figura 4 se presenta el diagrama correspondiente a la preparación de las muestras.



**Figura 4.** Diagrama de flujo para la cuantificación de proteínas plasmáticas totales en muestras.

Dado que este método fue validado anteriormente para realizar otro estudio, los resultados correspondientes a esta validación se omitirán. <sup>62</sup>

### **3.2.2. Estudios de unión a proteínas “in vitro”.**

#### **3.2.2.1. Material y equipo.**

→ Aparato dializador Spectrum 5-Cell Equilibrium Dialyzers, modelo 132360, que consta de :

5 celdas de teflón.

6 separadores metálicos.

Motor de rotación.

Base de dializador.

15 tapones para las celdas.

Agujas sin punta.

→ Jeringas de 1 mL.

→ Membranas Spectra/Por Dialysis No.2, MWCO:12-14,000, 200 X 200 mm, lote 132686.

→ Baño de agua Imperial IV

→ Termómetro.

→ Pinzas para las membranas sin punta.

#### **3.2.2.2. Reactivos.**

→ Fosfato de potasio monobásico, R.A.(Mallincrodt, lote 7100 KJBR)

→ Etanol R.A. (Merck).

→ Hidróxido de sodio R.A.(Mallincrodt, lote 7708 KCCCK)

→ Agua destilada, desionizada y filtrada.

### **3.2.2.3. Preparación de soluciones.**

→ Solución amortiguadora de fosfatos 0.064 M, pH 7.4.

Pesar 1.74 g de fosfato de potasio, disolver y aforar a 1000 mL con agua desionizada. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.8 M.

### **3.2.2.4. Estudios “in vitro”.**

#### **3.2.2.4.1. Tiempo de equilibrio.**

Para encontrar el tiempo de equilibrio óptimo se inyectó, del lado de la celda con mayor grosor, 1 mL de plasma añadido de HEPP a una concentración 50 µg/mL; del lado de la celda con menor grosor se inyectó 1 mL de sol. amortiguadora de fosfatos 0.064M pH 7.4 y se dejó dializar en baño de agua a 37°C y 30 rpm. Puesto que el equipo consta de cinco celdas, en la primera corrida se tomaron muestras a los 5, 10, 20, 30 y 60 min (una muestra por celda). En una segunda corrida se tomaron muestras a los 90, 120, 180, 240 y 360 min. Las muestras se analizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.7.

#### **3.2.2.4.2. Determinación de la unión del HEPP a la membrana de diálisis.**

Para determinar si el HEPP se unía en cierto grado a la membrana, se inyectaron al dializador muestras de 1 mL de sol. amortiguadora de fosfatos añadido de HEPP de concentración 50 µg/mL y se pusieron a dializar frente a 1 mL de sol. amortiguadora de fosfatos pH 7.4 blanco, durante el tiempo de equilibrio determinado en la sección 3.5.4.1, 37°C y 30 rpm. Las muestras se analizaron según lo descrito en la sección 3.1.7.

#### 3.2.2.4.3.Integridad de la membrana.

La integridad de la membrana tanto frente a plasma como a albúmina se determinó dializando muestras de 1 mL de estos fluidos contra 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 durante 3.0 h (tiempo de equilibrio). Al final de la diálisis se determinó si existía proteína del lado del buffer utilizando el método de Biuret.

#### 3.2.2.4.4.Determinación del volumen de Shift o volumen desplazado.

Para determinar el volumen desplazado se dializaron muestras de 1 mL tanto de albúmina como de plasma frente a 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 durante 3.0 h. Al final de la diálisis se cuantificó la cantidad de proteína del lado del plasma por el método de Biuret y se comparó con la concentración de proteína encontrada en el plasma antes de la diálisis (blanco) efectuándose lo mismo en el caso de la albúmina.

#### 3.2.2.4.5.Grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas.

El grado de unión a proteínas plasmáticas se obtuvo dializando 5 muestras de 1 mL de plasma añadido de HEPP de concentraciones 6.125, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , frente a 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.4 durante 3 horas. El aparato se mantuvo a 37°C y 30 rpm. Una vez dializadas las muestras se analizaron ambos compartimientos (tanto la solución como el plasma), interpolando la respuesta en curvas hechas en solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4 o plasma, utilizando el método descrito en la sección 3.1.7. Este procedimiento se realizó por quintuplicado.

### 3.2.2.4.6. Grado de unión de HEPP a albúmina.

Para determinar el grado de unión a albúmina se prepararon 5 muestras de albúmina a las cuales se les añadió HEPP a concentraciones de 6.125, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL. De cada una de las muestras se tomó 1 mL y se dializaron frente a 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.4 durante 3 horas, 37°C y 30 rpm. Una vez dializadas las muestras se analizaron ambos compartimientos (tanto la solución como la albúmina), interpolando la respuesta en curvas hechas en solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4 o plasma, utilizando el método descrito en la sección 3.1.7. Este procedimiento se realizó por quintuplicado.

Con los resultados obtenidos se realizaron las siguientes gráficas para obtener la constante de asociación y los sitios de unión: gráfica directa, gráfica de la doble recíproca, gráfica de Scatchard y gráfica tipo Woolf.

## **ESTUDIO No. 2.**

### **3.3. Interacción farmacocinética entre HEPP y fenitoína (DFH).**

#### **3.3.1. Fármacos administrados.**

→ Hidantoína, solución inyectable (Rudelsa, lote 600743), en las que cada 5 mL contienen 250 mg de fenitoína. A cada conejo le fueron administrados 30 mg/Kg de peso de DFH.

→ HEPP en solución salina isotónica. Para cada conejo se preparó una solución de concentración correspondiente a su peso (15 mg/Kg de peso).

### **3.3.2. Sujetos de estudio.**

Se eligieron como sujetos de estudio a 9 conejos macho raza Nueva Zelanda con peso de 3.0-5.0 Kg. Los conejos se encontraban en buen estado de salud y no se les había administrado ningún otro medicamento por lo menos 1 mes antes del estudio. Los animales se mantuvieron bajo ciclos luz-obscuridad de 12 h.

### **3.3.3. Diseño experimental del estudio.**

El diseño experimental utilizado en el estudio fue un diseño de bloques incompletos balanceado al azar, de tres secuencias y dos periodos, con niveles de dosificación preestablecidos y un intervalo de lavado entre periodos de cuatro semanas. Los conejos fueron asignados aleatoriamente a cada una de las tres secuencias. La aleatorización fue balanceada en grupos de 3 conejos cada uno.

El grupo A en el periodo I, recibió una dosis de 30 mg/Kg de peso de DFH solución inyectable (Hidantoína) i.p., cada 12 hrs, durante 5 días con el fin de alcanzar el estado estacionario. Durante el segundo periodo el grupo A recibió el mismo tratamiento con DFH vía i.p. pero, en el sexto día, inmediatamente después de la última administración de DFH, se administró HEPP vía i.v., en una dosis única de 15 mg/Kg de peso.

Al grupo B en el periodo I se le administró solución salina isotónica vía i.p., cada 12 hrs, durante 5 días. En el sexto día, después de la última administración de solución salina isotónica, se administró HEPP vía i.v., a una dosis única de 15 mg/Kg de peso. En el segundo periodo, el grupo B recibió una dosis de 30 mg/Kg de peso de DFH solución inyectable i.p., cada 12 hrs., durante 5 días con el fin de alcanzar el estado estacionario.

El grupo C en el periodo I, recibió una dosis de 30 mg/Kg de peso de DFH vía i.p. y el sexto día, después de la última dosis, se administró inmediatamente HEPP vía i.v., en una dosis única de 15 mg/Kg de peso. Durante el segundo periodo, se administró solución salina isotónica vía i.p., cada 12 hrs, durante 5 días y en el sexto día, se administró HEPP vía i.v., en una dosis única de 15 mg/Kg de peso.

El diseño experimental se resume en la tabla 3.

**Tabla 3.** Diseño de bloques incompleto balanceado utilizado para el estudio.

SECUENCIA	SUJETO	PERIODO			
		I	II		
A	3	DFH	L A V A D O	DFH + HEPP	
	7				
	6				
B	2	HEPP		L A V A D O	DFH
	1				
	5				
C	9	DFH + HEPP	L A V A D O		HEPP
	4				
	8				

**3.3.4. Horario de toma de muestra.**

Las muestras sanguíneas se obtuvieron introduciendo un catéter corto del No. 22 en la vena marginal de cada conejo y adaptado a este una llave de 3 vías, a través de la cual se obtuvieron cada una de las muestras.

En la mañana del sexto día, inmediatamente después de la última administración de DFH (para las secuencias A y C, periodo I y secuencias A y B, periodo II), se tomaron 3 mL de sangre de la vena marginal de cada conejo (considerado como tiempo 0) y se colectaron en tubos conteniendo EDTA al 7.5%. Posteriormente, el tiempo de muestreo se siguió de acuerdo a lo indicado en la tabla 4.

Para la secuencia B, periodo I y secuencia C, periodo II la muestra blanco se tomó inmediatamente después de la última administración de solución salina isotónica y posteriormente se siguió el horario presentado en la tabla 4.

**Tabla 4.** Tiempo de muestreo para cada fármaco y para la administración conjunta de éstos (volumen colectado: 3 mL).

<b>GRUPO</b>	<b>TIEMPOS (h)</b>
DFH	0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 12.0 y 24.0
HEPP	0, 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0 y 10.0
DFH + HEPP	0.0, 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 24.0

El plasma fue obtenido por centrifugación de las muestras a 3000 rpm durante 15 min. y se almacenó en tubos de vidrio limpios y etiquetados, manteniendolos en congelación a -5°C para el análisis de HEPP y a 5°C para el análisis de DFH.

### **3.3.5. Análisis de las muestras.**

Los niveles plasmáticos de DFH se determinaron utilizando un método de inmunoanálisis enzimático homogéneo (EMIT) previamente validado, usando para ello un kit para análisis de fenitoína (Syva Company, lote 6B009 UL-H1A). El método es específico para fenitoína y no detecta sus metabolitos.<sup>63, 64</sup>

Los niveles plasmáticos de HEPP se determinaron por el método de cromatografía líquida de alta resolución descrito en la sección 3.1.7

### **3.3.6. Análisis estadístico del estudio de interacción.**

Los parámetros farmacocinéticos de área bajo la curva de concentración plasmática de cero al último tiempo ( $ABC_{0 \rightarrow t}$ ) y de cero a infinito ( $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ ), vida media de la fase de eliminación beta ( $t_{1/2\beta}$ ), tiempo medio de residencia (TMR), concentración plasmática al tiempo cero ( $C_p^0$ ), aclaramiento plasmático total (Cl), volúmen aparente de distribución en el estado estacionario ( $V_{dee}$ ), volúmen aparente de distribución de área ( $V_{d\beta}$ ) y volúmen aparente de distribución en el compartimento central ( $V_c$ ) para cada conejo se determinaron utilizando el paquete PCNONLIN 4.0.

Los análisis estadísticos empleados fueron las pruebas de análisis de varianza (ANADEVA) y prueba de t-Student pareada y no pareada, utilizando para ello los paquetes estadísticos ORIGIN y SIGMA STAT.

# **IV**

## ***Resultados y discusión de resultados.***

---

---

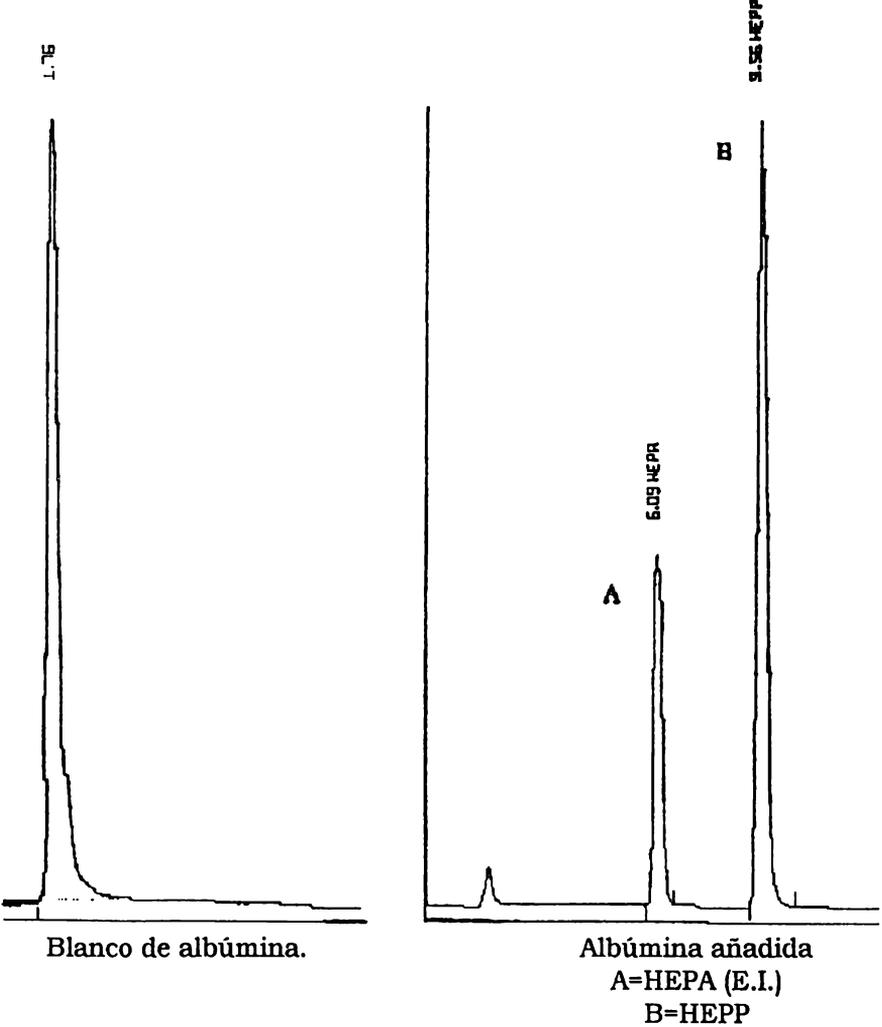
### **4.1. Validación del método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma y albúmina bovina.**

La validación del método analítico resulta esencial para cualquier tipo de estudios clínicos, ya que mediante este tipo de pruebas se evalúa si el método cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. Los criterios para la validación del método analítico se basaron en las recomendaciones y lineamientos especificados por diferentes organismos internacionales <sup>34, 35, 54</sup> y los resultados obtenidos fueron los siguientes.

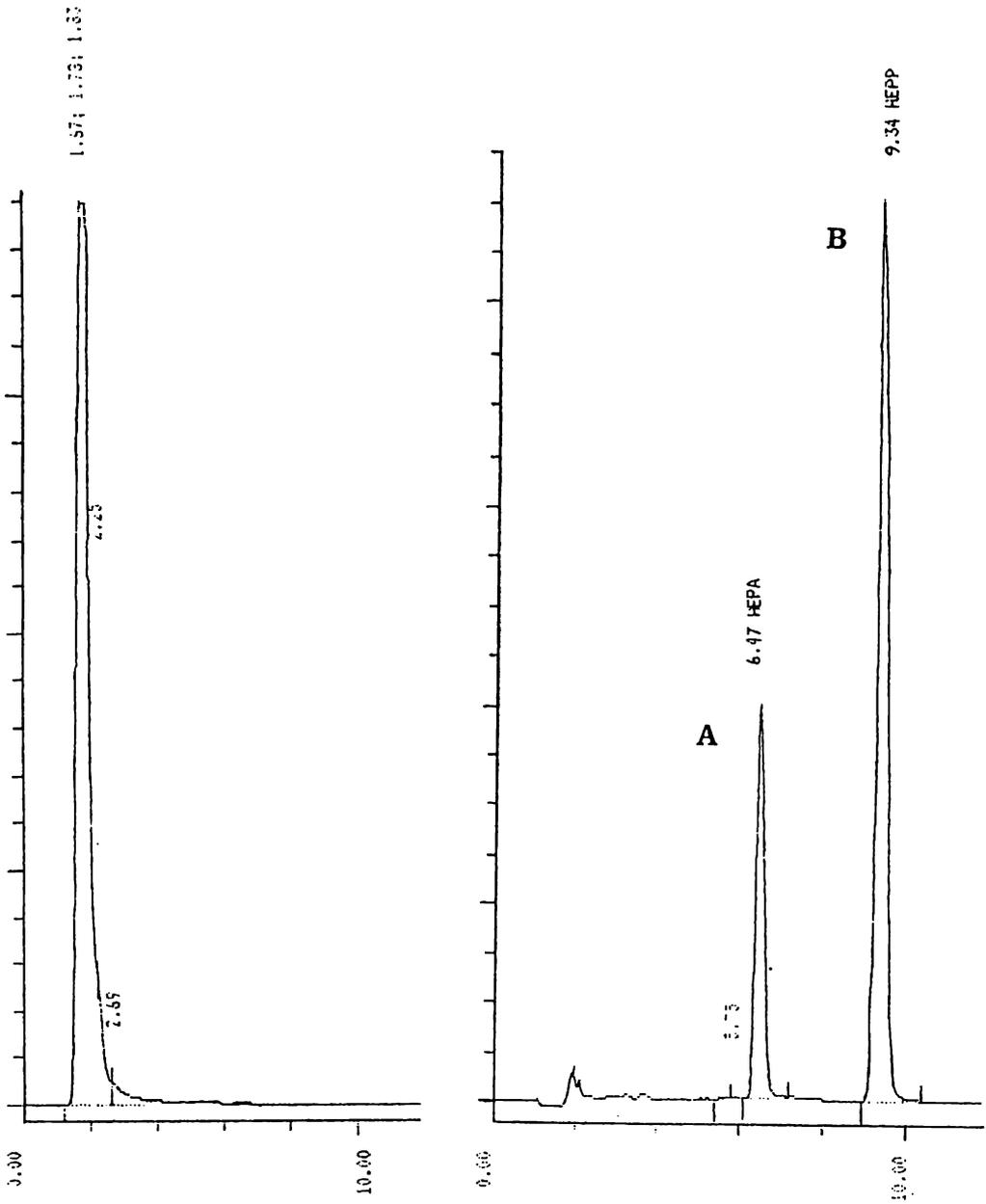
#### **4.1.1. Selectividad.**

En las figuras 5 y 6 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar muestras blanco de plasma y albúmina bovina, así como las muestras plasmáticas y de albúmina añadidas con HEPP, estándar interno

(E.I) y fenitoína. En ellas se puede observar que la albúmina bovina comercial no presenta ninguna interferencia. En el plasma tampoco se observaron componentes endógenos que interfirieran en la cuantificación del HEPP o del estándar interno, HEPA. Al utilizar este método, es posible que la fenitoína no pueda extraerse, ya que no se encontró ningún pico de interferencia durante el tiempo que duró la corrida, por lo que el método se consideró selectivo.



**Figura 5.** Selectividad del método analítico para la cuantificación de HEPP en albúmina.



Blanco de plasma.

Plasma añadido de HEPP, HEPA y fenitoína.

A=HEPA (E.I.)

B=HEPP

**Figura 6.** Selectividad del método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma.

**4.1.2. Linealidad.**

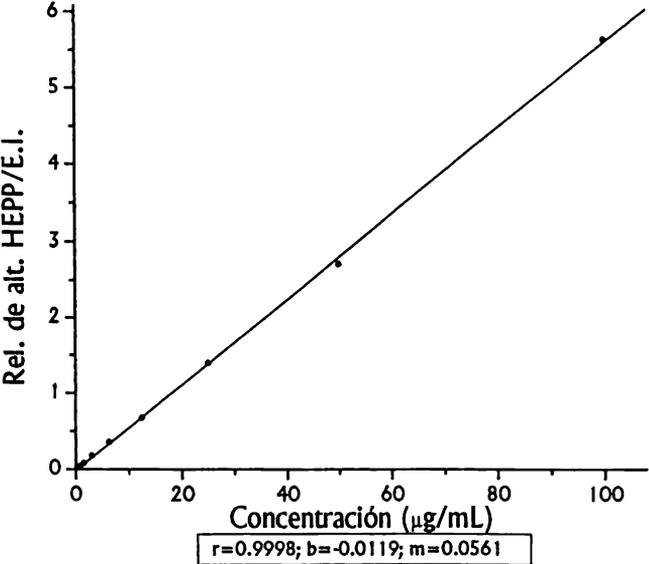
En la figura 7 se presentan los valores promedio de la relación de alturas de las tres curvas preparadas para plasma en el intervalo de concentraciones de 0.39 a 100 µg/mL de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.6., con la cual se encontró la siguiente ecuación:

$$y = 0.0561 \cdot x + 0.0119 \quad r = 0.9998 \quad r^2 = 0.9996$$

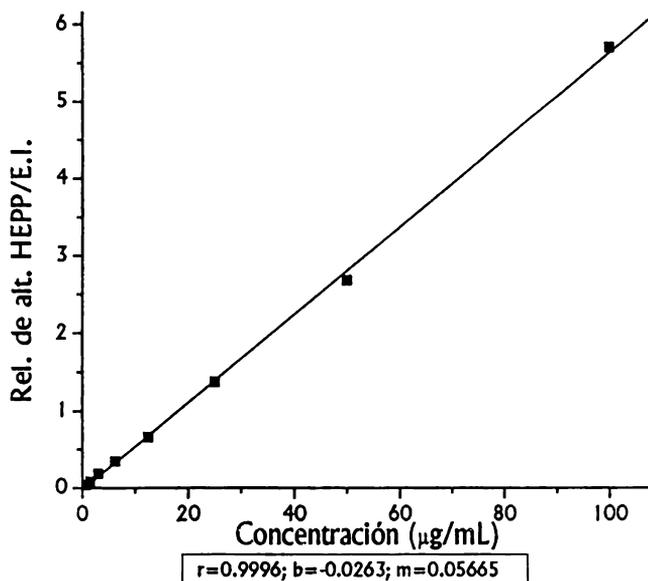
En cuanto al promedio de tres curvas preparadas en albúmina en el intervalo de concentraciones de 0.78 a 100 µg/mL (figura 8), se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 0.0567 \cdot x + 0.0263 \quad r = 0.9996 \quad r^2 = 0.9992$$

Con base en los resultados anteriores se consideró que el método para cuantificar HEPP tanto en plasma como en albúmina presenta buena linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado.



**Figura 7.** Linealidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.



**Figura 8.** Linealidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en albúmina.

#### **4.1.3.Exactitud.**

La exactitud del método evaluada como el porcentaje de recobro del fármaco después del proceso de extracción comparado con la respuesta obtenida del sistema (HEPP en metanol sin realizar extracción) se muestra en las tablas 5 y 6. El rendimiento promedio de extracción en plasma fue del 96.79% y del 97.03% para albúmina. El coeficiente de variación promedio fue del 4.31% en plasma y del 4.29% en albúmina. Los intervalos de confianza determinados a partir de los resultados obtenidos fueron los siguientes:  $92.09\% < X < 101.48\%$  para plasma y  $92.34\% < X < 101.73\%$  para albúmina.

A partir de los resultados obtenidos el método se consideró exacto.

**Tabla 5.** Exactitud del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma (n= 3).

Conc.(µg/mL)	Relación de alturas en MeOH	Relación de alturas en plasma.	% de extracción	C.V.%
0.3906	0.02172	0.01992	91.71	5.59
0.7813	0.04319	0.03990	92.38	5.23
1.5625	0.08652	0.08276	95.65	4.98
3.125	0.18488	0.17813	96.35	4.74
6.25	0.36565	0.35475	97.02	4.17
12.5	0.67168	0.67531	100.54	3.37
25	1.42955	1.40296	98.14	3.54
50	2.73741	2.70922	98.97	3.69
100	5.61676	5.63519	100.33	3.47

% de extracción promedio = 96.79%

**Tabla 6.** Exactitud del método analítico para cuantificar HEPP en albúmina (n=3).

Conc.(µg/mL)	Relación de alturas en MeOH.	Relación de alturas en albúmina.	% de extracción	C.V.%
0.7813	0.04319	0.04084	94.56	5.05
1.5625	0.08652	0.08337	96.36	4.96
3.125	0.18488	0.17798	96.27	4.56
6.25	0.36565	0.34382	94.03	4.94
12.5	0.67168	0.66614	99.18	4.17
25	1.42955	1.37688	96.32	3.83
50	2.73741	2.68294	98.01	3.41
100	5.61676	5.70320	101.54	3.37

% de extracción promedio = 97.03%

#### **4.1.4. Repetibilidad.**

En las tablas 7 y 8 se muestran los coeficientes de variación obtenidos después de analizar 3 curvas en los intervalos de concentraciones estudiados, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.7. Se puede observar que ninguno de los coeficientes de variación fue mayor

del 10% tanto en albúmina bovina como en plasma. El límite de variación permitido para considerar repetible un método analítico en fluidos biológicos es del 15%<sup>40-41</sup>, por lo que el método se consideró preciso.<sup>34, 35, 54</sup>

**Tabla 7.** Repetibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.

Conc (µg/mL)	Rel. de alturas 1.	Rel. de alturas 2	Rel. de alturas 3.	Rel. de alturas $\bar{X}$	D.S.	C.V. %
0.3906	0.01917	0.02009	0.02092	0.02006	0.0009	4.37
0.7813	0.03833	0.04017	0.04181	0.04010	0.0017	4.34
1.5625	0.08519	0.08016	0.08203	0.08246	0.0025	3.08
3.125	0.19315	0.18118	0.17895	0.18443	0.0076	4.14
6.25	0.38095	0.36250	0.37488	0.37278	0.0094	2.52
12.5	0.65966	0.67212	0.68469	0.67215	0.0125	1.86
25	1.34731	1.41328	1.39684	1.38581	0.0343	2.48
50	2.70527	2.67713	2.73832	2.70691	0.0306	1.13
100	5.41936	5.53230	5.79479	5.58215	0.1926	3.45

**Tabla 8.** Repetibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en albúmina.

Conc. (µg/mL)	Rel. de alturas 1.	Rel. de alturas 2	Rel. de alturas 3.	Rel. de alturas $\bar{X}$	D.S.	C.V. %
0.7813	0.03864	0.03908	0.04192	0.03988	0.0017	4.46
1.5625	0.08237	0.08169	0.08519	0.08308	0.0018	2.23
3.125	0.17448	0.17814	0.16727	0.17330	0.0055	3.19
6.25	0.34699	0.36528	0.35657	0.35628	0.0091	2.57
12.5	0.67118	0.68606	0.65719	0.67148	0.0144	2.15
25	1.43945	1.36888	1.39609	1.40147	0.0355	2.54
50	2.63705	2.73154	2.64743	2.67201	0.0518	1.94
100	5.66616	5.58694	5.75827	5.67046	0.0857	1.51

$\bar{X}$  = Promedio

#### 4.1.5. Reproducibilidad.

La reproducibilidad se evaluó de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1.9.5. y los resultados se presentan en las tablas 9 y 10.

**Tabla 9.** Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma.

	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relación de alturas Analista 1		Relación de alturas Analista 2		C.V. %
	0.3906	0.02012	0.02040	0.01887	0.01989	3.3642
<b>D</b>	0.7813	0.03988	0.04047	0.03773	0.03978	3.0307
<b>I</b>	1.5625	0.07869	0.07987	0.08319	0.08299	2.7755
<b>A</b>	3.125	0.15761	0.16871	0.16598	0.17091	3.5114
	6.25	0.34064	0.36096	0.37480	0.37231	4.2992
	12.5	0.69514	0.69852	0.72363	0.68408	2.3853
<b>1</b>	25	1.43049	1.45167	1.34781	1.40456	3.1869
	50	2.67600	2.78649	2.70603	2.61985	2.5762
	100	5.59328	5.67453	5.43090	5.48802	1.9574
	0.3906	0.01983	0.01888	0.01942	0.01965	2.1206
<b>D</b>	0.7813	0.03926	0.03796	0.03896	0.03940	1.6706
<b>I</b>	1.5625	0.07994	0.08077	0.08061	0.08088	0.5233
<b>A</b>	3.125	0.17353	0.16114	0.16571	0.16692	3.0669
	6.25	0.37810	0.34523	0.36451	0.35950	3.7519
	12.5	0.67816	0.66525	0.69898	0.68262	2.0441
<b>2</b>	25	1.36130	1.39926	1.37987	1.41850	1.7743
	50	2.73631	2.72838	2.70611	2.71157	0.5193
	100	5.78299	5.64931	5.60239	5.60395	1.5028

**Tabla 10.** Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación del HEPP en albúmina.

	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relación de alturas Analista 1		Relación de alturas Analista 2		C.V. %
	0.7813	0.04084	0.04257	0.03978	0.03940	3.4913
<b>D</b>	1.5625	0.08337	0.08115	0.08299	0.08088	1.5401
<b>I</b>	3.125	0.17798	0.17384	0.17091	0.16692	2.7093
<b>A</b>	6.25	0.34382	0.33510	0.37231	0.35950	4.6860
	12.5	0.66614	0.64905	0.68408	0.68262	2.4514
	25	1.37688	1.35476	1.40456	1.41850	2.0500
<b>1</b>	50	2.68294	2.61291	2.61985	2.71157	1.8149
	100	5.70320	5.57093	5.48802	5.60395	1.5837
	0.7813	0.03914	0.04081	0.03796	0.04047	3.3001
	1.5625	0.08572	0.08323	0.08077	0.07987	3.1933
<b>D</b>	3.125	0.18407	0.17603	0.16114	0.16871	5.6975
<b>I</b>	6.25	0.35264	0.34372	0.34523	0.36096	2.2556
<b>A</b>	12.5	0.69111	0.65825	0.66525	0.69852	2.8806
	25	1.41357	1.36231	1.39926	1.45167	2.6265
<b>2</b>	50	2.75333	2.68259	2.72838	2.78649	1.5990
	100	5.85445	5.68422	5.64931	5.67453	1.6396

Dado que ninguno de los coeficientes de variación fue mayor del 10% (comparando los resultados de relación de alturas entre dos analistas en dos días diferentes), en el intervalo de concentraciones estudiado tanto para albúmina bovina como para plasma, el método analítico se consideró reproducible. De igual forma, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las fuentes de variación de analista o de día, al aplicar un análisis de varianza (ANADEVA) con una  $p < 0.05$ .

De acuerdo a los resultados obtenidos el método resultó ser, lineal en un intervalo de 0.3906-100  $\mu\text{g/mL}$ , selectivo, exacto, repetible y reproducible, por lo que se consideró adecuado para ser utilizado en la cuantificación de HEPP en muestras plasmáticas, así como para los estudios de unión a proteínas y de interacción farmacocinética.

### **ESTUDIO No. 1.**

#### **4.2. Estudios de unión a proteínas “in vitro”.**

##### ***4.2.1. Factores evaluados antes de realizar la unión a proteínas.***

Existen algunos factores que influyen directamente en la determinación del grado de unión a proteínas al utilizar la técnica de dialisis al equilibrio, los cuales deben ser evaluados antes de empezar el estudio y cuya importancia ha sido señalada por varios autores. Los resultados de la evaluación de estos factores se presentan a continuación.

5-8, 36-41

4.2.1.1. Tiempo de equilibrio.

El tiempo de equilibrio se obtuvo siguiendo los lineamientos descritos en la sección 3.2.2.4.1. En la figura 9 se puede observar que la meseta de la gráfica inicia a los 180 min., lo cual indica que el tiempo al cual el HEPP alcanza el equilibrio es de 3.0 hrs.

En un estudio reportado anteriormente acerca de la unión de este mismo fármaco a proteínas plasmáticas de rata <sup>12</sup>, en el cual se utilizó la misma técnica de diálisis, los autores observaron un tiempo de equilibrio mayor que el encontrado en este estudio (8 hrs). Lo anterior podría deberse quizás a que sus condiciones de diálisis (25°C) fueron diferentes a las nuestras (37°C), ya que generalmente un aumento en la temperatura ocasiona una disminución en el tiempo de equilibrio dado que la temperatura es directamente proporcional a la velocidad de difusión. <sup>6, 42, 43</sup>

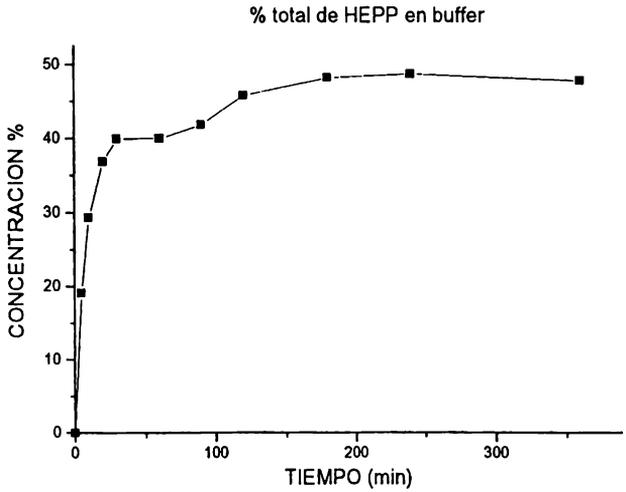


Figura 9. Determinación del tiempo de equilibrio del HEPP.

#### 4.2.1.2. Unión del HEPP a la membrana de diálisis.

El grado de unión del HEPP a la membrana de diálisis, se obtuvo siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.2.2.4.2. y los resultados se presentan en la tabla 11. En ella se puede observar que el grado de unión del fármaco a la membrana fue tan bajo, que no influye en la estimación de la cantidad de fármaco unido y por lo tanto el error inherente es despreciable. <sup>6, 41, 42, 44, 45</sup>

**Tabla 11.** Unión del HEPP a la membrana de diálisis a concentración de 50 µg/mL, 3.0 hrs., 37°C y 30 rpm.

Conc. inicial (µg/mL)	Conc. celda 1 buffer (µg/mL)	Conc. celda 2 buffer (µg/mL)	Conc. final celda 1 +celda 2 (µg/mL)	% de HEPP unido a la membrana
50	25.825	23.430	49.255	1.49
50	25.145	24.025	49.170	1.66
50	25.380	23.725	49.105	1.79
50	25.210	24.08	49.290	1.42
50	25.740	23.470	49.210	1.58

% promedio de HEPP unido a membrana = 1.59%.

#### 4.2.1.3. Integridad de la membrana.

Las membranas de diálisis utilizadas en estos estudios, son muy frágiles, de tal manera que al manipularlas para colocarlas en el equipo, o bien durante el estudio, pueden llegar a romperse, lo cual propiciaría que parte del plasma se mezclara con la solución amortiguadora, provocando un error en la determinación. Existen otros casos en los que la albúmina comercial, ya sea humana o bovina, por su método de purificación, puede llegar a fraccionarse, por lo que cada fracción tendría ahora un peso molecular menor a 69,000 y dependiendo de la abertura del poro de la

membrana, algunas de estas fracciones podrían atravesar la membrana hacia el lado del buffer.<sup>41, 43, 45</sup>

En este caso, no se encontró proteína del lado de la solución amortiguadora después de la diálisis de las muestras, asumiéndose con ello que la membrana se mantuvo intacta durante el estudio. Así mismo, la albúmina comercial utilizada no se encontraba fraccionada.

#### 4.2.1.4. Determinación del volumen de Shift.

No se encontraron diferencias significativas entre la concentración, tanto de proteínas plasmáticas totales como de albúmina bovina, antes y después de la diálisis de 3.0 hrs, lo cual indica que no hubo un desplazamiento de volumen desde el buffer hacia la proteína, que hubiera resultado en una dilución de la misma, que es lo que se conoce como volumen de Shift.

En diversos artículos este factor se ve atenuado al utilizar una membrana de bajo espesor, con una abertura de poro de bajo peso molecular y tiempos de equilibrio cortos (menor a 6 hrs).<sup>38-40, 45</sup> Todas estas características se cumplieron en este estudio, evitando así, que este factor fuera significativo, por lo que no hubo necesidad de realizar corrección alguna al respecto.

Con base en todo lo anterior se consideró que el método de diálisis al equilibrio era el adecuado para realizar el estudio.

#### ***4.2.5. Determinación del grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas.***

El HEPP es un fármaco diseñado para su uso en el tratamiento de la epilepsia, el cual podría ser administrado conjuntamente con otros fármacos antiepilépticos como carbamazepina, fenitoína o ácido valproico. Estos fármacos tienen un alto grado de unión a proteínas, por lo que al ser administrados conjuntamente con otro fármaco que también lo presente, podría ocurrir un desplazamiento de los sitios de unión, aumentando la fracción libre en plasma del fármaco desplazado, lo cual podría ocasionar algún efecto secundario, por lo que se consideró de gran importancia determinar el grado de unión a proteínas plasmáticas de este nuevo antiepiléptico.<sup>9, 20, 22</sup>

El grado de unión a proteínas plasmáticas del HEPP se realizó en el intervalo de concentraciones de 6.25-100 µg/mL, el cual fue elegido de acuerdo a las concentraciones plasmáticas de HEPP encontradas en los estudios de Fase Clínica I. El estudio se llevó a cabo siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.2.2.4.5. y los resultados se muestran en la tabla 12, en la que se puede observar que el porcentaje de unión del HEPP a proteínas totales se encuentra entre el 32.6 y el 38.9% en el intervalo de concentraciones estudiado.

**Tabla 12.** Unión del HEPP a proteínas plasmáticas (3.0 hrs., 37°C y 30 rpm).

Celda no.	Conc. inicial (µg/mL)	Conc. de fármaco en buffer al equilibrio (µg/mL)	Conc. de fármaco en plasma al equilibrio (µg/mL)	Unión a proteínas %.
1	6.25	2.37491	3.80278	37.55
2	6.25	2.35875	3.95634	40.39
3	6.25	2.32839	3.79232	38.60
4	6.25	2.34504	3.88243	39.60
5	6.25	2.37267	3.84586	38.28
Promedio	6.25	2.35592	3.85595	<b>38.88</b>
D.S./C.V.%	-	0.0195 / 0.8287	0.0666 / 1.7279	1.1187 / 2.8770
1	12.5	5.11897	8.23394	37.83
2	12.5	5.35159	8.31605	35.65
3	12.5	5.04745	7.91599	36.24
4	12.5	5.09714	8.10459	37.10
5	12.5	4.98215	8.06363	38.21
Promedio	12.5	5.11946	8.12684	<b>37.01</b>
D.S./C.V.%	-	0.1400 / 2.7351	0.1551 / 1.9084	1.0681 / 2.8862
1	25	9.79169	15.11878	35.23
2	25	9.47090	14.80407	36.03
3	25	9.53620	14.83207	35.70
4	25	9.60358	14.96962	35.85
5	25	9.81849	15.13879	35.14
Promedio	25	9.64417	14.97267	<b>35.59</b>
D.S./C.V.%	-	0.1545 / 1.6012	0.1558 / 1.0408	0.3890 / 1.0931
1	50	19.71466	30.20829	34.73
2	50	20.41478	30.89983	33.93
3	50	19.58327	29.56629	33.76
4	50	18.83762	29.11765	35.30
5	50	18.92009	28.98887	34.73
Promedio	50	19.49408	29.75619	<b>34.49</b>
D.S./C.V.%	-	0.6451 / 3.3093	0.7976 / 2.6806	0.6360 / 1.8439
1	100	40.60779	60.16957	32.51
2	100	41.04774	59.67578	31.22
3	100	39.09306	59.09394	33.85
4	100	39.35376	59.18199	33.50
5	100	40.50190	59.37326	31.78
Promedio	100	40.12085	59.49891	<b>32.57</b>
D.S./C.V.%	-	0.8494 / 2.1172	0.4336 / 0.7332	1.1128 / 3.4165

D.S. = Desviación estándar

C.V. % = Coeficiente de variación por ciento.

En un estudio previo, realizado por Gómez L y cols.<sup>3, 12</sup> se utilizó plasma de rata para determinar el grado de unión. Existen reportes en la literatura que indican que para algunos fármacos, las proteínas plasmáticas de algunas especies animales no presentan los mismos sitios de unión, que los encontrados en humano.<sup>8, 46</sup> Al comparar los resultados obtenidos por Gómez L. con los de éste estudio, se encontraron diferencias significativas entre ellos (19.9%<sup>5</sup> vs 35.7% en promedio); sin embargo, los cálculos efectuados para determinar el grado de unión en el estudio de Gómez L<sup>2</sup> son erróneos y al hacerse el ajuste correspondiente, la diferencia entre los resultados no es significativa, lo cual indica que para este fármaco, las proteínas de rata presentan los mismos sitios de unión al HEPP que las proteínas humanas.

El bajo grado de unión a proteínas totales mostrado por el HEPP, no es de importancia clínica, sin embargo, con el fin de caracterizar el comportamiento del HEPP al interactuar con proteínas específicas, se decidió continuar con el estudio de unión de este fármaco a albúmina sérica bovina.

#### ***4.2.6. Determinación del grado de unión a albúmina del HEPP.***

El grado de unión a albúmina del HEPP se obtuvo siguiendo los lineamientos especificados en la sección 3.2.2.4.6. En la tabla 13 se presenta el porcentaje de unión del HEPP a albúmina bovina, así como los parámetros utilizados para obtener la constante de asociación y el número de sitios de unión por molécula de proteína. En dicha tabla se puede observar que el rango de unión del HEPP a albúmina (30 al 39%) es semejante al obtenido en proteínas totales, por lo que se puede decir que el HEPP se une únicamente a esta proteína.

Tabla 13. Unión del HEPP a albúmina, utilizando el método de diálisis al equilibrio.

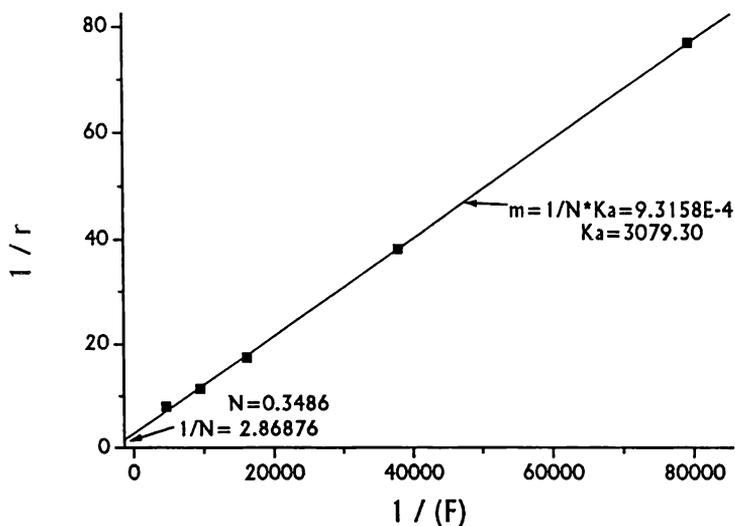
Concentración inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	HEPP (F) ( $\mu\text{g/mL}$ )	HEPP (F) (M)	HEPP (TOT) ( $\mu\text{g/mL}$ )	HEPP (TOT) (M)	% UNIDO	HEPP (U) (M)	r	r/HEPP (F)	1 / r	1 / (F)	(F) / r
6.25	2.41395	1.25E-05	3.85605	2.00E-05	37.40	7.47E-06	0.0129	1030.00	77.6631	8.00E+04	9.71E-04
6.25	2.44875	1.27E-05	3.88691	2.01E-05	37.00	7.45E-06	0.0128	1012.59	77.8759	7.89E+04	9.88E-04
6.25	2.37886	1.23E-05	3.90303	2.02E-05	39.05	7.89E-06	0.0136	1104.68	73.4813	8.12E+04	9.05E-04
6.25	2.54210	1.32E-05	3.97880	2.06E-05	36.11	7.44E-06	0.0128	974.42	77.9550	7.60E+04	1.03E-03
6.25	2.38042	1.23E-05	3.81532	1.98E-05	37.61	7.43E-06	0.0128	1039.30	78.0528	8.11E+04	9.62E-04
<b>Promedio</b>	<b>2.43282</b>	<b>1.26E-05</b>	<b>3.88802</b>	<b>2.01E-05</b>	<b>37.43</b>	<b>7.54E-06</b>	<b>0.0130</b>	<b>1031.31</b>	<b>76.9637</b>	<b>7.94E+04</b>	<b>9.70E-04</b>
12.5	5.07607	2.63E-05	7.97313	4.13E-05	36.34	1.50E-05	0.0259	984.02	38.6592	3.80E+04	1.02E-03
12.5	5.02794	2.60E-05	7.95048	4.12E-05	36.76	1.51E-05	0.0261	1002.17	38.3221	3.84E+04	9.98E-04
12.5	5.07138	2.63E-05	8.13866	4.21E-05	37.69	1.59E-05	0.0274	1042.80	36.5138	3.81E+04	9.59E-04
12.5	5.22411	2.71E-05	8.13375	4.21E-05	35.77	1.51E-05	0.0260	960.28	38.4920	3.70E+04	1.04E-03
12.5	5.04381	2.61E-05	7.93345	4.11E-05	36.42	1.50E-05	0.0258	987.77	38.7585	3.83E+04	1.01E-03
<b>Promedio</b>	<b>5.08866</b>	<b>2.64E-05</b>	<b>8.02589</b>	<b>4.16E-05</b>	<b>36.60</b>	<b>1.52E-05</b>	<b>0.0262</b>	<b>995.19</b>	<b>38.1305</b>	<b>3.79E+04</b>	<b>1.00E-03</b>
25	11.75235	6.09E-05	18.41116	9.53E-05	36.17	3.45E-05	0.0595	976.89	16.8195	1.64E+04	1.02E-03
25	12.21832	6.33E-05	18.64376	9.65E-05	34.46	3.33E-05	0.0574	906.70	17.4304	1.58E+04	1.10E-03
25	11.70474	6.06E-05	17.88553	9.26E-05	34.56	3.20E-05	0.0552	910.45	18.1203	1.65E+04	1.10E-03
25	11.93655	6.18E-05	18.41256	9.54E-05	35.17	3.35E-05	0.0578	935.41	17.2943	1.62E+04	1.07E-03
25	11.98676	6.21E-05	18.39080	9.52E-05	34.82	3.32E-05	0.0572	921.14	17.4886	1.61E+04	1.09E-03
<b>Promedio</b>	<b>11.91974</b>	<b>6.17E-05</b>	<b>18.34876</b>	<b>9.50E-05</b>	<b>35.04</b>	<b>3.33E-05</b>	<b>0.0574</b>	<b>929.93</b>	<b>17.4207</b>	<b>1.62E+04</b>	<b>1.08E-03</b>
50	20.61797	1.07E-04	30.88389	1.60E-04	33.24	5.32E-05	0.0917	858.47	10.9097	9.37E+03	1.16E-03
50	20.27507	1.05E-04	30.24246	1.57E-04	32.96	5.16E-05	0.0890	847.60	11.2364	9.52E+03	1.18E-03
50	19.73547	1.02E-04	30.25071	1.57E-04	34.76	5.45E-05	0.0939	918.64	10.6510	9.78E+03	1.09E-03
50	21.02775	1.09E-04	31.30607	1.62E-04	32.83	5.32E-05	0.0918	842.75	10.8965	9.18E+03	1.19E-03
50	19.88195	1.03E-04	30.42626	1.46E-04	34.66	4.26E-05	0.0735	713.66	13.6092	9.71E+03	1.40E-03
<b>Promedio</b>	<b>20.30764</b>	<b>1.05E-04</b>	<b>30.62188</b>	<b>1.56E-04</b>	<b>33.69</b>	<b>5.10E-05</b>	<b>0.0880</b>	<b>836.38</b>	<b>11.3689</b>	<b>9.51E+03</b>	<b>1.20E-03</b>
100	40.91136	2.12E-04	59.33913	2.84E-04	31.05	7.21E-05	0.1242	586.36	8.0496	4.72E+03	1.71E-03
100	41.42402	2.15E-04	59.18676	2.83E-04	30.01	6.87E-05	0.1184	551.90	8.4463	4.66E+03	1.81E-03
100	43.87748	2.27E-04	62.68225	3.00E-04	30.00	7.27E-05	0.1253	551.54	7.9793	4.40E+03	1.81E-03
100	40.65462	2.11E-04	60.21455	2.88E-04	32.48	7.76E-05	0.1337	635.25	7.4770	4.75E+03	1.57E-03
100	40.58801	2.10E-04	58.70595	2.81E-04	30.86	7.07E-05	0.1219	579.91	8.2039	4.76E+03	1.72E-03
<b>Promedio</b>	<b>41.49110</b>	<b>2.15E-04</b>	<b>60.02573</b>	<b>2.87E-04</b>	<b>30.88</b>	<b>7.23E-05</b>	<b>0.1247</b>	<b>580.44</b>	<b>8.0181</b>	<b>4.65E+03</b>	<b>1.72E-03</b>

HEPP (F) = Concentración de fármaco libre

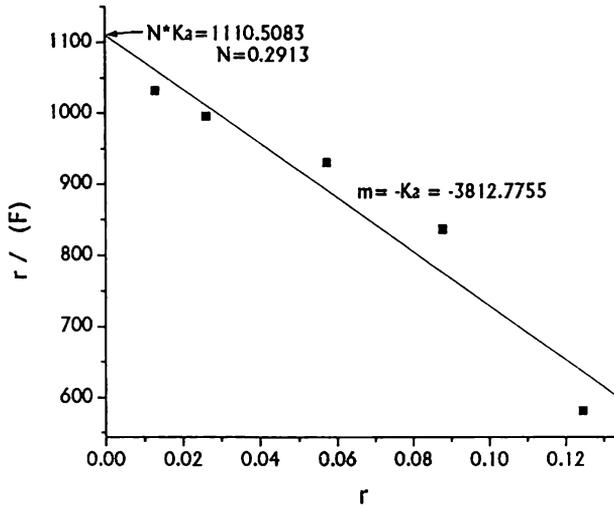
(M) = Concentración molar

HEPP (U) = Concentración de fármaco unido.

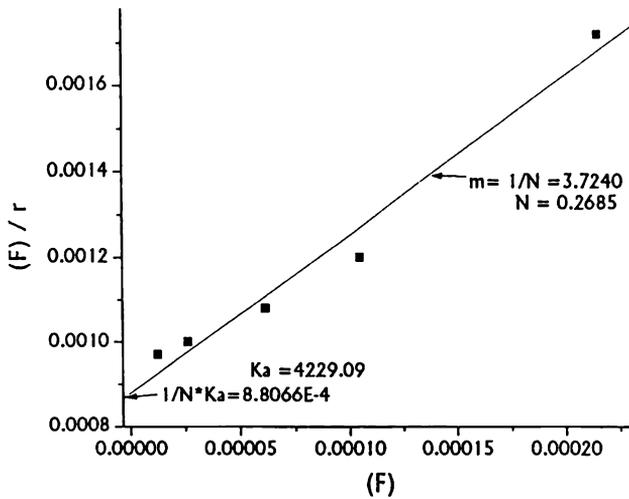
Las figuras 10 a la 12 muestran los diferentes métodos gráficos, utilizados para calcular los parámetros de unión del HEPP a albúmina, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 14. En el apéndice I se presentan las ventajas y desventajas de los diferentes métodos gráficos utilizados para el cálculo de los parámetros.



**Figura 10.** Gráfica de la doble recíproca para la obtención de la constante de asociación fármaco-proteína y los sitios de unión.



**Figura 11.** Gráfica de Scatchard para la obtención de la constante de asociación fármaco-proteína y los sitios de unión.



**Figura 12.** Gráfica tipo Woolf para la obtención de la constante de asociación fármaco-proteína y los sitios de unión.

**Tabla 14.** Resultados obtenidos de las gráficas de la doble recíproca, Scatchard y Woolf.

Tipo de gráfico	Tipos de sitios de unión	Constante de afinidad KA (M <sup>-1</sup> )	Número de sitios de unión (N)	Afinidad de unión N*KA (M <sup>-1</sup> )
Doble recíproca	---	3.08 X 10 <sup>3</sup>	0.3486	1073.69
Scatchard	1	3.81 X 10 <sup>3</sup>	0.2913	1109.85
Woolf	1	4.23 X 10 <sup>3</sup>	0.2685	1135.76

Como se observa en la tabla 14, la gráfica de la doble recíproca nos puede diferenciar si existe una o más clases de sitios de unión; sin embargo, tanto la gráfica de Scatchard como la de Woolf, al dar una línea recta, muestran que el HEPP interacciona con la proteína presentando una sola clase de sitios de unión.

En la misma tabla se muestran los valores obtenidos para la constante de asociación y el número de sitios de unión para cada gráfica. Los valores difieren un poco, debido al manejo matemático de los datos, pero en general, se encontró un valor de Ka dentro del rango de 3 a 4 X 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>. La constante de afinidad Ka es una medida de que tan afin es un fármaco a un sitio de unión específico y no está relacionado directamente con el porcentaje de unión presentado por el fármaco, es decir, un fármaco que tenga un alto grado de unión a proteínas puede presentar una baja afinidad a éstas.<sup>23, 47</sup> El HEPP por lo tanto, a pesar de presentar un bajo grado de unión, presenta una afinidad considerable a sus sitios de unión.

El HEPP presentó en promedio 0.3028 sitios de unión por molécula de proteína. Cuando el valor obtenido es de alrededor de 1, el fármaco forma un complejo 1:1 con la proteína. Numerosos estudios realizados en diferentes fármacos han obtenido valores de N menores a 1, sin embargo aún no se cuenta con una explicación que permita realizar la interpretación de sitios de unión fraccionados.

Un parámetro más representativo de la habilidad de unión del fármaco a la proteína está dado por el producto de  $N \cdot K_a$ , que en el caso del HEPP fue en promedio de  $1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , lo cual concuerda con el bajo grado de unión presentado por éste, comparado con el valor de  $10^5 \text{ M}^{-1}$  mostrado por fármacos que se unen en alto grado a las proteínas.

En resumen, el HEPP se une en su totalidad a la albúmina en un 30 a 39%, presenta una sola clase de sitios de unión, una constante de asociación de  $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  y 0.3028 sitios de unión por molécula de proteína.

El grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas fue bajo, por lo que no resulta de importancia clínica.

## **ESTUDIO No. 2**

### **4.3. Interacción farmacocinética entre el HEPP y la fenitoína (DFH).**

En el tratamiento de enfermedades en las que se presentan crisis convulsivas, es común la administración conjunta de varios fármacos antiepilépticos, lo cual incrementa la posibilidad de una interacción farmacocinética, ya sea en su absorción, distribución, metabolismo o excreción, y que podría ocasionar efectos secundarios o simplemente no alcanzar la concentración plasmática suficiente para lograr su efecto terapéutico.<sup>1,9</sup>

Considerando el amplio uso de la fenitoína para el tratamiento de estas enfermedades, se seleccionó la combinación de este fármaco con HEPP con el fin de evaluar una posible interacción farmacocinética entre ambos.

Dado que a la fecha no existe información acerca del metabolismo del HEPP, se realizó una revisión acerca del metabolismo de la fenitoína en diferentes especies, encontrando que solo el conejo metabolizaba de la

misma manera que el hombre<sup>3, 9, 48-50</sup>, por lo cual se seleccionó esta especie animal para realizar el estudio.

Los tiempos de muestreo para HEPP se establecieron tomando como base los estudios de fase preclínica que Gómez L. y cols. realizaron en diferentes especies animales (incluyendo conejo)<sup>3, 4, 12, 13</sup> Los tiempos de muestreo para la fenitoína se establecieron en base a un estudio preliminar.

Los resultados del estudio se dividieron en dos con el propósito de facilitar el análisis de los mismos: i) influencia del HEPP en la farmacocinética de la fenitoína, y ii) influencia de la fenitoína en la farmacocinética del HEPP.

#### **4.3.1. Influencia del HEPP en la farmacocinética de la fenitoína (DFH).**

Parte del análisis de resultados se enfocó a determinar si la farmacocinética de la DFH se ve alterada por la administración conjunta de HEPP.

Se eligió la dosis de fenitoína con el fin de obtener en el estado estacionario, concentraciones plasmáticas semejantes a las encontradas en el intervalo terapéutico de humanos (10-20 µg/mL).<sup>1</sup> La muestra correspondiente al tiempo cero fue la obtenida inmediatamente después de la última administración de DFH.

En la tabla 15 se encuentran las concentraciones plasmáticas promedio de los 6 conejos a los cuales se les administró DFH sola o conjuntamente con HEPP. Los datos correspondientes a cada conejo se encuentran resumidos en el apéndice II.

Se observa que, después de la administración de ambos tratamientos, los niveles de DFH presentan una gran variabilidad. El coeficiente de variación promedio de todos los niveles de concentración a los diferentes tiempos de muestreo fue de 30.87%. Esta variabilidad

interindividual para la fenitoína se encuentra reportada en numerosos artículos y se debe principalmente a que este fármaco presenta una cinética de eliminación dosis-dependiente. 1, 9, 25-27

Cabe mencionar que los resultados promedio de la concentración plasmática a las 24 hrs corresponden a los obtenidos en 3 conejos, ya que los tres restantes se encontraban abajo del límite de cuantificación del método de EMIT (2.0 µg/mL).

**Tabla 15.** Valores promedio de concentración plasmática de DFH a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de DFH y DFH + HEPP a conejos.

Tiempo (h)	Concentración (µg/mL) ± d.e.	
	Tratamiento con DFH	Tratamiento con DFH + HEPP
0.0*	8.2 ± 3.3	9.3 ± 2.7
1.0	13.4 ± 3.6	13.5 ± 3.2
2.0	15.2 ± 3.3	16.0 ± 2.8
3.0	14.4 ± 4.0	14.9 ± 4.2
5.0	11.9 ± 3.5	12.4 ± 3.1
8.0	9.5 ± 3.1	9.3 ± 3.4
12.0	6.6 ± 2.2	6.2 ± 1.8
24.0	2.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>

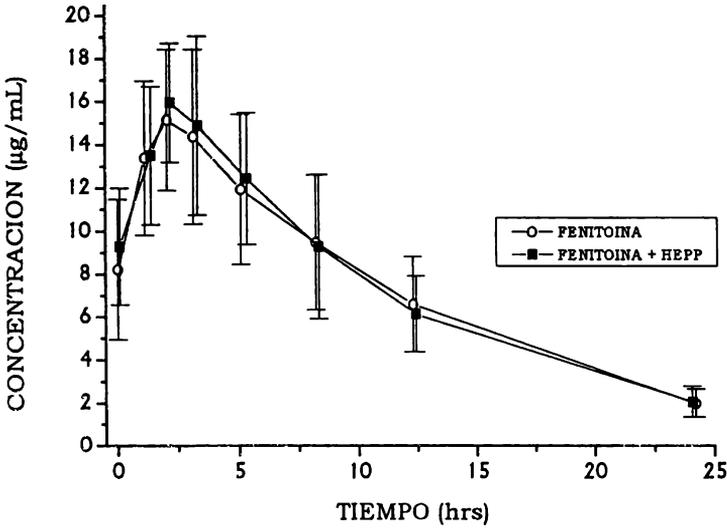
\* El valor corresponde a la muestra tomada inmediatamente después de la última administración de DFH.

a: Promedio de 3 conejos.

En la figura 13 se presentan los perfiles de concentración plasmática de fenitoína obtenidos después de la administración de ambos tratamientos (DFH sola y DFH + HEPP). Se puede observar que las curvas de ambos tratamientos casi se superponen, lo cual hace pensar que el HEPP no altera la farmacocinética de la fenitoína.

Aún cuando la DFH sigue una farmacocinética dosis-dependiente<sup>24</sup>, con una cinética de eliminación de Michaelis-Menten, no fue posible

calcular los parámetros de  $V_m$  y  $K_m$ . Por tal motivo, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ellos, se evaluaron estadísticamente los parámetros de  $ABCo \rightarrow t$ ,  $ABCo \rightarrow inf$ ,  $t_{1/2}$  y TMR.



**Figura 13.** Valores promedio ( $\pm$  d.e.) de los niveles plasmáticos de DFH en 6 conejos después de la administración de DFH y DFH+HEPP.  $\circ \rightarrow$  DFH;  $\blacksquare \rightarrow$  DFH + HEPP.

En la tabla 16 se presentan los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de los tratamientos con DFH y DFH + HEPP. En la última columna se presenta la significancia obtenida al realizar el análisis estadístico, después de aplicarse la prueba de análisis de varianza (ANADEVA) y prueba de t-Student pareada y no pareada para comparar los tratamientos. Los resultados obtenidos de estas pruebas se resumen en la tabla 17 y nos confirman que no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Los tiempos de vida media obtenidos después de la administración del tratamiento con DFH y DFH+HEPP, fueron muy semejantes ( $7.3789 \pm 1.15$  h y  $7.6450 \pm 0.87$  h, respectivamente). Esto se corroboró al efectuar análisis estadístico, que mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de vida media calculados.

Debido a que la DFH sigue una cinética dosis-dependiente <sup>51, 52</sup>, no fue posible comparar los resultados con aquéllos reportados previamente, ya que no existe ninguno en el cual se haya administrado este fármaco a la misma dosis y en la misma especie utilizadas en este estudio, sin embargo, el tiempo de vida media obtenido para ambos tratamientos es muy parecido al reportado para niños, después de administrarles una dosis de 15 mg/Kg/día de DFH ( $7.6 \pm 3.5$ h <sup>60</sup>).

El tiempo medio de residencia (obtenido por análisis de momentos), es una función de la biodisponibilidad e indica el tiempo durante el cual el fármaco se mantiene en el organismo. En el estudio, no se encontraron diferencias significativas para este parámetro, al comparar ambos tratamientos.

Con base a lo anterior, se encontró que el HEPP no altera la farmacocinética de DFH, al ser administrados conjuntamente.

**Tabla 16.** Parámetros farmacocinéticos promedio  $\pm$  d.e. obtenidos después de la administración de DFH y DFH + HEPP en conejos.

Parámetro farmacocinético	Administración de DFH	Administración de DFH + HEPP	p<0.01
ABCo.t ( $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$ )	184.8117 $\pm$ 53.96	184.3848 $\pm$ 43.99	NS
ABCo.inf ( $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$ )	217.7017 $\pm$ 54.49	206.9154 $\pm$ 49.04	NS
t $\frac{1}{2}$ (h)	7.3789 $\pm$ 1.15	7.6450 $\pm$ 0.87	NS
TMR (h)	10.4473 $\pm$ 2.23	10.8624 $\pm$ 1.93	NS

NS = No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

**Tabla 17.** Resultados obtenidos al aplicar la prueba de ANADEVIA y t de Student para comparar cada uno de los parámetros farmacocinéticos promedio de cada tratamiento.

Parámetro farmacocinético	F <sub>exp</sub>	P	t <sub>exp</sub>
ABCo <sub>t</sub>	0.000226	0.9883	0.0150
ABCo <sub>inf</sub>	0.130000	0.7260	0.3600
t ½	0.203000	0.6618	-0.4510
TMR	0.118000	0.7382	-0.3440

F<sub>teo</sub> (0.01, 1, 10) = 10.04

P = 0.01

t<sub>teo</sub>(0.005, 10) = 3.169

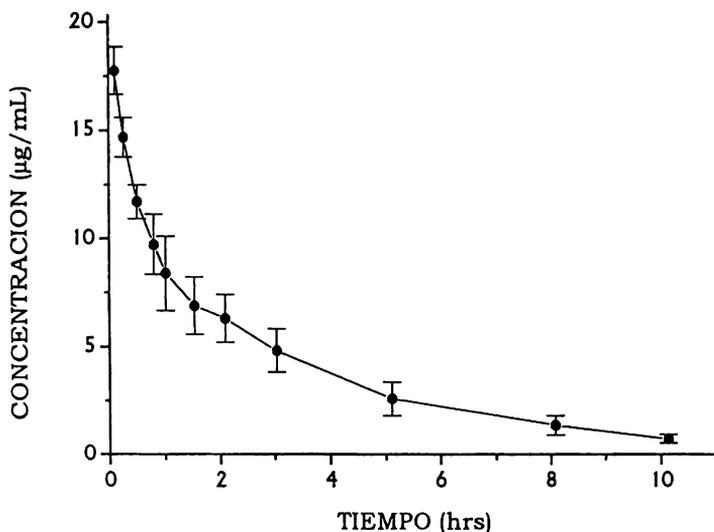
#### 4.3.2. Influencia de la fenitoína (DFH) en la farmacocinética del HEPP.

En la tabla 18 y en la figura 14 se presentan las concentraciones plasmáticas promedio del HEPP en los 6 conejos, obtenidas después de la administración de HEPP solo.

**Tabla 18.** Valores promedio de concentración plasmática de HEPP a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de HEPP solo a conejos.

Tiempo (h)	Concentración (µg/mL) ± d.e
	Tratamiento con HEPP solo
0.00	0.0000 ± 0.00
0.08	17.7509 ± 1.10
0.25	14.6854 ± 0.91
0.50	11.7124 ± 0.78
0.75	9.7376 ± 1.40
1.0	8.3862 ± 1.73
1.5	6.8930 ± 1.33
2.0	6.2946 ± 1.10
3.0	4.8147 ± 1.00
5.0	2.5775 ± 0.77
8.0	1.3506 ± 0.45
10.0	0.7219 ± 0.22

Promedio de 6 conejos.



**Figura 14.** Valores promedio ( $\pm$  d.e.) de los niveles plasmáticos de HEPP en 6 conejos después de la administración de HEPP solo.

Los niveles plasmáticos obtenidos en este estudio, son semejantes a los obtenidos en el estudio preclínico realizado por Gómez L. y cols.<sup>3</sup>, en el cual se administró HEPP a conejos macho, bajo las mismas condiciones.

La variabilidad interindividual promedio que se presentó en los niveles plasmáticos del HEPP fue del orden del 18.6%, similar incluso al reportado en otras especies, incluyendo al humano.<sup>4, 14</sup>

Los datos se ajustaron a un modelo abierto bicompartimental por medio de una regresión no lineal con el paquete PCNONLIN 4.0. y los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos, se muestran en la tabla 19. Los datos individuales de cada conejo se encuentran en el apéndice III.

**Tabla 19.** Parámetros farmacocinéticos promedio  $\pm$  d.e. obtenidos después de la administración de HEPP solo en conejos.

<b>Parámetro farmacocinético</b>	<b>Administración de HEPP</b>
<b>ABC<sub>0-t</sub></b> ( $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$ )	40.3570 $\pm$ 6.22
<b>ABC<sub>0-inf</sub></b> ( $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$ )	43.2292 $\pm$ 7.01
<b>t1/2 <math>\beta</math></b> (h)	2.6833 $\pm$ 0.35
<b>TMR</b> (h)	3.5341 $\pm$ 0.49

Si se comparan los parámetros farmacocinéticos del HEPP obtenidos en este estudio con los obtenidos por Gómez L. y cols.<sup>3</sup>, se observa que no existen diferencias significativas en el ABC<sub>0-inf</sub> (43.2292  $\pm$  7.01  $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$  en este estudio contra 39.80  $\pm$  2.23  $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$  obtenida por Gómez); sin embargo, el t1/2  $\beta$  difiere en 1.0 h aproximadamente (2.6833  $\pm$  0.35 h en este estudio y 1.71  $\pm$  0.07 h para Gómez L). Las mismas diferencias se encontraron al comparar el TMR, Cl y Vc, Vee y V $\beta$ . Lo anterior pudo deberse a que en el estudio realizado por Gómez, solo se tomaron muestras sanguíneas durante 3.0 h, por lo que no fue posible llegar al 10% de la concentración máxima, y por lo tanto no fue suficiente para poder hacer un mejor estimado de la fase de eliminación.

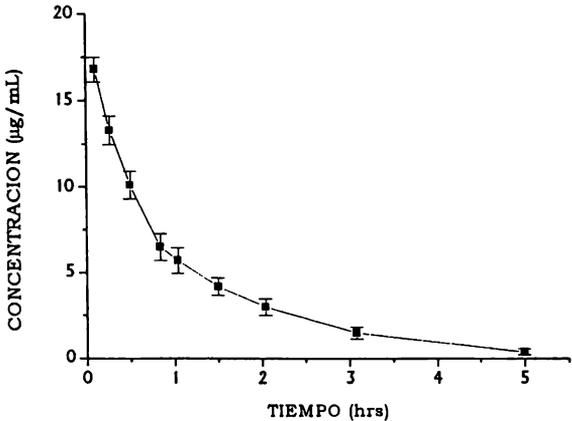
Por otro lado, los valores promedio de concentración plasmática del HEPP obtenidos en los conejos a los cuales se les administró HEPP conjuntamente con fenitoina, se muestran en la tabla 20 y en la figura 15, mientras que la comparación de ambos tratamientos se presenta en la figura 16, en la que se observa un cambio evidente en el perfil de concentraciones del HEPP al administrar la combinación, con respecto al

perfil del HEPP solo. El cambio en las concentraciones del HEPP después del tratamiento con HEPP+DFH fue tal, que a las 5.0 hrs. en algunos conejos ya no fue posible detectar el HEPP en plasma.

**Tabla 20.** Valores promedio de concentración plasmática de HEPP a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de HEPP + DFH a conejos.

	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ d.e.
Tiempo (h)	Tratamiento con HEPP + DFH
0.00	0.0000 $\pm$ 0.00
0.08	16.7903 $\pm$ 0.71
0.25	13.2892 $\pm$ 0.83
0.50	10.1108 $\pm$ 0.79
0.75	6.5027 $\pm$ 0.77
1.0	5.7167 $\pm$ 0.77
1.5	4.1820 $\pm$ 0.52
2.0	2.9982 $\pm$ 0.49
3.0	1.4552 $\pm$ 0.35
5.0	0.5165 $\pm$ 0.07
8.0	N.D
10.0	N.D

Promedio de 6 conejos para cada tratamiento.  
 N.D.= No detectable.

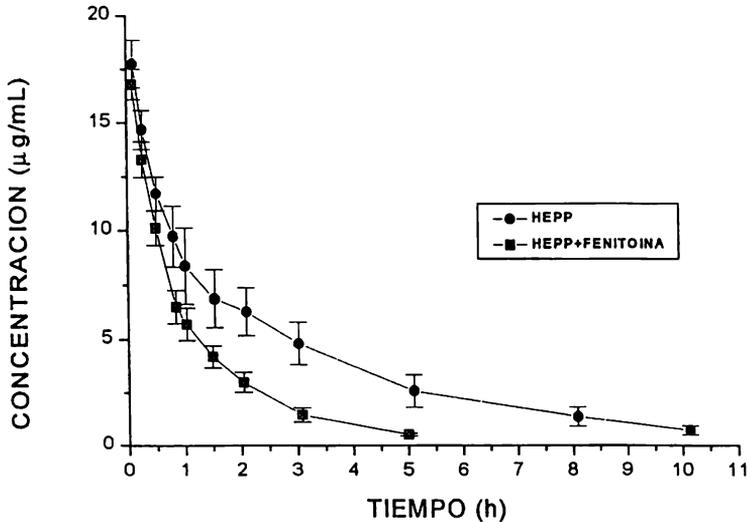


**Figura 15.** Valores promedio ( $\pm$  d.e.) de los niveles plasmáticos de HEPP en 6 conejos después de la administración de HEPP + DFH.

En la tabla 21, se encuentran los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el HEPP al ser administrado conjuntamente con DFH, los cuales muestran diferencias significativas en comparación con los mostrados por el HEPP, cuando éste fue administrado solo (tabla 19).

**Tabla 21.** Parámetros farmacocinéticos promedio  $\pm$  d.e. obtenidos después de la administración de HEPP + DFH en conejos.

Parámetro farmacocinético	Administración de HEPP + DFH
ABC <sub>0-t</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	17.5598 $\pm$ 2.37
ABC <sub>0-inf</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	18.8056 $\pm$ 2.03
t <sub>1/2</sub> $\beta$ (h)	1.0447 $\pm$ 0.07
TMR (h)	1.3530 $\pm$ 0.10



**Figura 16.** Valores promedio ( $\pm$  d.e.) de los niveles plasmáticos de HEPP en 6 conejos después de la administración de HEPP y HEPP + DFH.

●→HEPP; ■→HEPP + DFH.

En la tabla 23 se comparan los parámetros farmacocinéticos de ambos tratamientos y se presentan los resultados obtenidos del análisis estadístico, después de aplicarse la prueba de ANADEVa y prueba de t-Student pareada y no pareada. Los resultados del análisis estadístico se encuentran resumidos en la tabla 24.

**Tabla 23.** Parámetros farmacocinéticos promedio  $\pm$  d.e. obtenidos después de la administración de HEPP y HEPP + DFH en conejos.

Parámetro farmacocinético	Administración de HEPP	Administración de HEPP + DFH	p<0.01
ABC o.,t ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	40.3570 $\pm$ 6.22	17.5598 $\pm$ 2.37	<b>S</b>
ABC o.,inf ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	43.2292 $\pm$ 7.01	18.8056 $\pm$ 2.03	<b>S</b>
t1/2 $\beta$ (h)	2.6833 $\pm$ 0.35	1.0447 $\pm$ 0.07	<b>S</b>
TMR (h)	3.5341 $\pm$ 0.49	1.3530 $\pm$ 0.10	<b>S</b>

S= existen diferencias significativas entre grupos.

**Tabla 24.** Resultados obtenidos al aplicar la prueba de ANADEVa y t de Student para comparar los parámetros farmacocinéticos promedio de cada tratamiento.

Parámetro farmacocinético	Fexp	P	t exp
ABC <sub>o-t</sub>	70.3	< 0.0001	8.39
ABC <sub>o-inf</sub>	67.1	< 0.0001	8.19
t1/2 $\beta$	126.4	< 0.0001	11.2
TMR	113.9	< 0.0001	10.7

F teo (0.01, 1, 10)= 10.04

P= 0.01

t teo (0.005, 10)= 3.169

El  $ABCo \rightarrow t$  y  $ABCo \rightarrow inf$  de la combinación HEPP-DFH, disminuyó en promedio un 56.48% y un 56.49% respectivamente con respecto al control. El análisis estadístico de estos parámetros mostró diferencias altamente significativas entre los grupos ( $p < 0.01$ ).

En el caso de los parámetros de  $t_{1/2\beta}$  y TMR, éstos presentaron un comportamiento similar al del ABC. Al realizar el análisis estadístico, utilizando un análisis de varianza (ANADEVA) y pruebas de t-Student pareada y no pareada, se encontraron diferencias significativas entre los grupos a un nivel de probabilidad de  $p < 0.01$ .

El valor promedio del Cl para el HEPP fue de 0.3537 L/h/Kg el cual mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al que se presentó para el tratamiento con HEPP + DFH (0.8058 L/h/Kg). El volumen de distribución del compartimiento central ( $V_c$ ), el volumen de distribución al estado estacionario ( $V_{ee}$ ) y el volumen de distribución de  $\beta$  ( $V\beta$ ) no presentaron diferencias significativas al comparar estadísticamente ambos tratamientos.

De acuerdo a los resultados anteriores, la administración conjunta de HEPP y fenitoína podría traer como consecuencia una disminución drástica en los niveles plasmáticos del HEPP.

Los resultados obtenidos sugieren una fuerte inducción enzimática en el metabolismo del HEPP por parte de la fenitoína. La fenitoína es un inductor enzimático, que puede incrementar el metabolismo de los fármacos. Una vía común del metabolismo de estos fármacos es la hidroxilación aromática donde la fenitoína es un conocido inductor del sistema citocromo P-450. En aquellos fármacos en los que provoca una inducción metabólica, se presenta una disminución en el ABC y en el  $t_{1/2}$  de eliminación y consecuentemente un aumento en el aclaramiento del fármaco.<sup>1, 9, 26, 31, 53</sup> En estudios realizados por Doecke y col.<sup>61</sup> y Veronese y cols., se sugiere que algunas isoformas del citocromo P-450, específicamente de las subfamilias CYP2C9 y CYP2C10, son las

responsables de la hidroxilación de la fenitoína en los microsomas humanos hepáticos.<sup>9</sup>

No se han realizado estudios sobre el metabolismo del HEPP, pero con base en los resultados obtenidos, en los cuales la DFH afectó de forma tan notable la cinética del HEPP, se podría asumir que el HEPP se metaboliza vía citocromo P-450, quizás en la misma subfamilia genética sobre la cual la fenitoína actúa como inductor enzimático. Lo anterior tendría que complementarse con estudios de metabolismo del HEPP y estudios de interacción in vitro, donde se investiguen los posibles mecanismos implicados en la biotransformación de este fármaco.

# V

## Conclusiones.

---

---

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que:

- ✓ El método analítico utilizado para cuantificar el HEPP fue selectivo, específico, lineal, exacto, reproducible y repetible en el intervalo de 0.78 a 100 µg/mL para albúmina y de 0.39 a 100 µg/mL para plasma.
- ✓ El HEPP presenta bajo grado de unión a proteínas plasmáticas (32-39%), por lo que su unión no se considera de importancia clínica.
- ✓ El HEPP se une exclusivamente a la albúmina, presenta una sola clase de sitios de unión y una constante de asociación de  $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ .
- ✓ Al administrar conjuntamente el HEPP con la fenitoína no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en los parámetros de  $ABCo \rightarrow t$ ,  $ABCo \rightarrow inf$ ,  $t_{1/2}$  y TMR de la DFH, por lo que el HEPP no

altera la farmacocinética de la fenitoína cuando se administran conjuntamente.

✓ La administración conjunta de HEPP y fenitoína provocó que los niveles plasmáticos del HEPP disminuyeran significativamente; así mismo, los parámetros farmacocinéticos  $ABCo \rightarrow t$ ,  $ABCo \rightarrow inf$ ,  $t_{1/2}$  y TMR se vieron disminuídos, mientras que la depuración aumentó significativamente, lo cual sugiere una fuerte inducción enzimática en el metabolismo del HEPP por parte de la fenitoína.

#### SUGERENCIAS:

✓ Es muy probable que en un futuro, estos fármacos sean administrados conjuntamente para el tratamiento de pacientes que presenten cuadros de epilepsia, por lo que se recomendaría llevar un control de estos pacientes, monitoreando los niveles de HEPP en plasma y ajustando las dosis cuando así se requiera.

✓ Considerando que existen otros fármacos antiepilépticos como fenobarbital, primidona y etosuximida que interactúan con fenitoína por el mismo mecanismo <sup>9</sup>, podría ser posible que éstos interaccionaran en forma similar con el HEPP.

✓ Se deben realizar estudios acerca del metabolismo del HEPP así como estudios de interacción *in vitro*, donde se determine si el metabolismo del HEPP se lleva a cabo por una subfamilia genética del citocromo P-450.

# VI

## Bibliografía

---

---

- 1.-Goodman L, Gilman A.: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. *Médica Panamericana*. **1991**, 8a. edición, pp. 436-439; 442-444.
- 2.-Meza S, Zenteno M, Carvajal G.: A new homologous series of anticonvulsants: phenyl-alcohol-amides. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1990**, 40, 1289-1291.
- 3.-Gómez L. Tesis de doctorado: Estudios farmacocinéticos preclínicos del nuevo anticonvulsivante D, L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP). *INP*. **1993**.
- 4.-Roldán M.L. Tesis de licenciatura. Farmacocinética de tres feniletihidroxiamidas anticonvulsionantes en conejo. *UV*. **1996**.
- 5.- Shargel L, Yu A.: *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. USA: *Appleton-Century-Crafts*. **1980**, pp. 128-137.
- 6.- Spectra/Por Equilibrium Dialyzer-20029. Manual de uso proporcionado directamente por el fabricante.
- 7.- Melten J, Witterood J, Willems H.: Comparison of Equilibrium Dialysis, Ultrafiltration, and Gel Permeation Chromatography for the determination of free fractions of phentobarbital and phenytoin. *J. Pharm. Sci.* **1985**, 74, 692-694.

- 8.- Wagner J.: Fundamentals of clinical pharmacokinetics. *Drug Intelligence Pub, Inc.* **1979**, 2a. edición, pp. 21-34.
- 9.- Levy M, Meldrum M.: Antiepileptic Drugs. *Raven Press Edit.* Fourth edition. **1995**, pp. 283-338.
- 10.-Armstrong Laboratorios. Caracterización química del HEPP 3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida. *Comunicado personal.* **1994**.
- 11.-Hernández-Gallegos Z, Lehmann, P.: Partition coefficients of three new anticonvulsants. *J. Pharm. Sci.* **1990**, 79, 1032-1033.
- 12.-Gómez L, Cueva-Rolón R and Lehmann F.: Disposition kinetics of HEPP in rats after intravenous, oral, and intraperitoneal administration. Correlation of plasma and brain levels with the anticonvulsants effect. *Biopharm. Drug Disp.* **1995**, 16, 77-89.
- 13.-Gómez L, Lehmann F.: Pharmacokinetics of the novel anticonvulsant HEPP after single intravenous administration of three different doses in dogs. *Biopharm. Drug Disp.* **1995**, 16, 105-112.
- 14.-Gonzales-Esquivel D, Rubio F, Carbajal G, Jung H.: Single-dose pharmacokinetics of HEPP a new anticonvulsant in normal healthy volunteers. En proceso.
- 15.-Javier A M, Martínez de Muñoz D.: Espectro de acción antiepiléptica de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida y sus homólogos inferiores. *Arch.Neurocién (Mex).* **1996**, 1, 76-80.
- 16.-Chávez J L, Martínez de Muñoz D.: Mecanismo de acción del anticonvulsivante DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP). *Arch.Neurocién (Mex).* **1996**, 1, 173-177.
- 17.-Brailowsky S, Montiel T.: Efectos de la D, L-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP) sobre un nuevo modelo de status epilepticus focal: el síndrome de abstinencia al GABA (SAG). *Arch.Neurocién (Mex).* **1996**, 1, 104-107.
- 18.-Mendoza F, López M L, Hernández A.: Estudio preliminar de la hepatotoxicidad del anticonvulsivante DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB) y sus homólogos inferiores (HEPP y HEPA). *Arch.Neurocién (Mex).* **1996**, 1, 169-172.
- 19.- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. *PLM.* **1996**, 984-985; 1786-1790.

- 20.-Johannessen S.: Pharmacokinetics of Anti-epileptic Drugs and their Clinical Significance. *The National Centre for Epilepsy, Norway*. pp. 1-11.
- 21.-Wesley A, Kazenko A, Wolf L, Glazko A.: Studies on 5, 5'-Diphenylhydantoin (Dilantin) in Animals and Man.
- 22.-Lunde P, Rane A, Yaffe S, Lund L, Sjöqvist F.: Plasma protein binding of diphenylhydantoin in man. *Clin.Pharm.Ther.* **1970**, 11, 846-855.
- 23.-Tillement J, Houin G, Zini R, Urien S, Albengres E.: The binding of Drugs to blood plasma macromolecules : recent advances and therapeutic significance. *Adv.Drug.Res.* **1984**, 13, 60-93.
- 24.-Wagner J G.: Pharmacokinetics for the pharmaceutical scientist. *Technomic publications.* **1993**, pp. 111-141.
- 25.-Patsalos P, Shorvon S, Elyas A, Smith G.: The interaction of dezimol (a new convulsivant) with carbamazepine and phenytoin. *J.Neurol.Neurosurg.Psy.* **1985**, 48, 374-377.
- 26.-Perucca E, Richens A.: Reversal by phenytoin of carbamazepine-induced water intoxication: a pharmacokinetic interaction. *J.Neurol.Neurosurg.Psy.* **1980**, 43, 540-545.
- 27.-Levine M, Jones M, Sheppard Y.: Differential effect of cimetidine on serum concentrations of carbamazepine and phenytoin. *Neurology.* **1985**, 35, 562-565.
- 28.-Kapetanovic I M, Kupferberg H J.: Nafimidone, an imidazole anticonvulsant, and its metabolite as potent inhibitors of microsomal metabolism of phenytoin and carbamazepine. *Drug.Metab.Disp.* **1984**, 12, 560-564.
- 29.-Fuerst R, Graves N, Leppik Y, Brundage R.: Felbamate increases phenytoin but decreases carbamazepine concentrations. *Epilepsia.* **1988**, 29, 488-491.
- 30.-Wagner ML, Graves NM, Marienau K.: Discontinuation of phenytoin and carbamazepine in patients receiving felbamate. *Epilepsia.* **1991**, 32, 398-406.
- 31.-Leppik Y E, Wolff D L.: Antiepileptic medication Interactions. *Neurol.Clin.* **1993**, 14, 905-921

- 32.-Bittencourt P R M, García C M, Martins R.: Phenytoin and carbamazepine decrease oral bioavailability of praziquantel. *Neurology*. **1992**, 42, 492-496.
- 33.-Guerci A.: Laboratorio. Métodos de análisis clínicos y su interpretación. *El Ateneo*. **1988**, pp. 222-225.
- 34.-Karnes H T, Shiu G, Shah V.: Validation of bioanalytical methods. *Pharm.Research*. **1991**, 8, 421-426.
- 35.-Braggio S, Barnaby R J, Grossi P, Cugola M.: A strategy for validation of bioanalytical methods. *J.Pharm.Biomed.Anal*. **1996**, 14, 375-388.
- 36.- Buchanan N, Eyberg C.: Equilibrium Dialysis. *S.Afr.Med.J.* **1974**, 48, 1867-1869.
- 37.-Guenter T.: Comparison of Equilibrium Times in Dialysis Experiments Using Spiked Plasma or Spiked Buffer. *J.Pharm.Sci.* **1982**, 71, 127-128.
- 38.-Lockwood F, Wagner G.: Plasma Volume Changes as a Result of Equilibrium Dialysis. *J.Pharm.Pharmacol.* **1983**, 35, 387-388.
- 39.-Huang J.: Errors in Estimating the Unbound Fraction of Drugs Due to the Volume Shift in Equilibrium Dialysis. *J.Pharm.Sci.* **1983**, 72, 1368-1369.
- 40.-Lima J, Mackichan J, Libertini N.: Influence of Volume Shifts on Drug Binding During Equilibrium Dialysis: Correction and Attenuation. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* **1983**, 11, 483-497.
- 41.- Meyer M, Guttman D.: Dynamic Dialysis as a method for studying Protein Binding I: Factors affecting the kinetics of dialysis through a cellophane membrane. *J.Pharm.Sci.* **1970**, 59, 33-38.
- 42.-Chignell C.: Protein Binding. Capítulo 5. **1991**, pp. 187-225.
- 43.-Fois R, Ashley J.: Drug Binding to Apparatus: A Factor Controlling Time to Equilibrium in Equilibrium Dialysis Studies. *J.Pharm.Sci.* **1991**, 80, 300-302.
- 44.-Koch-Weser J, Sellers E.: Drug Therapy: Binding of Drugs to Serum Albumin (First and Second parts). *New Eng.J.Med.* **1976**, 294, 311-316; 526-530.

- 45.-Lee S H, Lee M G.: Factors influencing the protein binding of azosemide using an equilibrium dialysis technique. *Biopharm.Drug.Disp.* **1995**, 16, 615-626.
- 46.-Goldstein A, Aronow L, Kalman S.: Farmacología. *Limusa.* **1978**, 1a. edición, pp. 185-192.
- 47.-Pacifci M, Viani A.: Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. *Clin. Pharmacokinet.* **1992**, 23, 449-468.
- 48.-Venho V, Eriksson H.: The rabbit: an animal model for comparative bioavailability studies of drugs. *Int.J.Pharm.* **1986**, 30, 91-94.
- 49.-Sieggers V, Pentz R, Younes, M.: Einfluß von (+)-Catechin auf die Pharmakokinetik von Carbamazepin bei Kaninchen. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1982**, 32, 1440-1442.
- 50.-Watari N, Funaki T, Aizawa K, Kaneniwa N.: Nonlinear Assessment of Nitrofurantoin Bioavailability in rabbits. *J.Pharm.Biopharm.* **1983**, 11, 529-545.
- 51.-Benet L, Massoud N, Gambertoglio J.: Pharmacokinetic Basis for Drug Treatment. *Raven Press.* **1984**, edición, 195-220.
- 52.-Gibaldi M.: Biopharmaceutics and clinical Pharmacokinetics. *Lea & Febiger.* **1984**, 3a. edición, 267-272.
- 53.-Conney A H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev.* **1967**, 19, 317-366.
- 54.-Shah V P, Midha K K, Dighe S.: Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J.Pharm.Sci.* **1992**, 81, 309-312.
- 55.-Sebille B, Thuaud N, Tillement JP.: Study of Binding of Low-Molecular-Weight Ligand to Biological Macromolecules by High-Performance Liquid Chromatography. Evaluation of Binding Parameters for Two Drugs Bound to Human Serum Albumin. *J. Chrom.* **1978**, 167, 159-170.
- 56.-Vallner J J, Perrin J H, Wold S.: Comparison of graphical and computerized methods for calculating binding parameters for two strongly bound drugs to human serum albumin. *J.Pharm.Sci.* **1976**, 65, 1182-1187.

- 57.-Chang R.: Físicoquímica con aplicaciones a sistemas biológicos. *Continental*. **1987**, 2a. edición, pp. 302-309.
- 58.-La Du B, Mandel G.: Fundamentals of Drugs Metabolism and Drug Disposition. *Williams and Wilkins Co.* **1972**, pp. 63-75.
- 59.-Thompson C, Klotz Y.: Macromolecules - Small Molecule Interactions: Analytical and Graphical Reexamination. *Arch.Biochem.Biophys.* **1971**, 147, 178-185.
- 60.-Dodson, E.: Nonlinear kinetics of phenytoin in children. *Neurology*. **1982**, 32, 42-48.
- 61.-Doecke C, Sansom L, McManus M.: Phenytoin 4-hydroxylation by rabbit liver P450IIC3 and identification of orthologs in human liver microsomes. *Biochem.Biophys.Research.Comm.* **1990**, 166, 860-866.
62. Medina L, García L. Tesis de licenciatura: Estudios de unión a proteínas plasmáticas del albendazol y su principal metabolito, sulfóxido de albendazol. *UNAM*. **1995**.
63. Análisis de fenitoína EMIT. Manual de uso proporcionado directamente por el fabricante.
64. Oellerich M.: Enzyme immunoassays in clinical chemistry: Present status and trends. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* **1980**, 18, 197-208.

**VII**

**Apéndice.**



**APENDICE I.**

Métodos gráficos utilizados para calcular el número de sitios de unión por molécula de proteína y las constantes de afinidad por cada sitio, en el estudio de unión a proteínas. 5, 8, 42, 46, 47, 55-59

Método:	Ecuación	Gráfico:	Ventajas	Desventajas
• Directa	$r = \frac{NKA[F]}{1 + KA[F]}$	r vs (F)	Una gráfica de éste tipo da una curva hiperbólica, la cual es característica de enlaces simples (es decir, todos los sitios de enlace son equivalentes y no interactúan entre sí).	Es necesario trabajar en un amplio rango de concentraciones para lograr distinguir la hipérbola. La gráfica directa no es muy útil en la determinación de N y KA, ya que suele ser difícil determinar el valor asintótico de N a concentraciones de ligando muy altas.
• Doble recíproca	$\frac{1}{r} = \frac{1}{N} + \frac{1}{NKA} * \frac{1}{[F]}$	1/r vs 1/(F)	La constante de afinidad KA así como el número de sitios de unión N se pueden obtener fácilmente de la pendiente y el intercepto de la recta que se obtiene.	Este tipo de gráfica tiene la desventaja de que los valores bajos de 1/r se dispersan pobremente, por lo que algunos puntos no se pueden utilizar, además no nos distingue entre una o más clases de sitios de unión.
• Scatchard	$\frac{r}{[F]} = NKA - KA r$	r/(F) vs r	Es la más sensible para distinguir cuando están presentes dos o más clases de sitios de unión.	Es necesario trabajar en un amplio rango de concentraciones para poder distinguir la curvatura que se presenta para dos sitios de unión.
• Woolf	$\frac{[F]}{r} = \frac{1}{NKA} + \frac{1}{N}[F]$	(F)/r vs (F)	Este tipo de ecuación describe una gráfica que también es lo suficientemente sensible como para detectar más de una clase de sitio de unión.	Al igual que la de Scatchard, es necesario trabajar en un rango de concentraciones amplio.

Donde: [F]=concentración de fármaco libre; KA=constante de asociación; N=número de sitios de unión y  $r = \frac{[PF]}{[PF] + [P]}$

## APENDICE II.

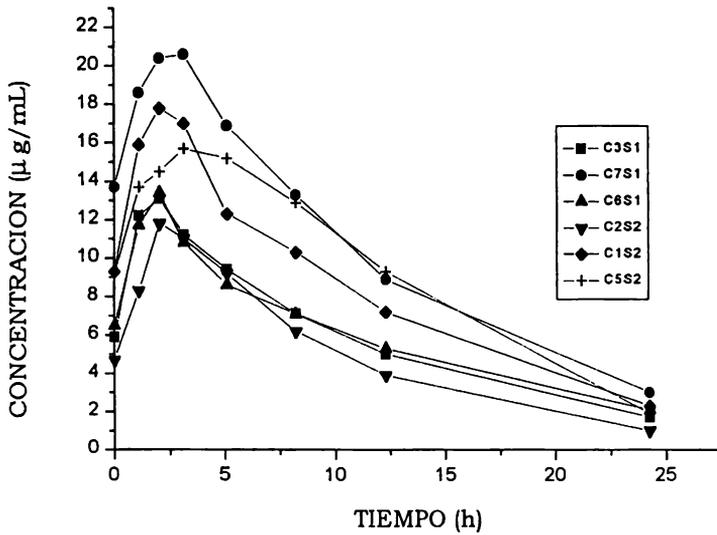
Valores individuales de concentración plasmática de **DFH** a los diferentes tiempos de muestreo para los conejos a los cuales se les administró DFH.

Tiempo (h)	Concentración plasmática ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					
	Conejo 3	Conejo 7	Conejo 6	Conejo 2	Conejo 1	Conejo 5
0.02	5.9	13.7	6.5	4.7	9.3	9.2
1.13	12.2	18.6	11.7	8.3	15.9	13.7
2.05	13.1	20.4	13.4	11.8	17.8	14.5
3.15	11.2	20.6	10.8	11.0	17.0	15.7
5.10	9.4	16.9	8.6	9.2	12.3	15.2
8.22	7.1	13.3	7.1	6.2	10.3	12.9
12.30	5.0	8.9	5.3	3.9	7.2	9.3
24.24	N.C.	3.0	2.1	N.C.	2.3	N.C.

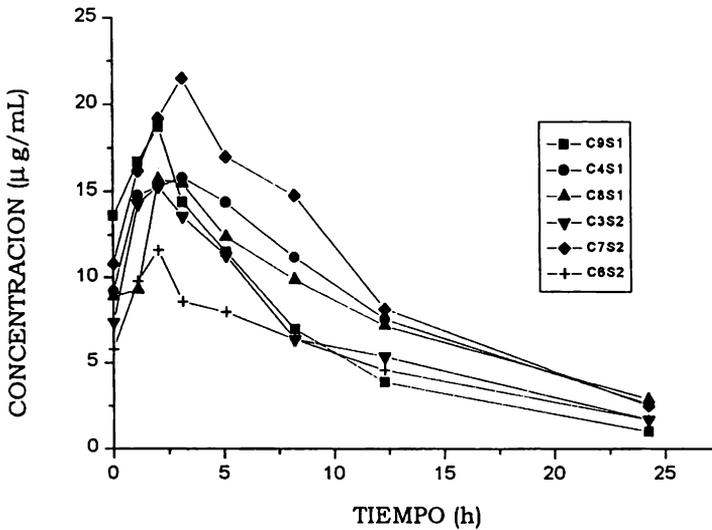
N.C.= No cuantificable.

Valores individuales de concentración plasmática de **DFH** a los diferentes tiempos de muestreo para los conejos a los cuales se les administró DFH+HEPP.

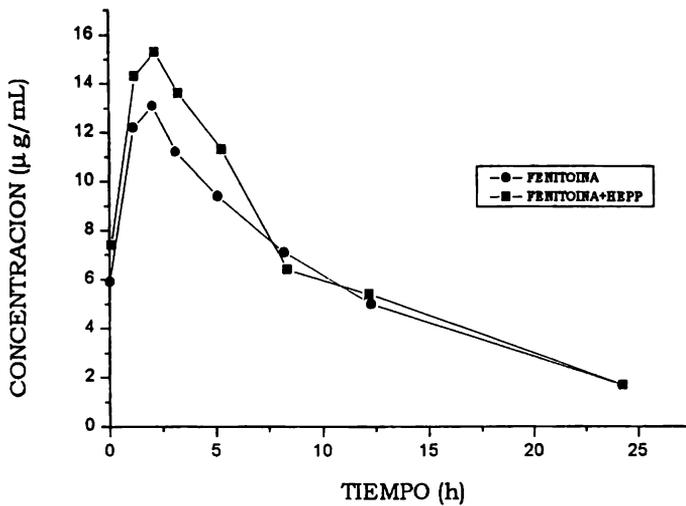
Tiempo (h)	Concentración plasmática ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )					
	Conejo 9	Conejo 4	Conejo 8	Conejo 3	Conejo 7	Conejo 6
0.09	13.6	9.2	8.9	7.4	10.8	5.8
1.38	16.7	14.8	9.3	14.3	16.2	9.8
2.19	18.7	15.3	15.7	15.3	19.2	11.6
3.33	14.4	15.8	15.5	13.6	21.5	8.6
5.34	11.5	14.4	12.4	11.3	17.0	8.0
8.34	7.0	11.2	9.9	6.4	14.8	6.4
12.43	3.9	7.6	7.2	5.4	8.2	4.6
24.09	N.C.	2.6	2.9	N.C.	2.5	N.C.



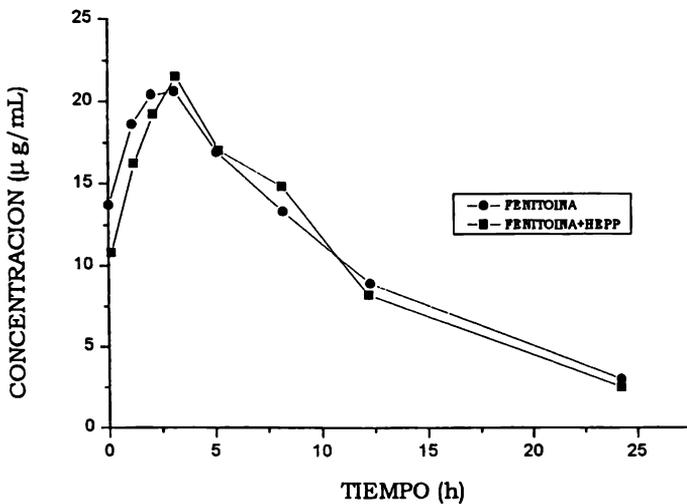
Perfil de concentración plasmática vs tiempo de **DFH** en los 6 conejos a los cuales se les administró DFH.



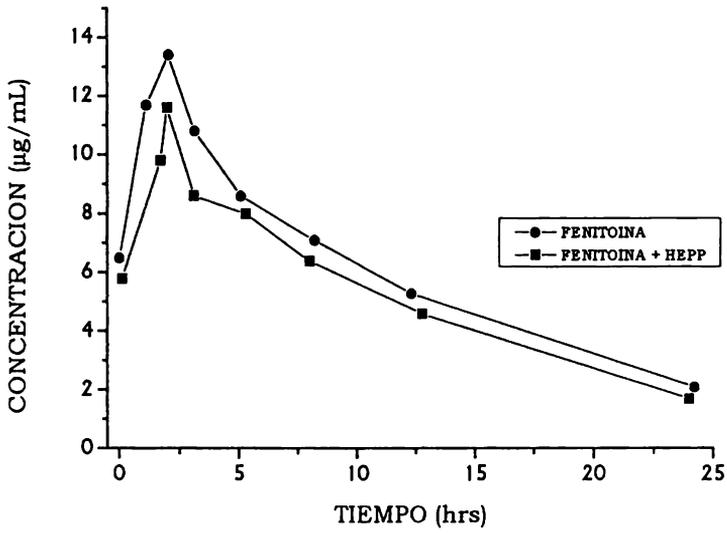
Perfil de concentración plasmática vs tiempo de **DFH** en los 6 conejos a los cuales se les administró DFH+HEPP.



Perfil comparativo de concentración plasmática vs tiempo de **DFH** para el conejo 3 al cual le fueron administrados ambos tratamientos: ●→DFH; ■→DFH+HEPP.



Perfil comparativo de concentración plasmática vs tiempo de **DFH** para el conejo 7 al cual le fueron administrados ambos tratamientos: ●→DFH; ■→DFH+HEPP.



Perfil comparativo de concentración plasmática vs tiempo de **DFH** para el conejo 6 al cual le fueron administrados ambos tratamientos: ●→DFH; ■→DFH+HEPP.

Parámetros farmacocinéticos individuales de **DFH** en los 6 conejos a los cuales se les administró DFH.

<b>Conejo</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→t</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→α</b>	<b>t ½</b>	<b>TMR</b>
<b>3</b>	149.7115	268.5995	7.7171	7.0628
<b>7</b>	259.2705	292.4931	7.6744	12.6604
<b>6</b>	145.8635	173.3864	9.0826	12.9204
<b>2</b>	121.4500	130.0930	5.9896	9.0259
<b>1</b>	204.6450	230.0875	7.6659	11.0433
<b>5</b>	227.9295	244.7735	6.1436	9.9712
<b>PROMEDIO</b>	184.8117	217.7017	7.3789	10.4473
<b>D.S.</b>	53.9635	54.4866	1.1526	2.2392
<b>C.V.%</b>	29.1992	25.0281	15.6205	21.4337

Parámetros farmacocinéticos individuales de **DFH** en los 6 conejos a los cuales se les administró DFH+HEPP.

<b>Conejo</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→t</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→α</b>	<b>t ½</b>	<b>TMR</b>
<b>9</b>	161.8555	169.4027	7.5326	7.6787
<b>4</b>	212.5470	240.8097	8.7060	11.3787
<b>8</b>	195.1125	231.5447	7.1223	13.0291
<b>3</b>	160.4990	177.9707	6.6699	10.3280
<b>7</b>	250.0460	274.1076	8.7280	10.2029
<b>6</b>	126.2485	147.6591	7.1113	12.5572
<b>PROMEDIO</b>	184.3848	206.9154	7.6450	10.8624
<b>D.S.</b>	43.9944	49.0437	0.8741	1.9334
<b>C.V.%</b>	23.8601	23.7023	11.4333	17.7989

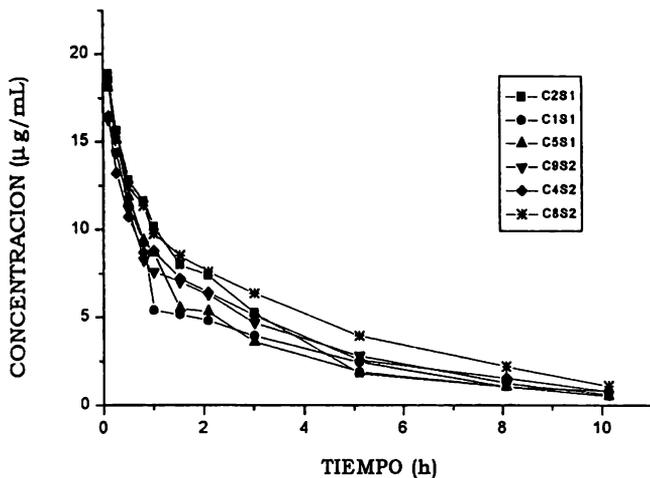
### APENDICE III.

Valores individuales de concentración plasmática de **HEPP** a los diferentes tiempos de muestreo para los conejos a los cuales solo se les administró HEPP.

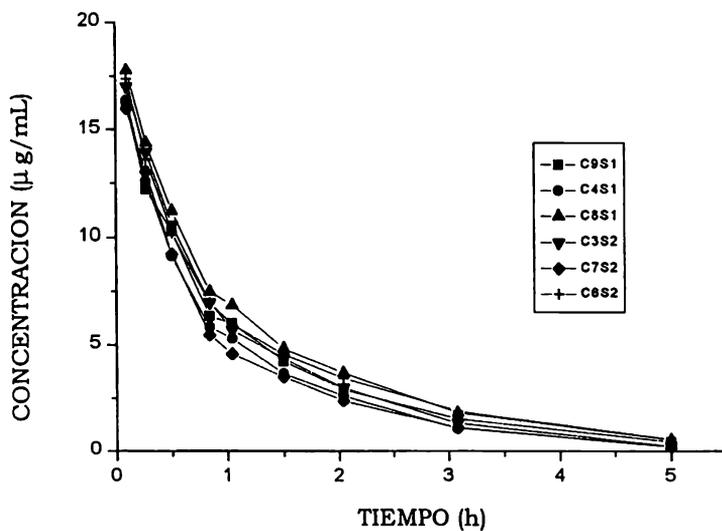
Tiempo (h)	Concentración plasmática ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Conejo 2	Conejo 1	Conejo 5	Conejo 9	Conejo 4	Conejo 8
0.11	18.8595	18.4381	18.0745	16.2519	16.4788	18.4023
0.27	15.6299	14.3429	15.0738	14.3653	13.1988	15.5016
0.51	12.7764	11.3818	11.8347	11.1494	10.7125	12.4198
0.81	11.5803	9.2291	9.3640	8.2261	8.6845	11.3416
1.02	10.1516	5.3819	8.6647	7.5851	8.7698	9.7639
1.54	7.9706	5.1501	5.4989	7.0196	7.2104	8.5084
2.10	7.3810	4.7948	5.3077	6.2881	6.4045	7.5914
3.03	5.2400	3.9243	3.5927	4.6730	5.0991	6.3589
5.11	1.8021	2.4474	1.9096	2.8084	2.5539	3.9436
8.09	1.0584	1.0373	1.0346	1.2502	1.5358	2.1873
10.14	0.5171	0.7989	0.5229	0.6183	0.7890	1.0850

Valores individuales de concentración plasmática de **HEPP** a los diferentes tiempos de muestreo para los conejos a los cuales se les administró HEPP+DFH.

Tiempo (h)	Concentración plasmática ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Conejo 9	Conejo 4	Conejo 8	Conejo 3	Conejo 7	Conejo 6
0.10	16.2400	16.3613	17.7785	17.0101	15.972	17.3796
0.27	12.2036	12.5786	14.3714	13.9537	13.024	13.6040
0.50	10.2889	9.1449	11.2033	10.5676	9.2380	10.2219
0.85	6.3285	5.8274	7.4685	6.9805	5.4490	6.9622
1.04	5.9879	5.2872	6.8565	5.6781	4.5638	5.9268
1.50	4.2278	3.6530	4.8180	4.3445	3.4913	4.5575
2.04	2.9103	2.6109	3.6756	2.9802	2.3815	3.4309
3.08	1.5239	1.0731	1.8051	1.3253	1.1098	1.8940
5.00	0.4382	N.D.	0.5478	N.D.	N.D.	0.5635

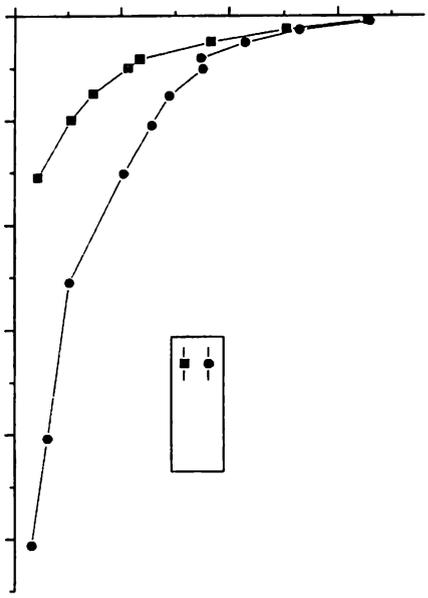


Perfil de concentración plasmática vs tiempo de **HEPP** en los 6 conejos a los cuales solo se les administró HEPP.

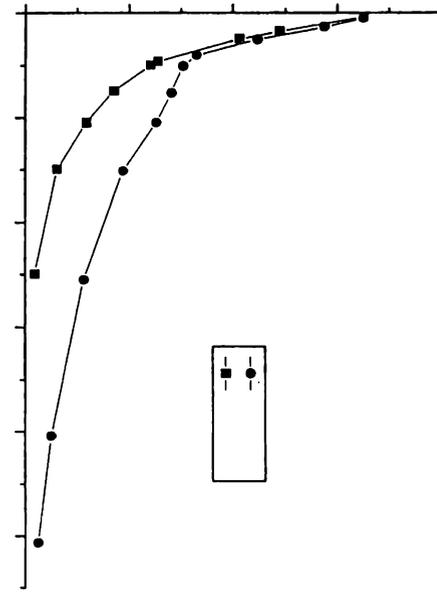


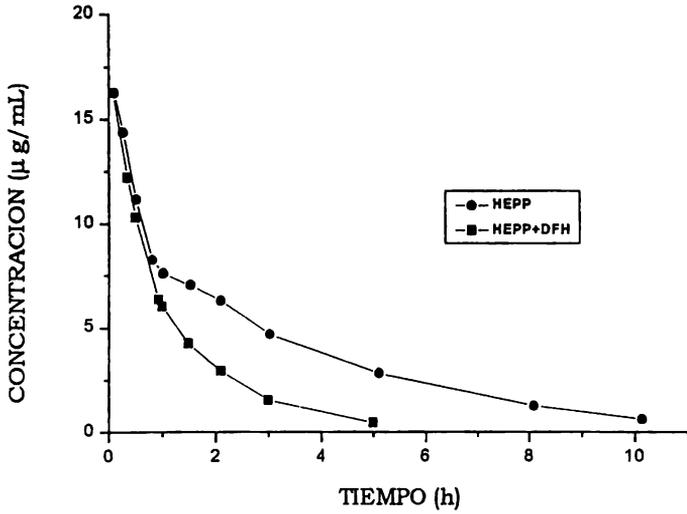
Perfil de concentración plasmática vs tiempo de **HEPP** en los 6 conejos a los cuales se les administró HEPP+DFH.

CONCENTRACION ( $\mu\text{g/mL}$ )

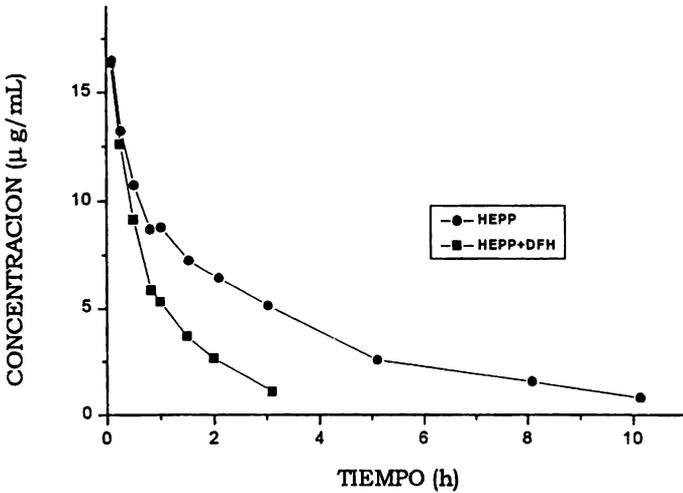


CONCENTRACION ( $\mu\text{g/mL}$ )

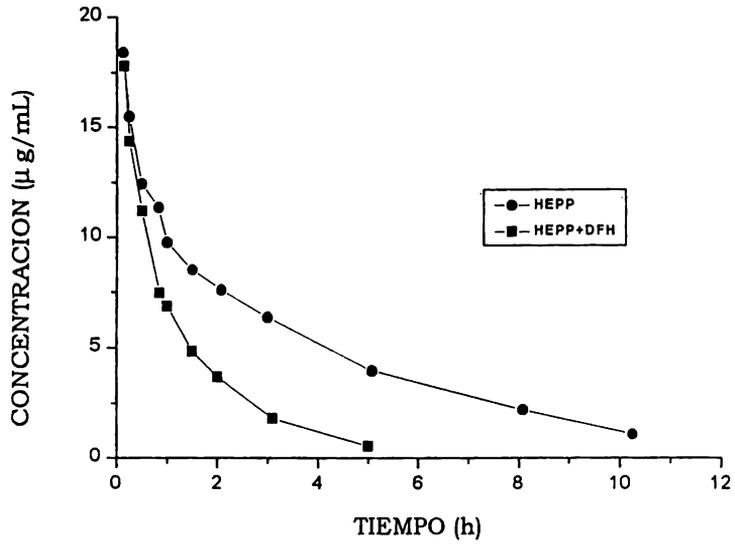




Perfil comparativo de concentración plasmática vs tiempo de **HEPP** para el conejo 9 al cual le fueron administrados ambos tratamientos: ●→HEPP; ■→ HEPP + DFH.



Perfil comparativo de concentración plasmática vs tiempo de **HEPP** para el conejo 4 al cual le fueron administrados ambos tratamientos: ●→HEPP; ■→ HEPP + DFH.



Perfil comparativo de concentración plasmática vs tiempo de **HEPP** para el conejo 8 al cual le fueron administrados ambos tratamientos: ●→HEPP; ■→ HEPP + DFH.

Parámetros farmacocinéticos individuales de **HEPP** en los 6 conejos a los cuales solo se les administró HEPP.

<b>Conejo</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→t</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→α</b>	<b>t <math>\frac{1}{2}\beta</math></b>	<b>TMR</b>	<b>Cp°</b>
<b>2</b>	40.8337	42.4649	2.1861	2.8833	21.3135
<b>1</b>	34.1743	37.6952	3.0542	3.8739	19.9781
<b>5</b>	34.9738	36.7591	2.3660	3.0512	20.0099
<b>9</b>	39.6776	42.1051	2.7208	3.5043	20.5076
<b>4</b>	40.9318	44.0479	2.7370	3.7367	23.2800
<b>8</b>	51.5507	56.3032	3.0355	4.1553	23.2112
<b>PROMEDIO</b>	40.3570	43.2292	2.6833	3.5341	21.3834
<b>D.S.</b>	6.2213	7.0134	0.3504	0.4899	1.5213
<b>C.V.%</b>	15.4157	16.2236	13.0572	13.8620	7.1142

Parámetros farmacocinéticos individuales de **HEPP** en los 6 conejos a los cuales se les administró HEPP + DFH.

<b>Conejo</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→t</b>	<b>ABC<sub>0</sub>→α</b>	<b>t <math>\frac{1}{2}\beta</math></b>	<b>TMR</b>	<b>Cp°</b>
<b>9</b>	18.8148	19.4815	1.0545	1.3878	19.6895
<b>4</b>	15.0533	16.5964	0.9965	1.2582	18.8208
<b>8</b>	19.5949	20.4655	1.1014	1.3389	22.9871
<b>3</b>	17.0882	18.9842	0.9914	1.3525	21.8913
<b>7</b>	14.5868	16.1523	0.9776	1.2503	18.1005
<b>6</b>	20.2208	21.1533	1.1468	1.5306	19.8558
<b>PROMEDIO</b>	17.5598	18.8056	1.0447	1.3530	20.2242
<b>D.S.</b>	2.3724	2.0335	0.0684	0.1025	1.8609
<b>C.V.%</b>	13.5104	10.8134	6.5476	7.5719	9.2012