



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO.

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS.**

**ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE LAMOTRIGINA.**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. JANETH ALEJANDRA GARCIA ALCALDE.



TUTOR: HELGI JUNG COOK. AÑO: 2007.



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.

## ***Agradecimientos.***

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico recibido.

Al laboratorio patrocinador de este estudio, por el soporte económico recibido

A los voluntarios que participaron en el estudio.

Al Dr. Briceño, al Dr. Ocampo, al Dr. González, a la Dra. Jung, al CP. Garduño, a Nelly Ayala y a Luz Ma Monroy por el invaluable apoyo y amabilidad brindados en la realización de este proyecto. Gracias.

A mis compañeros y amigos Nancy Vara, Thania Jiménez, Cristina Fonseca, Juli Valdivia, Ricardo Sánchez, Isabel Ruiz, Adriana Aguilar y Ranferi Ramírez por todo su trabajo, ayuda, disposición, enseñanzas, tiempo y por todo el apoyo que me brindaron para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Álvaro Peña y al Dr Ricardo Sánchez por su incondicional apoyo, cariño, atenciones, disposición y comprensión en todo momento. Muchísimas gracias.

A Sandra, Litza, Diana, Irma, Martha, Sergio, Jaime, Moncho, Aarón, Jesús, Fernando y Alex por la incondicional amistad y apoyo en todo momento. Gracias.

A mi familia por impulsarme siempre a seguir adelante y formar parte de mis logros y de mi vida. Por todo el amor y apoyo. Muchas gracias.

**Este trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.**

*Dedicatoria.*

*A mi familia y amigos.*

## ÍNDICE.

<b>Resumen.</b>	vi
Lista de tablas.	x
Lista de figuras.	xii
<b>1. Introducción.</b>	1
Objetivos.	2
<i>Objetivo general.</i>	2
<i>Objetivos particulares.</i>	2
Hipótesis.	2
<b>2. Generalidades.</b>	3
2.1 Epilepsia.	3
2.2 Tratamiento de la epilepsia.	8
<b>3. Lamotrigina.</b>	10
3.1 Descripción.	10
3.2 Nombre.	10
3.3 Fórmula química.	10
3.4 Propiedades fisicoquímicas.	11
3.4.1 <i>Solubilidad.</i>	11
3.4.2 <i>Constante de acidez y absorción UV.</i>	11
3.4.3 <i>Clasificación biofarmacéutica y dosis letal 50.</i>	11
3.5 Farmacodinamia.	12
3.6 Farmacocinética.	13
<i>Absorción</i>	13
<i>Distribución.</i>	13
<i>Metabolismo.</i>	14
<i>Eliminación.</i>	15
<i>Régimen de dosificación.</i>	16
<i>Poblaciones especiales.</i>	17
<i>Interacciones farmacocinéticas</i>	17
<i>Efectos adversos.</i>	18
<i>Precauciones y advertencias.</i>	19
<i>Contraindicaciones.</i>	20
<i>Sobredosificación.</i>	20
3.7 Métodos analíticos reportados para la cuantificación de lamotrigina en plasma.	21

3.8 Estudios de Biodisponibilidad.	24
3.8.1 <i>Tipos de estudios de biodisponibilidad.</i>	24
3.8.2 <i>Principales parámetros farmacocinéticos.</i>	26
<b>4. Metodología experimental.</b>	<b>28</b>
4.1 Método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma.	28
4.1.1 <i>Material y equipo.</i>	28
4.1.2 <i>Reactivos.</i>	28
4.1.3 <i>Estándares.</i>	29
4.1.4 <i>Soluciones.</i>	29
4.1.5 <i>Extracción en fase sólida para las muestras de plasma.</i>	31
4.1.6 <i>Condiciones cromatográficas.</i>	32
4.1.7 <i>Validación del método analítico.</i>	32
4.1.7.1 <i>Selectividad.</i>	35
4.1.7.2 <i>Linealidad.</i>	35
4.1.7.3 <i>Precisión.</i>	36
4.1.7.4 <i>Exactitud.</i>	37
4.1.7.5 <i>Recuperación absoluta (% Recobro).</i>	38
4.1.7.6 <i>Influencia de la dilución de la muestra.</i>	38
4.1.7.7 <i>Límite de cuantificación.</i>	39
4.1.7.8 <i>Límite de detección.</i>	39
4.1.7.9 <i>Estabilidad.</i>	40
4.2 Estudio de Biodisponibilidad.	43
4.2.1 <i>Medicamentos utilizados.</i>	43
4.2.2 <i>Voluntarios.</i>	43
4.2.2.1 <i>Criterios de inclusión.</i>	43
4.2.2.2 <i>Criterios de exclusión.</i>	44
4.2.3 <i>Modelo estadístico y diseño experimental.</i>	44
4.2.4 <i>Protocolo de estudio.</i>	46
4.2.5 <i>Análisis de muestras.</i>	48
4.2.6 <i>Análisis de datos.</i>	48
<b>5. Resultados y discusión.</b>	<b>49</b>
5.1 Método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma.	49
5.2 Validación del método analítico.	49
5.2.1 <i>Selectividad.</i>	49
5.2.2 <i>Linealidad.</i>	51
5.2.3 <i>Precisión.</i>	53
5.2.4 <i>Exactitud.</i>	54
5.2.5 <i>Recuperación absoluta (% Recobro).</i>	55
5.2.6 <i>Influencia de la dilución de la muestra.</i>	56
5.2.7 <i>Límite de cuantificación.</i>	56
5.2.8 <i>Límite de detección.</i>	57
5.2.9 <i>Estabilidad.</i>	57

5.3 Estudio de Biodisponibilidad.	63
5.3.1 <i>Características demográficas de los voluntarios que participaron en el estudio.</i>	63
5.3.2 <i>Farmacocinética.</i>	64
5.3.2.1 <i>Niveles de lamotrigina en el estado estacionario.</i>	64
5.3.2.2 <i>Parámetros farmacocinéticos.</i>	71
5.3.3 <i>Análisis estadístico de los datos.</i>	74
5.3.4 <i>Biodisponibilidad.</i>	75
<b>6. Conclusiones.</b>	78
<b>7. Perspectivas.</b>	79
<b>8. Referencias.</b>	80
Apéndice A. Carta de consentimiento informado.	86
Apéndice B. Dieta proporcionada a los pacientes los días de estudio.	88
Apéndice C. Calendario de crisis y efectos adversos.	89
Apéndice D. Registro de toma de muestras.	90
Apéndice E. Entrega y recepción de muestras.	91
Apéndice F. Separación y almacenamiento.	92
Apéndice G. Cromatogramas representativos de voluntarios a los diferentes tiempos.	93
Apéndice H. Gráficos de concentración plasmática de LTG vs tiempo, en el estado estacionario.	95

## Lista de tablas.

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las convulsiones epilépticas.	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los síndromes epilépticos.	7
<b>Tabla 3.</b> Parámetros reportados de absorción de lamotrigina.	13
<b>Tabla 4.</b> Tiempo de vida media de la lamotrigina después de la administración conjunta con otros fármacos.	16
<b>Tabla 5.</b> Métodos analíticos para cuantificar LTG en plasma empleando extracción líquido-líquido.	22
<b>Tabla 6.</b> Métodos analíticos para cuantificar LTG en plasma empleando extracción en fase sólida.	23
<b>Tabla 7.</b> Parámetros farmacocinéticos en estudios de bioequivalencia de productos conteniendo lamotrigina.	27
<b>Tabla 8.</b> Preparación de la curva de calibración.	30
<b>Tabla 9.</b> Preparación de los puntos control.	30
<b>Tabla 10.</b> Parámetros y criterios establecidos por la NOM-177-SSA-1998 y por la guía para la validación de métodos bioanalíticos de la FDA.	33
<b>Tabla 11.</b> Diseño del estudio.	45
<b>Tabla 12.</b> Horario de actividades correspondiente al periodo 1 o 2.	47
<b>Tabla 13.</b> Selectividad del método.	51
<b>Tabla 14.</b> Linealidad del método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma.	52
<b>Tabla 15.</b> Curvas patrón para la linealidad.	52
<b>Tabla 16.</b> Repetibilidad del método.	53
<b>Tabla 17.</b> Reproducibilidad del método.	54
<b>Tabla 18.</b> Exactitud del método para la cuantificación de lamotrigina.	55
<b>Tabla 19.</b> Recobro absoluto de LTG en los tres niveles de concentración.	55
<b>Tabla 20.</b> Influencia de la dilución de la muestra.	56
<b>Tabla 21.</b> Repetibilidad en el Límite de cuantificación.	57
<b>Tabla 22.</b> Estabilidad a largo plazo.	58
<b>Tabla 23.</b> Estabilidad en 3 ciclos de congelación-descongelación.	59
<b>Tabla 24.</b> Estabilidad a corto plazo.	60
<b>Tabla 25.</b> Estabilidad de la solución estándar de LTG en refrigeración (5 - 7 °C).	61
<b>Tabla 26.</b> Estabilidad de la solución estándar de DZP en refrigeración (5 - 7 °C).	61
<b>Tabla 27.</b> Datos demográficos de los voluntarios.	63



<b>Tabla 28.</b> Concentraciones plasmática promedio de lamotrigina $\pm$ DS, en estado estacionario después de la administración de ambos tratamientos (n=16).	64
<b>Tabla 29.</b> Concentraciones plasmáticas individuales después de la administración de ambos tratamientos.	66
<b>Tabla 30.</b> Concentraciones plasmáticas individuales ajustadas a dosis con ambos tratamientos.	67
<b>Tabla 31.</b> Parámetros farmacocinéticos ajustados por dosis, con ambos tratamientos en estado estacionario.	71
<b>Tabla 32.</b> Análisis de varianza de los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos logarítmicos.	75
<b>Tabla 33.</b> Resultados del análisis de biodisponibilidad.	76

## Lista de figuras.

<b>Figura 1.</b> Fórmula estructural de la lamotrigina.	10
<b>Figura 2.</b> Espectros de LTG (5 µg/ml) dependiendo del pH utilizado.	11
<b>Figura 3.</b> Inactivación del canal de Na <sup>+</sup> , intensificada por el fármaco anticonvulsivo.	12
<b>Figura 4.</b> Diagrama de flujo para la preparación de las muestras.	31
<b>Figura 5.</b> Cromatograma de un blanco de plasma.	50
<b>Figura 6.</b> Cromatograma típico de una muestra plasmática adicionada de LTG (4 µg/ mL) $t_r = 4.971$ y DZP (40 µg/mL) $t_r = 9.722$ .	50
<b>Figura 7.</b> Curvas de linealidad de lamotrigina en plasma.	52
<b>Figura 8.</b> Niveles plasmáticos promedio de lamotrigina vs tiempo en el estado estacionario, durante el tratamiento A y B (n=16).	65
<b>Figura 9.</b> Relación entre la C <sub>max</sub> /D y los medicamentos concomitantes.	69
<b>Figura 10.</b> Variabilidad intra e inter individual en la C <sub>max</sub> de lamotrigina.	72
<b>Figura 11.</b> Variabilidad intra e inter individual en la ABC <sub>0-∞</sub> de lamotrigina.	72
<b>Figura 12.</b> Comparación entre tratamientos individual para C <sub>max</sub> ajustado por dosis.	73
<b>Figura 13.</b> Distribución de los datos residuales del ABC <sub>0-12h</sub> (homocedasticidad).	73

## RESUMEN.

La lamotrigina es un antiepiléptico, que ha demostrado ser equivalente en eficacia a la fenitoína y carbamazepina, siendo superior en tolerabilidad a esta última en adultos y ancianos. Además, este fármaco es útil en el tratamiento de crisis de ausencia en niños con diagnóstico reciente.

A la fecha no existen estudios de farmacocinética de lamotrigina en población mexicana. Así mismo, no existe información acerca de la biodisponibilidad de las formulaciones existentes en el mercado nacional, por lo que en el presente trabajo se determinaron los niveles de lamotrigina en el estado estacionario y se evaluó la biodisponibilidad relativa de un producto de liberación modificada

El estudio se llevó a cabo en pacientes ambulatorios, de acuerdo a un diseño cruzado, aleatorizado, doble ciego. Los pacientes se dividieron de forma aleatoria en dos grupos. Al grupo 1 se le administró durante 7 días el producto innovador, mientras que al grupo 2, se le administró el producto de prueba durante el mismo período de tiempo. Al octavo día se tomaron muestras sanguíneas de la siguiente manera: muestra blanco (antes de la administración del medicamento) y a las 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas posteriores a la administración. Este mismo día, se le proporcionó el nuevo tratamiento a seguir durante los siguientes 7 días, es decir, al grupo 1 el producto de prueba, en tanto que al grupo 2 se le proporcionó el producto de referencia. El décimo quinto día se tomaron muestras sanguíneas a los mismos tiempos de muestreo que en el primer período. Las muestras se cuantificaron utilizando un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, el cual fue previamente desarrollado y validado.

Al evaluar los parámetros farmacocinéticos en población mexicana, después de la administración de ambos productos, se encontró que existe una gran variabilidad interindividual tanto en los parámetros, como en los niveles plasmáticos. El producto innovador presenta valores de  $C_{max_{ee}}$  en el rango de 1.84 - 25.55  $\mu\text{g/mL}$ , un  $C_{min_{ee}}$  de 0.51 - 21.97  $\mu\text{g/mL}$ , un  $C_{prom_{ee}}$  de 1.44 - 23.52  $\mu\text{g/mL}$  y un  $ABC_{0-t}$  oscilando entre 17.3 - 282.2  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . En cuanto al producto de prueba, los valores de  $C_{max_{ee}}$  van desde 1.07 hasta 25.83  $\mu\text{g/mL}$ , presentando un  $C_{min_{ee}}$  de 0.59 - 20.89  $\mu\text{g/mL}$ , un  $C_{prom_{ee}}$  entre 0.52 - 23.19  $\mu\text{g/mL}$  y un  $ABC_{0-t}$  de 6.27 - 278.32  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . A pesar de que el producto de prueba se presenta como de liberación prolongada, la fluctuación encontrada en este estudio es similar a la del producto de liberación inmediata, siendo de 48.78% para el innovador y de 55.14 % para el de prueba.

Los resultados del estudio de biodisponibilidad, mostraron que aun cuando los valores promedio de  $C_{max_{ee}}$  y  $ABC_{0-12h}$  fueron semejantes, la gran variabilidad inter e intra individual existente, impactó la estimación del intervalo de confianza al 90 %, por lo que los resultados no fueron concluyentes, destacando la necesidad de llevar a cabo un estudio en voluntarios sanos, que permitan controlar las variables externas.

## 1. INTRODUCCIÓN.

La epilepsia se caracteriza por presentar una regulación anormal de la excitabilidad neuronal que se manifiesta como crisis epilépticas, las cuales son recurrentes y no provocadas. Se calcula que tiene una incidencia de 50 casos por cada 100 000 personas, considerándose un problema de salud pública en todo el mundo y especialmente en Latino América, Caribe y algunos países de África [1,2,3].

Actualmente, existe una gran variedad de fármacos antiepilépticos conocidos como tradicionales y nuevos. Entre los fármacos tradicionales se encuentran la carbamazepina, la fenitoína, el fenobarbital, la primidona, la etosuccimida, el clonazepam así como el ácido valpróico, mientras que en el grupo de los fármacos nuevos se encuentran la lamotrigina, el felbamato, la gabapentina, el topiramato, la tiagabina, la vigabatrina y la oxcarbamazepina [4,5].

De entre estos últimos, la lamotrigina es una fenil triazina [6] que ha demostrado ser equivalente en eficacia a la fenitoína [7] e incluso superior a la carbamazepina [8]. Se considera que es un antiepiléptico de amplio espectro, presentando mayor tolerancia en adultos y ancianos [9]. Además, este fármaco es útil en el tratamiento de niños con crisis de ausencia de reciente diagnóstico [10] y en trastorno bipolar con eventos de manías, hipomanías y depresión [6]. Su uso puede ser en monoterapia o combinado con otros fármacos y su dosificación puede ser una o dos veces al día de acuerdo con la necesidades del paciente.

A pesar de que existen en el mercado diferentes presentaciones farmacéuticas conteniendo lamotrigina como principio activo, no existen estudios de farmacocinética en población mexicana. Así mismo, no se tiene información acerca de la biodisponibilidad de la formulación de liberación controlada existente en el mercado nacional conteniendo este fármaco.

Con base en lo anterior se llevó a cabo el presente estudio, cuyos objetivos fueron:

## **OBJETIVOS.**

### ***Objetivo general.***

- Llevar a cabo un estudio piloto para determinar la biodisponibilidad relativa de un producto de liberación controlada conteniendo lamotrigina, en pacientes con diagnóstico de epilepsia.

### ***Objetivos particulares.***

- Desarrollar y validar un método bioanalítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma humano.
- Determinar los niveles de lamotrigina en estado estacionario en población mexicana.

## **HIPÓTESIS.**

Ho: Existen diferencias estadísticamente significativas en la biodisponibilidad de los productos, en pacientes con diagnóstico de epilepsia.

Ha: No existen diferencias estadísticamente significativas en la biodisponibilidad de los productos, en pacientes con diagnóstico de epilepsia.

## **2. GENERALIDADES.**

### **2.1 Epilepsia.**

Se denomina “epilepsia” a un trastorno de la función cerebral, que se caracteriza por el surgimiento periódico e impredecible de ataques recurrentes y breves de la función motora, sensorial o psíquica [4]. Estos ataques, llamados *crisis epilépticas*, se refieren a un trastorno transitorio de la conducta, causado por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de poblaciones enteras de neuronas cerebrales. De acuerdo con la Liga Internacional Contra la Epilepsia (LICE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), es una afección crónica que tiene manifestaciones clínicas variadas de origen multifactorial [3,11].

Durante la activación neuronal, se estimula el envío de impulsos nerviosos por las vías de conducción de esas neuronas, dando como resultado sensaciones visuales, olfatorias o auditivas, cuando en realidad no existe el estímulo correspondiente. Por añadidura, los músculos del sujeto afectado, tienden a contraerse involuntariamente teniendo una duración promedio menor a dos minutos. A su vez estas *crisis convulsivas*, se asocian a anomalías encefalográficas y se presentan de manera no provocada [3,11].

La expresión clínica de estas crisis epilépticas se conoce como crisis convulsivas. Se considera que se originan en la corteza cerebral, y no en otras estructuras del sistema nervioso central (SNC) como tálamo, tallo encefálico o cerebelo [4].

A su vez, el término epilepsia representa un conjunto de síndromes de diferente pronóstico que aparecen en un 50 % en la infancia y en adultos mayores [1,3]. La tasa de prevalencia de la epilepsia es más alta en países subdesarrollados, principalmente en niños. Esto se debe a una variedad de factores de riesgo tales como una nutrición pobre en calorías y proteínas, la falta de atención médica durante el embarazo y el parto, las infecciones y el trauma de cráneo.

La epilepsia es también un factor importante que contribuye al desarrollo de discapacidades en los niños, con alta incidencia de problemas emocionales y consecuencias físicas, psicológicas, sociales y económicas. Además, las tasas de mortalidad son cuatro veces más altas en adultos jóvenes con epilepsia, que en la población general [3].

Las crisis convulsivas se clasificaron desde 1981 en: crisis *parciales*, que se inician de manera focal en un sitio cortical y en crisis *generalizadas*, que abarcan con amplitud ambos hemisferios desde el principio [4,11]. Las crisis convulsivas, suelen producir alteración transitoria del estado de conciencia. Una crisis parcial *simple*, se vincula con la preservación del estado de conciencia y pueden ser sensoriales, motoras, autonómicas y psíquicas. Una crisis parcial *compleja* conlleva un déficit transitorio de la conciencia como por ejemplo la desconexión o automatismo y puede o no tener periodo posictal caracterizado por somnolencia, fatiga o confusión. Por otra parte, las crisis generalizadas, se caracterizan por una pérdida total del estado de alerta como son las ausencias, las atónicas, las tónicas, las clónicas, las tónico clónicas y las mioclónicas, estas últimas caracterizadas por una actividad eléctrica hemisférica bilateral, pero sin pérdida de del estado de alerta. En la tabla 1 se presenta información más detallada acerca de los tipos de convulsiones, sus características y su tratamiento farmacológico [4,11,12].

Las crisis parciales constituyen un 60% de todas las formas de epilepsia. La causa consiste, con mayor frecuencia, en una lesión de alguna parte de la corteza, como tumor, malformación, lesión por traumatismo entre otras. En cambio las crisis generalizadas, suelen ser de origen genético y constituyen el 40% de todas las formas de epilepsia.

**Tabla 1. Clasificación de las convulsiones epilépticas [4,11].**

<b>Tipo de convulsión</b>	<b>Características</b>	<b>Anticonvulsivos clásicos</b>	<b>Fármacos anticonvulsivos de creación reciente</b>
<b>CONVULSIONES PARCIALES:</b>			
Parciales simples.	Diversas manifestaciones que dependen de la región de la corteza activada por la crisis convulsiva ( <i>p. ej.</i> , si la corteza motora representa al pulgar izquierdo, se producen sacudidas de dicho dedo; si la corteza somatosensorial representa al pulgar izquierdo, se producirán parestesias del pulgar izquierdo) que duran aproximadamente 20 a 60 s. El aspecto clave es la conservación del conocimiento.	Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, primidona, valproato.	Gabapentina, lamotrigina.
Parciales complejas.	Pérdida del conocimiento que dura 30 s a 2 min en muchos casos aunado a movimientos propositivos, como chasquear los labios o agitar la mano.	Carbamazepina, fenobarbital, fenitoína, primidona, valproato.	Gabapentina, lamotrigina.
Parciales con convulsiones tónico clónicas generalizadas de manera secundaria.	La convulsión simple o parcial compleja evoluciona hasta convulsión tonicoclónica, con pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen periodos de contracción muscular alternada con periodos de relajación (convulsiones clónicas), que en su forma característica duran uno a dos minutos.	Carbamazepina, fenobarbital, fenitoína, primidona, valproato.	Gabapentina, lamotrigina.
<b>CONVULSIONES GENERALIZADAS:</b>			
Crisis de ausencia.	Inicio repentino de pérdida del conocimiento, aunado a mirada fija e interrupción de las actividades que se estaban efectuando, y que dura de manera característica menos de 30 segundos.	Clonazepam, etosuccimida, valproato.	Lamotrigina.
Convulsión mioclónica.	Contracción muscular breve (quizá de un segundo de duración) de tipo choque eléctrico, ya sea circunscrita a parte de una extremidad, o generalizada.	Valproato.	
Convulsión tonicoclónica.	Lo mismo que en el caso de las convulsiones parciales con convulsiones tónico clónicas generalizadas de manera secundaria, salvo que no van precedidas por una convulsión parcial.	Carbamazepina, fenobarbital, fenitoína, primidona, valproato.	



Además de la clasificación de crisis epilépticas, existe otra que especifica los *síndromes epilépticos*, es decir grupos de síntomas que suelen concurrir y que incluyen tipo de convulsión, causa, edad de inicio y otros factores [4,11,12]. Se han identificado más de 40 tipos de síndromes epilépticos. Sin embargo, esta clasificación, realizada desde 1989, es una herramienta que es utilizada con frecuencia por la sencillez en su diferenciación, donde se incluyen cuatro tipos principales: los relacionados con su localización, los generalizados, los no determinados como parciales o generalizados en forma precisa y los síndromes especiales. La diferencia fundamental entre ellos es que se presentan en edad dependiente, como sería el caso de los síndromes de Ohtahara, West, Lennox-Gastaut, entre muchos otros. En la tabla 2, se encuentra la clasificación de los síndromes epilépticos.

**Tabla 2. Clasificación de los síndromes epilépticos [11,12].**

<i>Síndromes epilépticos relacionados con su localización.</i>	
Idiopática.	Epilepsia benigna de la infancia con puntas centro temporales. Epilepsia de la niñez con paroxismos occipitales. Epilepsia primaria de la lectura.
Sintomática.	Epilepsia parcial, continua, progresiva y crónica (Kojewnikow). Crisis desencadenadas por factores específicos de precipitación. Otras epilepsias y síndromes epilépticos con base en su etiología o localización.
Criptógena.	
<i>Síndromes epilépticos generalizados.</i>	
Idiopáticas. (agrupados por edad de inicio)	Crisis neonatales familiares benignas. Crisis neonatales benignas. Epilepsia mioclónica benigna de la infancia. Ausencias en la niñez. Ausencias juveniles. Epilepsia mioclónica de Janz. Epilepsia con crisis tónico clónicas generalizadas al despertar. Otras epilepsias generalizadas idiopáticas no definidas. Epilepsias con crisis precipitadas por factores específicos (fotosensibles).
Criptógena y/o sintomática.	Síndrome de West (espasmo masivo infantil). Síndrome de Lennox-Gastaut. Epilepsia con crisis astaticomioclónicas (Dosse). Epilepsia con ausencias y mioclónicas.
Sintomática.	Etiología inespecífica. Encefalopatía mioclónica temprana. Encefalopatía mioclónica temprana con brotes de supresión. Otras epilepsias generalizadas sintomáticas no definidas. Síndromes específicos.
<i>Síndromes indeterminados como focales o generalizados.</i>	
Con crisis parciales y generalizadas.	Crisis neonatales. Epilepsia severa mioclónica de la infancia. Epilepsia con complejos P-O en sueño lento. Afasia epiléptica adquirida (Landau-Kleffner).
<i>Síndromes especiales.</i>	
Crisis relacionadas con situaciones especiales.	Crisis febriles. Crisis que sólo ocurren en eventos metabólicos o de intoxicación. Epilepsia con complejos P-O en sueño lento. Afasia epiléptica adquirida (Landau-Kleffner).
	Crisis aisladas o relacionadas con estado epiléptico

## **2.2 Tratamiento de la epilepsia.**

Dependiendo del tipo de crisis epiléptica o del síndrome epiléptico, se elige el fármaco para el tratamiento (tabla 1) [13]. El tratamiento es sintomático, puesto que, aún cuando los fármacos disponibles inhiben las crisis, no se cuenta con una profilaxis eficaz, ni con métodos de curación [13,14]. Es importante destacar que aunque la epilepsia es un trastorno potencialmente controlable, en la mayoría de las familias de los países menos desarrollados el tratamiento se retrasa debido a la falta de acceso a los medios de diagnóstico. Se ha reportado que las tres cuartas partes de los afectados no reciben un tratamiento apropiado [3].

Para poder iniciar el tratamiento, se requiere caracterizar el tipo de crisis convulsiva y a partir de ésta, observar si cumple con criterios para un síndrome epiléptico, de este se puede decidir el tratamiento más adecuado. El manejo inicial de la epilepsia es generalmente con fármacos antiepilépticos y en los casos refractarios se puede recurrir a la prescripción de una dieta cetogénica, a una cirugía de epilepsia, a la estimulación del nervio vago o bien, al uso de fármacos experimentales. Aproximadamente un 70% de los pacientes con epilepsia requieren de un solo fármaco antiepiléptico para su control y sólo el 5 % de las epilepsias serán refractarias a tratamiento médico y de difícil control [14,15].

Existe una amplia gama de fármacos antiepilépticos (FAE) llamados de primera línea, tal es el caso de la carbamazepina (CBZ), el valproato de magnesio, la fenitoína, entre otros. Sin embargo, durante la última década del siglo XX, se aprobaron muchos nuevos antiepilépticos conocidos como de segunda generación, que demostraron características anticonvulsivas eficaces desde el punto de vista terapéutico. Estos últimos fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) entre los que podemos encontrar la lamotrigina, el felbamato, la gabapentina, el topiramato y la tiagabina [16].

Estos fármacos difieren en estructura y mecanismo de acción de los antiepilépticos de primera generación y en la actualidad han adquirido una gran importancia. De entre ellos, la lamotrigina fue aprobada para crisis primarias generalizadas de tipo tónico clónicas en adultos y niños a partir de 2 años de edad [16]. Sin embargo, también ha mostrando eficacia en pacientes con síndrome de Lennox-Gastaut [5,17], en crisis parciales refractarias [5,8], recientemente en trastorno bipolar [6,18-20] y crisis de ausencias [10,18].

### 3. LAMOTRIGINA.

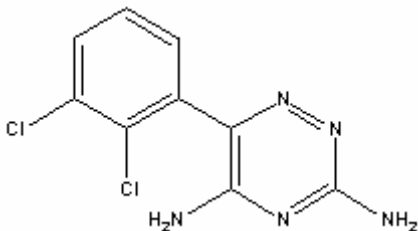
#### 3.1 Descripción.

La lamotrigina (LTG) es un polvo color crema o blanco con punto de fusión 177 - 181 °C. Es estable a temperatura ambiente y su almacenamiento se recomienda entre 2 - 8 °C [21].

#### 3.2 Nombre [22].

- Nombre genérico: Lamotrigina (LTG).
- Nombre químico: 3,5-diamino-6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina.
- Nombres comerciales a nivel nacional: Lamictal (Glaxo-Smith-Klein), Lamdra SBK 12 (Bioquimed) y Protalgine (Probiomed).

#### 3.3 Fórmula química.



**Figura 1. Fórmula estructural de la lamotrigina.**

Fórmula condensada: C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>

Peso molecular: 256.0938 g/mol [22].

### 3.4 Propiedades fisicoquímicas.

#### 3.4.1 Solubilidad.

Es completamente soluble en acetonitrilo, en metanol y en acetato de etilo. Su solubilidad en DMSO es de 20 mg/mL a 60 °C y en HCl 0.1 M es de 4.1 mg/mL [23].

#### 3.4.2 Constante de acidez (pKa) y absorción al UV.

El pKa del compuesto es de 5.7. En la figura 2, se puede observar que la absorción en ultravioleta presenta diferentes máximos dependiendo del pH del medio en el que se encuentre [24].

pH	$\lambda_{\max}$
< 4.5	268 nm
> 5.7	299 nm
> 6.8	310 nm

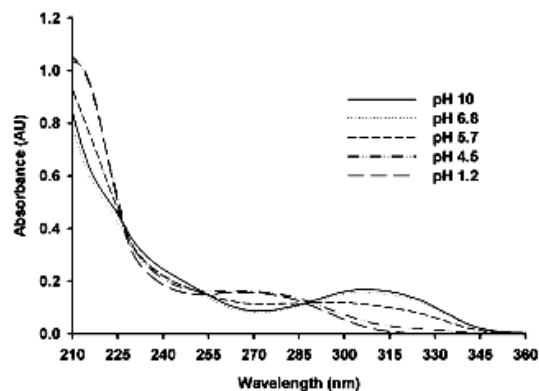


Figura 2. Espectros de LTG (5 µg/ml) dependiendo del pH utilizado [24].

#### 3.4.3 Clasificación biofarmacéutica y dosis letal 50.

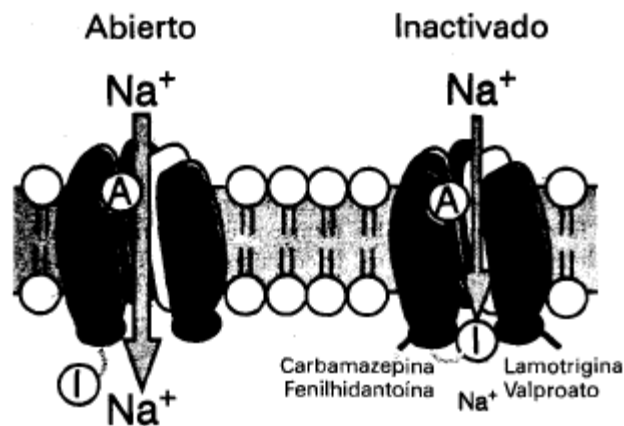
De acuerdo con la Clasificación Biofarmacéutica, la lamotrigina entra dentro de los fármacos clase II, es decir, es de alta permeabilidad y baja solubilidad, presentando un log P de 2.54 [25].

La lamotrigina presenta una dosis letal 50 entre 250 >DL<sub>50</sub>> 640 mg/Kg [22].

### 3.5 Farmacodinamia.

Sintetizada por primera vez en 1970 e introducida al mercado estadounidense en 1994 [6,16], la lamotrigina se considera un antiepiléptico de amplio espectro [13,17]. Esta indicada en el tratamiento de la epilepsia en pacientes adultos tanto en monoterapia como en politerapia, así como en niños. Se usa en crisis parciales [5,8], crisis con generalización tónico clónica secundaria [26], crisis primarias generalizadas tónico clónicas [5,16], trastorno bipolar [6,18-20], prevención de los episodios depresivos en pacientes con trastorno bipolar [6,20], así como manías e hipomanías en este trastorno [6] y como coadyuvante en pacientes con síndrome de Lennox-Gastaut [5,17].

El mecanismo de acción de la LTG no ha sido aún totalmente dilucidado. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la LTG actúa bloqueando los canales de sodio voltaje dependiente (figura 3), estabilizando las membranas neuronales y modulando la liberación de neurotransmisores presinápticos excitatorios, tales como glutamato y aspartato [18,27]. Sin embargo, también ha demostrado modulación en los canales de calcio voltaje dependiente [6,27,28].



**Figura 3. Inactivación del canal de Na<sup>+</sup>, intensificada por el fármaco anticonvulsivo [4].**

### 3.6 Farmacocinética.

La lamotrigina (LTG) exhibe una cinética lineal. Se ha demostrado que existe proporcionalidad entre la dosis administrada y la concentración en plasma en el rango de 5 - 700 mg, siendo esta última la dosis más alta evaluada [5,18,29].

#### **Absorción.**

La LTG, se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal al ser una base lipofílica débil, demostrando una biodisponibilidad (BD) del 100 % [18,24,29,30]. Su absorción se ve afectada por los alimentos [31]. El tiempo aproximado para alcanzar la concentración máxima es entre 1 - 3 horas, después de la administración de la dosis [29]. En la tabla 3 se presentan los valores de los parámetros de absorción más menos desviación estándar ( $\pm$  DS) obtenidos en diferentes estudios [31-33].

**Tabla 3. Parámetros reportados de absorción de lamotrigina.**

<b>Autor</b>	<b>Dosis</b>	<b>ABC (<math>\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Cmax (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>Tmax (h)</b>
Sharma <i>et al.</i> [31]	Única 100 mg	21.98 $\pm$ 1.58	1.99 $\pm$ 0.19	3.11 $\pm$ 0.33
Lardizabal <i>et al.</i> [32]	Única 500 mg	-	8.2 $\pm$ 6.5	3.1 $\pm$ 2.1
Doose <i>et al.</i> [33]	Múltiple 400 mg	76.5 $\pm$ 40.2	8.31 $\pm$ 3.79	2.15 $\pm$ 1.44

-: No especificado.

#### **Distribución.**

La unión de LTG a proteínas plasmáticas es de alrededor del 55 % [5,6,30,34]. El volumen de distribución es de 1.25 a 1.47 L/kg en individuos sanos [29].



### ***Metabolismo.***

La LTG presenta metabolismo hepático de fase II, catalizado por el sistema de enzimas uridin 5'-difosfato-glucuronosil transferasas, conocidas como UDPs o UGTs por sus siglas en inglés. Dentro de ellas, específicamente la UGT1A4 es la encargada de llevar a la lamotrigina a sus metabolitos: 2-N-glucorónido como metabolito mayoritario (70 %), 5-N-glucurónido (10%), 2-N-metilo (0.14%) y otros no identificados (4 %). Todos los metabolitos son eliminados en orina y no presentan actividad farmacológica [6,29,30,34-36].

No hay evidencia de que interaccione con las enzimas del citocromo P450 en hígado, por lo que no afecta el metabolismo hepático de fármacos metabolizados por esta vía, como lo son antiepilépticos tradicionales como el valproato de magnesio, la carbamazepina, la primidona, nuevos antiepilépticos como el felbamato y la tiagabina y algunos otros fármacos como la warfarina, la teofilina y anticonceptivos orales. Tampoco afecta a fármacos eliminados vía renal. Al presentar un menor número de interacciones, la lamotrigina presenta una ventaja en cuanto a su uso y efectividad en combinación con otros fármacos. Además, no se ha demostrado que tenga un metabolismo saturable [29,35].

Se ha reportado que el fármaco induce su propio metabolismo en un grado moderado, después de 2 semanas puede relacionarse con una reducción del 17 % en su concentración plasmática dependiendo de la dosis, sin embargo se ha observado que ello no tiene relevancia clínica [5,6,29,36].

Se tiene evidencia que antiepilépticos como fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, primidona, metilsuccimida, barbitúricos y otros fármacos como la rifampicina, el acetaminofén, el ritonavir y anticonceptivos conteniendo estrógenos, aumentan el metabolismo de la lamotrigina, disminuyendo su concentración plasmática y aumentando su depuración [6,29,35,36]. Por el contrario, el valproato de magnesio y la sertralina reducen el metabolismo del fármaco por inhibición de

las enzimas de la glucoronidación, disminuyendo su depuración y aumentando su concentración plasmática [5,6,34-36]. Su depuración también se ve afectada al padecer cirrosis severa, decrementándola substancialmente. Por lo que se ha sugerido el monitoreo terapéutico de la lamotrigina al usarse concomitantemente con inductores e inhibidores y/o el ajuste del régimen de dosificación respectivo [5,6,34,35].

Además, se ha observado gran variabilidad intersujeto, en la capacidad de metabolización de la lamotrigina, reflejándose en la depuración de cada individuo, a pesar de que la relación entre dosis y área bajo la curva se mantenga lineal [29].

### ***Eliminación.***

Se excreta principalmente en orina como N-glucurónido conjugado. Dado a su extenso metabolismo a metabolitos inactivos, sólo 10 % se excreta inalterado en orina y el 2 % en heces. En adultos sanos, el valor de depuración es de 38.5 mL/min [29].

La vida media ( $t_{1/2}$ ) en un adulto sano se encuentra entre 24.1 y 35 h, sin embargo se ha reportado un decremento del 25 % de la vida media y del área bajo la curva en el estado estacionario, debido a la posible autoinducción de su biotransformación [5,29,36]. Además, su tiempo de vida media se ve afectado por los fármacos que inhiben o inducen a las enzimas hepáticas encargadas de la glucoronidación [5,29,35,36]. En la tabla 4 se presentan los valores de vida media encontrados al administrar la lamotrigina conjuntamente con inductores o inhibidores de las uridin 5'-difosfato-glucuronosil transferasas (UGTs).

**Tabla 4. Tiempo de vida media de la lamotrigina después de la administración conjunta con otros fármacos.**

<b>Fármacos.</b>	<b>t<sub>1/2</sub></b>
<b>LTG monoterapia.</b>	24 h
<b>LTG + inductores enzimáticos.</b> (Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, primidona, metilsuccimida, barbitúricos).	14 h
<b>LTG + inhibidores enzimáticos.</b> (Valproato de magnesio).	> 60 h

### ***Régimen de dosificación.***

La dosis de LTG varía entre 5 a 15 mg/kg/día, el rango comúnmente utilizado va entre 300 - 500 mg/día. Sin embargo, una dosis de hasta 700 mg/día ha sido bien tolerada, cuando ésta se ha ido aumentando gradualmente [5,34]. En pacientes bajo tratamiento con valproato de magnesio, generalmente la dosis es de 150 mg/día.

Se ha propuesto un rango terapéutico de 1 - 4 µg/mL sin embargo algunos pacientes toleran concentraciones mayores a 10 µg/mL sin presentar toxicidad clínica [29,35,37]. En algunos casos también se ha reportado un rango de efectividad entre 2 - 20 µg/mL, sin presentar toxicidad [5]. Algunos autores sugieren el monitoreo terapéutico para asegurar su efectividad y evitar su toxicidad e interacciones [29,34,35]

En adultos, las dosis orales de 200 a 500 mg/día son efectivas y bien toleradas en el tratamiento de convulsiones parciales de la siguiente manera [29,34,35]:

- *Monoterapia: dosis inicial:* 25 mg/día por 2 semanas, luego 50 mg/día por 2 semanas, incrementos de 50 mg/día cada 12 semanas hasta alcanzar la

respuesta terapéutica. *Dosis de mantenimiento:* de 100 a 200 mg/día divididos en 2 tomas.

- *Terapia adyuvante, dosis inicial:* 50 mg dos veces al día (100 mg/día) durante 1 a 2 semanas. *Dosis de mantenimiento:* 100 a 200 mg una o dos veces al día (200 a 400 mg/día).
- *Dosis máxima:* 500 mg/día.

### ***Poblaciones especiales.***

En niños de 2 a 12 años, la LTG se administra una dosis de 2 a 15 mg/kg dividida en 2 tomas. Este rango de dosis es efectivo en convulsiones parciales complejas y crisis de ausencia atípicas [29].

Se ha encontrado que en niños con un peso menor a 30 kg, la depuración se ve aumentada. En niños de 10 meses a 5.3 años se ha reportado una vida media de 19 h, de 7.7 h con inductores enzimáticos y de 44.9 h con valproato de magnesio. En niños entre 6 y 12 años, el tiempo de vida media es menor o igual a 10 h [6,29]. Aún no se ha establecido la seguridad y la eficacia de la lamotrigina en niños menores de 2 años [29].

En adultos mayores, la concentración máxima aumenta en un 27 %, el área bajo la curva se ve aumentada en un 55 % y la depuración disminuida en 35 %, con respecto al adulto joven, reportando una vida media de 31 h en monoterapia [29].

### ***Interacciones farmacocinéticas.***

La administración conjunta de lamotrigina con CBZ o bien con oxcarbamazepina, no afecta significativamente las concentraciones plasmáticas de estos fármacos. Sin embargo, se ha observado que aumenta sus reacciones adversas, produciendo alteraciones en el sistema nervioso central, mareos, ataxia, diplopía,

visión borrosa y náuseas, lo cual sugiere que existe una interacción farmacodinámica entre estos fármacos en el sitio del receptor [5,6,29,34,38].

El acetaminofén interactúa con la lamotrigina aumentando la eliminación urinaria de esta última. Se ha demostrado que en voluntarios sanos, una dosis de 900 mg, incrementa en un 15 % la depuración de la lamotrigina [5,29,36]. La rifampicina y el ritonavir también han demostrado aumentar la eliminación del fármaco [36].

El uso de anticonceptivos conteniendo estrógenos y de rifampicina, incrementan la depuración de lamotrigina, por lo que las concentraciones plasmáticas se disminuyen en un 32 % y el área bajo la curva en un 52 % [6,34].

Se ha demostrado que la lamotrigina es un inhibidor débil de la dihidrofolato reductasa, encargada de la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato. La inhibición de esta enzima, puede interferir en la biosíntesis de ácidos nucleicos, por lo que no debería administrarse conjuntamente con medicamentos que inhiban el metabolismo del folato [6,30,34].

### ***Efectos adversos.***

Durante las primeras 8 semanas de tratamiento, se ha reportado la aparición de reacciones adversas cutáneas, que en su mayoría han sido de naturaleza leve y resolución espontánea. No obstante, también se han reportado casos aislados de erupciones cutáneas graves, rash cutáneo generalizado, eritematoso, morbidiforme, de riesgo potencial para la vida, incluyendo necrólisis epidérmica tóxica, que requirieron hospitalización y la discontinuación de la LTG [5,34]. Numerosos casos con síndrome de Stevens-Johnson han sido reportados en los últimos años, relacionados principalmente con el aumento brusco de la dosis de lamotrigina [39]. Estas reacciones adversas se han presentado más en niños que en adultos y el uso concomitante con ácido valpróico aumenta su incidencia [5,34].

Los efectos adversos más comunes son diplopía (14 %), vértigo (14 %), somnolencia (13 %), dolor de cabeza (12 %), ataxia (11 %), astenia (10 %), erupciones de la piel (3%) y erupción alérgica generalizada (2.3 %) [5,6,29].

Otros efectos adversos son visión borrosa, inestabilidad, cansancio, molestias gastrointestinales, irritabilidad, agresión, temblor, agitación, anormalidades hemáticas transitorias y confusión.

La LTG no mostró riesgo genético en el hombre en un amplio número de pruebas de mutagenicidad. Además, estudios en ratas y ratón indicaron que tampoco es carcinogénico [34].

Ensayos realizados en animales mostraron que la LTG no altera la fertilidad. Este fármaco demostró tener menor riesgo de malformaciones severas durante el primer trimestre en 414 mujeres embarazadas: 2.9 % vs 3.3 % - 4.5% en comparación con otros fármacos antiepilépticos [40]. Sin embargo, recientemente se ha asociado la exposición de bebés durante los primeros tres meses de embarazo a lamotrigina, con la gran posibilidad de que el bebé presente labio o paladar hendido [39].

### ***Precauciones y advertencias.***

Se ha encontrado que dosis altas de lamotrigina, pueden estar asociadas con una alta incidencia de rash cutáneo lo que obliga la suspensión del tratamiento. La interrupción brusca de lamotrigina puede provocar crisis de rebote, por lo que se recomienda la reducción de las dosis en etapas durante un período de dos semanas [6,29,34].

En pacientes con alteraciones renales o hepáticas (cirrosis severa, hepatitis), la dosis debe de ajustarse, ya que la depuración se ve considerablemente reducida y

por ende existe acumulación de los metabolitos de lamotrigina, a pesar de que su concentración plasmática sea similar a la detectada en pacientes sanos [34,41].

No se recomienda administrarlo a mujeres embarazadas, excepto en aquellos casos en que el beneficio para la madre supera el riesgo potencial para el feto. Dado que durante el embarazo, la depuración de la lamotrigina puede aumentar más del 50 % y disminuir después del parto, es importante el monitoreo terapéutico antes, durante y después del embarazo [36,39,40].

La LTG llega a la leche materna en una proporción de 40 % - 45 % de la concentración plasmática; los lactantes amamantados recibieron dosis equivalentes a 1.06 - 1.75 mg/kg/día sin que se observaran efectos adversos [39,40].

### ***Contraindicaciones.***

Hipersensibilidad o intolerancia a la lamotrigina.

### ***Sobredosificación.***

Los signos y síntomas de sobredosis incluyen nistagmo, ataxia, mareo, somnolencia, cefalea, vómitos ó coma. El tratamiento consiste en terapia de mantenimiento adecuada, supervisión de signos vitales y lavado gástrico [34].

### **3.7 Métodos analíticos reportados para la cuantificación de lamotrigina en plasma.**

Se revisaron los artículos reportados en la literatura internacional para la cuantificación de lamotrigina en plasma, que utilizan cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En la tabla 5 se presenta un resumen cronológico de algunos estos métodos analíticos propuestos, en los que se presentan diferentes opciones de extracción líquido-líquido o precipitación de proteínas [24,26,42-44]. Otros autores [45-47] proponen extracción en fase sólida, los cuales se presentan en la tabla 6.



**Tabla 5. Métodos analíticos para cuantificar LTG en plasma empleando extracción líquido-líquido [24,26,42-44].**

<b>Autor</b>	<b>Columna</b>	<b>Fase móvil</b>	<b>Flujo (mL/min) y λ (nm)</b>	<b>Estándar Interno</b>	<b>Extracción</b>	<b>Rango (µg/mL)</b>	<b>%Recobro promedio</b>	<b>T<sub>r</sub> (min)</b>	<b>Dosis (mg/día)</b>	<b>Modelo</b>	<b>Niveles en plasma (µg/mL)</b>
Cheng <i>et al.</i> 2005	Sílica	CH <sub>3</sub> CN / [0.2% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 0.3% TEA (pH 2.7)] = 84/16	1 / 225	Guanabenz	NaOH + Dietil éter	0.1 - 5	75.3	6	4 / i.v.	Rata	0.11 - 19.4
Castel-Branco <i>et al.</i> 2001	C18	CH <sub>3</sub> OH/0.1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.4)/TEA=35/64.7/0.3	1 / 306	BW725C78	Acetato de etilo	0.1 - 15	82.05	6.7	-	Humano	0.1 - 14.46
Barbosa and Midio 2000	C18	CH <sub>3</sub> OH/0.1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /TEA = 43.5/56/0.01	0.8 / 306	BW725C	Acetato de etilo	0.5 -1.0	86.14	8.10	400	Humano	0.3 - 9
Angelis-Stoforidis <i>et al.</i> 1999	C8	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O/0.5 M fosfato (pH 6.5) = 20/79/1	1.6 / 306	BWA725C	Acetonitrilo	1 - 20	≥ 99	9.3	150 – 600	Humano	1.19 - 20.5
Londero and Greco 1997	Difenil	CH <sub>3</sub> CN/0.3% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3.5) = 30/70	1.2 / 265	BWA725C	Cloroformo/ Isopropanol/ H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 - 20	59.8	4.3	50-350	Humano	0.21 - 20.86

:- No especificado.

**Tabla 6. Métodos analíticos para cuantificar LTG en plasma empleando extracción en fase sólida [45-47].**

Autor	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min) y λ (nm)	Estándar Interno (E.I.)	Cartucho	Extracción	Rango (µg/mL)	% Recobro promedio	t <sub>r</sub> (min)	Dosis (mg/día)	Modelo
Franceschi and Furlanut 2005	C18	H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> -COOH/ (pH 4.2) =72.5/15/12.5/0.6	1.2 / 214	Cyheptamida	StepBio Isolute C8 EC (200 mg, 3 mL)	1) Activar con MeOH y H <sub>2</sub> O. 2) 500 µL muestra + 500 µL acetato de amonio + E.I. 3) Lavar con H <sub>2</sub> O. 4) Eluir con MeOH. 5) Evaporar y reconstituir en 200 µL H <sub>2</sub> O/ACN (3/1), inyectar 50 µL.	0.3 - 80	95.78 - 102.54	4.5	-	Humano
Bugamelli <i>et al.</i> 2002	C18	CH <sub>3</sub> CN/CH <sub>3</sub> OH / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.3% TEA (pH 3.0) = 19.2/16.8/64	1/ 237	Desmetil clozapina	Waters Oasis HLB (30 mg, 1mL)	1) Activar con MeOH y H <sub>2</sub> O. 2) 250 µL muestra + 500 µL H <sub>2</sub> O + E.I. 3) Lavar con H <sub>2</sub> O, dos veces. 4) Eluir con MeOH. 5) Evaporar y reconstituir en 1mL de fase móvil, inyectar 40 µL.	2 - 40	-	2.5	-	Humano
Yamashita <i>et al.</i> 1995	C18	CH <sub>3</sub> CN/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +octasulfonato de sodio (SOS) pH 3.5 = 27/73	1 / 265	Acetaminida	Bond Elut (1 mL)	1) Activar con MeOH y K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 3.5/SOS. 2) 100 µL muestra + 800 µL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 3.5/SOS + E.I. 3) Lavar con K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 3.5/SOS. 4) Eluir con MeOH. 5) Inyectar 40 µL.	0.5 - 40	86 - 107	10.3	400	Humano

### **3.8 Estudios de Biodisponibilidad [48-50].**

La *biodisponibilidad* (BD) es la medida de la cantidad de fármaco que llega a la circulación sistémica y la velocidad a lo cual esto ocurre.

El acceso de un fármaco a la circulación sistémica depende de una serie de factores inherentes a sus propiedades fisicoquímicas, a sus características farmacocinéticas, a la forma de dosificación que lo contiene, a la capacidad de ser liberado de esta forma de dosificación, a la velocidad de liberación y al sustrato biológico al que va destinado (factores fisiológicos y patológicos del mismo). Para que un fármaco pueda absorberse, debe liberarse de la forma farmacéutica que lo contiene, disolverse previamente en la zona anatómica en que se encuentra y acceder, generalmente por difusión, al lugar de absorción.

El principal objetivo de los estudios de BD, es aportar la información necesaria en aquellas situaciones en las que es importante conocer la velocidad y cantidad del fármaco inalterado, que pasa a circulación sistémica. De manera particular, la determinación de la BD de un fármaco en una forma de dosificación diseñada, se puede utilizar como control de calidad de la forma de dosificación o bien, con la finalidad de comprobar si se presentan modificaciones de éste parámetro, al modificar su proceso de fabricación o forma farmacéutica.

#### **3.8.1 Tipos de estudios de biodisponibilidad [50].**

Dentro de los estudios de BD, existe la determinación de BD absoluta, de la BD relativa y la Bioequivalencia (BE), que corresponden a las siguientes definiciones.

- a) Biodisponibilidad *absoluta* ( $F_{absoluta}$ ). En ésta se compara el producto en solución contra la formulación por vía intravenosa (*i.v.*). Generalmente, esta BD se debe determinar cuando se trata de un fármaco nuevo (producto

innovador), con pretendida actividad sistémica. De esta manera, comparando la vía *i.v.* vs la oral (en solución), se conoce la cantidad que llegará a la circulación sistémica, teniendo en cuenta la dosis (D). De modo que el valor de  $F_{\text{absoluta}}$  puede quedar entre  $0 < F < 1$  y se puede calcular:

$$F_{\text{absoluta}} = \frac{ABC_{0-\infty} \text{ sol}}{ABC_{0-\infty} \text{ i.v.}} \times \frac{D_{\text{i.v.}}}{D_{\text{solución}}}$$

b) Biodisponibilidad *relativa* ( $F_{\text{relativa}}$ ). En ésta se comparan formulaciones o productos administrados por diferentes vías extravasculares o diferentes formas farmacéuticas. En estos casos, hay parámetros que dependen y varían con la velocidad como lo son  $C_{\text{max}}$  y  $T_{\text{max}}$ , sin embargo la cantidad ( $ABC_{0-\infty}$ ) debería de ser semejante, por lo que, si tomáramos como ejemplo la comparación entre tabletas y grageas, tendríamos que:

$$F_{\text{relativa}} = \frac{ABC_{0-\infty} \text{ tabs}}{ABC_{0-\infty} \text{ grags}} \times \frac{D_{\text{grags}}}{D_{\text{tabs}}}$$

c) *Bioequivalencia* o biodisponibilidad *comparativa*. En esta determinación, se comparan equivalentes farmacéuticos, es decir, se pueden comparar productos con la misma dosis farmacéutica, misma forma farmacéutica y la misma sal. En este caso se espera que parámetros como  $C_{\text{max}}$ ,  $T_{\text{max}}$  y  $ABC_{0-\infty}$  se mantengan igual, ya que tanto la velocidad, como la cantidad son semejantes.

De los diversos objetivos y parámetros enunciados, se desprende el carácter eminentemente aplicado a los estudios de BD y el papel que juegan en el desarrollo de nuevos fármacos y en el diseño de nuevas formas de dosificación.

### **3.8.2 Principales parámetros farmacocinéticos [48,49].**

Dado que la BD puede determinarse a partir de las curvas de niveles plasmáticos, y teniendo en cuenta que puede determinarse a partir de la administración de dosis únicas, o en condiciones de estado estacionario, tras un régimen posológico de dosis múltiples. Los parámetros farmacocinéticos que se aplican al presente estudio de biodisponibilidad relativa se exponen a continuación.

1. El área bajo la curva en el estado estacionario (**ABC<sub>0-12h</sub>**), es una forma de medir la cantidad de fármaco obtenida en el intervalo de tiempo determinado.
2. La concentración plasmática máxima en el estado estacionario (**C<sub>max,ee</sub>**).
3. La concentración plasmática mínima en el estado estacionario (**C<sub>min,ee</sub>**).
4. La concentración plasmática promedio en el estado estacionario (**C<sub>prom,ee</sub>**).
5. La fluctuación entre la concentración máxima y la concentración mínima en el estado estacionario: **100 x (C<sub>max,ee</sub>-C<sub>min,ee</sub>) / C<sub>prom,ee</sub>**.
6. El tiempo en el cual se alcanza la concentración plasmática máxima en el estado estacionario (**T<sub>max,ee</sub>**).

En la literatura internacional se encuentran algunos artículos reportando este tipo de estudios, a partir del vencimiento de la patente de la lamotrigina en el mercado internacional. En la tabla 7 podemos apreciar los parámetros farmacocinéticos encontrados al evaluar la bioequivalencia entre el producto de prueba propuesto y el innovador. Estos estudios se han llevado a cabo principalmente, en el Reino Unido y en los países bajos [51].

**Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos en estudios de bioequivalencia de productos conteniendo lamotrigina [51].**

Producto	País	Dosis (mg)	Forma farmacéutica	Fecha	Tratamiento con 200 mg	ABC <sub>0-t</sub>	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub> (h)
UKPAR	Reino Unido	25, 50, 100, 200	Tableta.	5 / II / 2007	Prueba	130.36 ± 34.47 µg·h/L	3.16 ± 0.41 µg/mL	1.93 ± 0.97
					Referencia	125896.59 ± 29.25 µg·h/L	3.01 ± 0.48 µg/mL	2.34 ± 1.37
					IC 90 %	99.05 – 106.75	101.52 - 110.08	-
Actavis Lamotrigine (Alpharma)	Países bajos	25, 50, 100, 200	Tableta.	19 / I / 2007	Prueba	129.90 ± 32.41 µg·h/L	2.70 ± 0.46 µg/mL	245 ± 1.35
					Referencia	133.35 ± 28.09 µg·h/L	2.87 ± 0.57 µg/mL	2.72 ± 2.74
					IC 90 %	100.376 – 107.153	100.41 – 111.31	-
Lamotrigine (Bristol)	Reino Unido	25, 50, 100, 200	Tableta.	XI / 2006	Prueba	113.150.3 ± 21.39 µg·h/L	3.40 ± 0.54 µg/mL	1.89 ± 1.12
					Referencia	114.5312 ± 20.82 µg·h/L	3.28 ± 0.56 µg/mL	2.03 ± 1.44
					IC 90 %	95.90 – 102.34	96.81 – 110.55	-
Sandoz	Países bajos	25, 50, 100, 200	Tableta	21 / VI / 2006	Prueba	79.1 ± 20.1 mg·h/L	2.7 ± 0.6 mg/ mL	1.84
					Referencia	79.4 ± 23.5 mg·h/L	2.6 ± 0.5 mg/mL	2.25
					IC 90 %	0.93 – 1.06	0.98 – 1.11	-
Lamotrigine (Clarendon Pharma)	Reino Unido	2, 5, 25, 50, 100, 200	Tableta dispersable.	28 / X / 2005	Prueba	9482.30 ng·h/mL	250.12 ng/mL	1.50 ± 0.77
					Referencia	9523.40 ng·h/mL	253.27 ng/mL	1.53 ± 0.95
					IC 90 %	93.45 – 109.83	92.94 – 108.63	-

ABC<sub>0-t</sub>: Área bajo la curva en el intervalo de dosificación, C<sub>max</sub>: Concentración máxima, T<sub>max</sub>: Tiempo en el que se alcanza la C<sub>max</sub>, BE: Bioequivalencia, -: No especificado.

## **4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.**

### **4. 1 Método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma.**

#### **4.1.1 Material y equipo.**

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Hewlett Packard automatizado, serie 1050.
- Detector UV-VIS de longitud de onda variable.
- Bomba cuaternaria con sistema de degasificación por helio.
- Inyector automático modelo 1100 (G1313A).
- Computadora HP.
- Balanza analítica Sartorius, modelo i 1800.
- Centrífuga Beckman, modelo TJ-6.
- Agitador Vórtex Thermolyne Maxi Mix II, modelo M37615.
- Cartuchos SPE Strata C18-E.
- Potenciómetro.
- Milli-Q Water System Millipore con membrana de 0.45 µm de porosidad.
- Micropipetas automáticas Gibson.
- Repipeteador electrónico Eppendorf.
- Columna Zorbax SB-C18 de 5 µm, 250 x 4.6 mm (Agilent Technologies).

#### **4.1.2 Reactivos.**

- Acetonitrilo grado HPLC, J. T. Baker (ACN).
- Acetonitrilo grado reactivo, J. T. Baker (ACN R.A.).
- Metanol R.A., J. T. Baker.
- Agua HPLC obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q-Waters System.
- Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), R.A. (J. T. Baker. Lote X51C03).
- Nitrógeno industrial (N<sub>2</sub>).

#### **4.1.3 Estándares.**

- Estándar secundario certificado de lamotrigina, Bioquimed (LTG).
- Estándar secundario certificado de diazepam, estándar interno (DZP).
- Plasma humano libre de pirógenos y con sello de sangre segura para las pruebas de VDRL, VIH y hepatitis.

#### **4.1.4 Soluciones.**

##### **- Disolución amortiguadora de fosfatos 0.025 M pH 6.5 y 7.5.**

Transferir 4.35 g de fosfato de potasio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) a un matraz volumétrico de 1 L, disolver y llevar a volumen con agua desionizada. Ajustar pH a 6.5 o a pH 7.5 con  $H_3PO_4$ .

##### **- Disolución estándar de lamotrigina 400 $\mu$ g/mL (C1).**

Transferir 0.010 g de lamotrigina a un matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 600  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) y llevar a volumen con ACN R.A.

##### **- Disolución estándar de diazepam 400 $\mu$ g/mL.**

Transferir 0.010 g de diazepam a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con ACN R.A.

##### **- Disolución de lamotrigina 200 y 50 $\mu$ g/mL (C2, C3).**

Hacer una dilución 1:2 transfiriendo 12.5 mL de la disolución estándar de lamotrigina a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con ACN R.A. De esta nueva disolución transferir 6.25 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con ACN R.A.



**- Disolución estándar de diazepam 40 µg/mL.**

Transferir 1 mL de la disolución estándar de diazepam a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo ACN R.A.

**- Preparación de la curva de calibración en ACN.**

De la disolución de lamotrigina conteniendo 50 µg/mL, se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 8 y se llevó a volumen con ACN.

**- Preparación de la curva de calibración en plasma.**

De la disolución de lamotrigina conteniendo 50 µg/mL, se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 8 y se llevó a volumen con plasma.

**Tabla 8. Preparación de la curva de calibración.**

Identificación	Solución	Alícuota (µL)	Aforo a volumen (mL)	Concentración (µg/mL)
C4	C3	1 600	5	16
C5	C3	800	5	8
C6	C3	400	5	4
C7	C3	200	5	2
C8	C3	100	5	1
C9	C3	50	5	0.5

**- Preparación de los puntos control (PC) en ACN.**

De la disolución de lamotrigina conteniendo 50 µg/mL, se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 9 y se llevó a volumen con ACN.

**- Preparación de los puntos control (PC) en plasma.**

De la disolución de lamotrigina conteniendo 50 µg/mL, se transfirieron los volúmenes indicados en la tabla 9 y se llevó a volumen con plasma.

**Tabla 9. Preparación de los puntos control.**

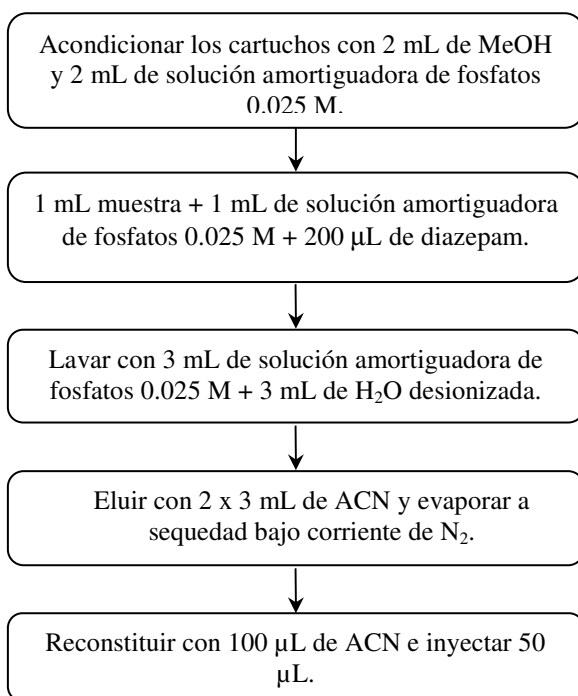
Identificación	Solución	Alícuota (µL)	Aforo a volumen (mL)	Concentración (µg/mL)
PC-A	C3	1 200	5	12
PC-M	C3	600	5	6
PC-B	C3	150	5	1.5

#### 4.1.5 Extracción en fase sólida para las muestras en plasma.

a) La metodología a seguir para las muestras en plasma fue la siguiente:

1. Se acondicionaron los cartuchos Strata C18-E con 2 mL de metanol y 2 mL solución amortiguadora de fosfatos 0.025 M.
2. Se colocó 1 mL de plasma, se adicionó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.025 M pH 7.5 y 200  $\mu$ L de la solución estándar de diazepam (40  $\mu$ g/mL) como estándar interno.
3. Se realizó un lavado con 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.025 M pH 7.5 y 3 mL de agua desionizada.
4. Se eluyó la muestra en dos partes con 6 mL de acetonitrilo.
5. Se llevó a sequedad en un baño María bajo corriente de nitrógeno.
6. Se reconstituyó la muestra con 100  $\mu$ L de acetonitrilo.
7. Se inyectaron 50  $\mu$ L al cromatógrafo.

En la figura 4 se presenta el diagrama del proceso de extracción de lamotrigina utilizado.



**Figura 4. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras de plasma.**

b) Para las muestras preparadas en ACN, al seguir la misma metodología, no se vio afectada la concentración adicionada obteniendo así, un recobro absoluto del 100 % en el caso de estas muestras.

#### **4.1.6 Condiciones cromatográficas.**

- ✓ Fase móvil: 30 % Solución amortiguadora de fosfatos 0.025 M, pH 6.5.  
70 % Acetonitrilo grado HPLC.
- ✓ Velocidad de flujo: 0.5 mL/min.
- ✓ Longitud de onda: 310 nm.
- ✓ Temperatura: Ambiente.
- ✓ Columna: Zorbax SB-C18 de 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm (Agilent Technologies).
- ✓ Volumen de inyección: 50  $\mu$ L.
- ✓ Respuesta: Alturas relativas (analito/estándar interno).
- ✓ Tiempo de corrida: 12 min.

#### **4.1.7 Validación del método analítico [48,49].**

El método analítico propuesto para la cuantificación de lamotrigina en plasma, se validó de acuerdo a los parámetros y criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998 [48] a nivel nacional y por la guía para la validación de métodos bioanalíticos, propuesta por la Food and Drug Administration de Estados Unidos de Norteamérica [49]. En la tabla 10, se muestran los parámetros y criterios establecidos por ambas normatividades.

**Tabla 10. Parámetros y criterios establecidos por la NOM-177-SSA-1998 y por la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA [48,49].**

Prueba	NOM-177-SSA1-1998 México.		Guía para la validación de métodos analíticos (FDA).	
	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación
<b>SELECTIVIDAD</b>	6 muestras blanco de la matriz biológica de diferentes 6 voluntarios. Determinar interferencias como metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco concomitante.	No deben existir interferencias en la señal del compuesto por analizar.	6 muestras blanco de la matriz biológica de diferentes 6 voluntarios. Determinar interferencias como metabolitos, productos de degradación y cualquier otro fármaco concomitante.	No deben existir interferencias en la señal del compuesto por analizar.
<b>LINEALIDAD</b>	Usar mínimo 5 concentraciones, incluir el LC y el C <sub>max</sub> del rango de trabajo. Definir un modelo que describa la relación matemática concentración-respuesta.	La relación concentración-respuesta debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.	Usar mínimo 6 concentraciones, incluir el LC. Elegir el modelo matemático más simple, que describa la relación concentración-respuesta.	El % Desv. Abs. debe ser menor al 15 %, a excepción en el LC, que debe ser menor al 20 %. Al menos 4 de 6 muestras deben cumplir con este criterio.
<b>PRECISIÓN</b> <b>Repetibilidad</b> <b>Reproducibilidad</b>	3 puntos control por quintuplicado (mismo día). 3 puntos control por duplicado, durante 3 días.	%CV no mayor al 15 %. %CV no mayor al 15 %.	3 puntos control por quintuplicado. 3 puntos control por quintuplicado.	%CV no mayor al 15 %. %CV no mayor al 15 %.
<b>EXACTITUD</b>	Usar datos de repetibilidad y reproducibilidad.	El valor promedio debe estar dentro del 15 % del valor nominal de concentración.	3 puntos control por quintuplicado.	El valor promedio debe estar dentro del ± 15 % del valor nominal de concentración.
<b>RECUPERACIÓN ABSOLUTA (% RECOBRO)</b>	3 puntos control por triplicado, en solución y en la matriz biológica.	La respuesta de los 3 PC debe ser reproducible en cada nivel de concentración, no necesario el 100 %.	3 puntos control, en solución y en la matriz biológica.	La respuesta de los 3 PC debe ser reproducible en cada nivel de concentración, no necesario el 100 %.
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)</b>	Concentración más baja, por quintuplicado.	El valor promedio debe estar dentro del 20 % del valor nominal, % CV no mayor al 20 %.	Preparar la concentración más baja, por quintuplicado.	El valor promedio debe estar dentro del 20 % del valor nominal, % CV no mayor al 20 %. Debe ser mínimo 5 veces la respuesta del blanco.
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>	Determinar la concentración más baja en la matriz biológica, que puede distinguirse al menos dos veces de la señal de ruido.	Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.	-	-

**Tabla 10 (continuación). Parámetros y criterios establecidos por la NOM-177-SSA-1998 y por la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA [48,49].**

Prueba	NOM-177-SSA1-1998 México.		Guía para la validación de métodos bioanalíticos (FDA).	
	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación	Condiciones de prueba	Criterio de aceptación
<b>ESTABILIDAD</b>	3 puntos control por duplicado.	El valor promedio debe estar dentro del 15 % del valor nominal de concentración.	Puntos control bajo y alto, por triplicado.	El valor promedio debe estar dentro del 15 % del valor nominal de concentración.
	<u>Ciclos de congelación-descongelación.</u> Someter la muestra a 2 ciclos de congelación antes de analizar las muestras.	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad.	<u>Ciclos de congelación-descongelación.</u> Someter la muestra a 3 ciclos de congelación antes de analizar las muestras.	
	-	-	<u>Estabilidad a corto plazo.</u> Mantenerlas a temperatura ambiente de 4 a 42 h, y posteriormente analizarlas.	
	<u>Almacenamiento.</u> Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenarán las muestras en el estudio	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad.	<u>Estabilidad a largo plazo.</u> Mantener bajo las condiciones y durante el tiempo que se almacenarán las muestras en el estudio.	
	<u>Otros.</u> Evaluar otros factores a los que puede ser sometidas las muestras.	Cumplir con criterios de exactitud y repetibilidad.	<u>Estabilidad de la solución estándar.</u> Evaluar la solución estándar de los analitos y del estándar interno a temp. ambiente durante 6 horas. Si van a ser almacenadas para su posterior uso evaluar su estabilidad.	
<b>TOLERANCIA</b>	Evaluar la tolerancia del método a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (ej. pH, disolventes, fase móvil, dilución).	Debe cumplir los criterios de exactitud y precisión.	-	-

#### **4.1.7.1 Selectividad.**

Para evaluar la selectividad se analizaron las siguientes muestras:

- Muestras blanco de plasma de 6 voluntarios diferentes.
- Muestra blanco de plasma obtenida de la mezcla de los plasmas de los 6 voluntarios sin adición de fármaco, ni de estándar interno.
- Muestra blanco de un plasma hemolizado (sin adición del fármaco, ni estándares internos).
- Muestra blanco de un plasma lipémico (sin adición del fármaco, ni estándares internos).
- Muestra de la mezcla de la matriz biológica, adicionada únicamente del estándar interno.
- Muestra de la mezcla de la matriz biológica adicionada del fármaco y del estándar interno.
- Muestra de la mezcla de la matriz biológica, adicionada de los posibles fármacos que pudieran estar presentes como:
  - Acetaminofén.
  - Valproato de magnesio.
  - Prednisona.
  - Ranitidina.
  - Cafeína.
  - Heparina.
  - Imipramina.

#### **4.1.7.2 Linealidad.**

Para determinar la linealidad del método, se prepararon por triplicado, curvas de lamotrigina en plasma en un intervalo de 0.5 µg/mL - 16 µg/mL y se analizaron empleando el método descrito. Se graficó la relación de alturas del analito entre el estándar interno (LTG/DZP) contra la concentración (µg/mL). Se determinó la relación matemática entre la concentración y la respuesta que mejor ajusta al modelo, verificando que fuera continua y reproducible a lo largo del intervalo. Utilizando todos los datos se determinó el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), la pendiente (m) y el intercepto (b) de las 3 curvas de calibración.

Se calculó la concentración recuperada tratando la respuesta de los estándares de la curva como desconocidos e introduciéndolos en la ecuación derivada del análisis de regresión lineal y se calculó la desviación absoluta (% Desv. Abs.) empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desv. Abs.} = \left( \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \times 100 \right)$$

Criterio de aceptación: El método es lineal si el  $r^2$  de todos los datos (global) es igual o mayor a 0.98 para la relación concentración-respuesta. Además, para los datos de concentración adicionada vs recuperada, el experimento se considera válido si la desviación absoluta (% Desv. Abs.), obtenida en cada nivel de concentración, es menor o igual al 15 %, excepto para el nivel de concentración más bajo, ya que el valor para este punto puede ser menor o igual al 20 %.

#### **4.1.7.3 Precisión.**

##### **- Repetibilidad Intra - día.**

El parámetro se evaluó en un mismo día de trabajo, en condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Para ello se prepararon 2 curvas patrón y cinco series de PC con concentraciones de 1.5 µg/mL, 6 µg/mL y 12 µg/mL de LTG en plasma y se analizaron en un día.

Para cada nivel de concentración se calculó la concentración recuperada promedio interpolando en la curva global. Se determinó el promedio, la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (% CV) empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CV} = \left( \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \right) \times 100$$

El método se considera repetible si el % CV no es mayor al 15 %, a excepción de la concentración más baja donde puede ser de 20 %.

#### ***- Reproducibilidad Inter - día.***

En tres días de trabajo, se analizaron por quintuplicado los puntos control (1.5 µg/mL, 6 µg/mL y 12 µg/mL) de LTG en plasma. Para cada día de análisis se preparó una curva de calibración. Las muestras se procesaron y analizaron de acuerdo a los procedimientos descritos en los apartados 4.4 al 4.6. Para cada nivel de concentración se determinó la cantidad recuperada promedio interpolando los datos en la curva de calibración preparada el mismo día del análisis. También se calcularon la DS y el % CV, utilizando los datos de los 3 días. El método se considera reproducible, si el coeficiente de variación en cada nivel de concentración, no es mayor al 15 %.

#### ***4.1.7.4 Exactitud.***

Una vez obtenidos los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó la exactitud calculando el % Desv. Abs. de los valores promedio de las determinaciones de cada nivel de concentración por quintuplicado.

El método se considera exacto, si el valor promedio en cada nivel de concentración está dentro del 15 % del valor nominal de concentración, es decir, el % Desv. Abs. menor o igual al 15 %, excepto para el valor más bajo, donde puede ser del 20 %.

#### ***4.1.7.5 Recuperación absoluta (% Recobro).***

Se comparó la respuesta de los puntos control (PC) bajo, medio y alto (0.5 µg/mL, 6 µg/mL y 12 µg/mL de lamotrigina) preparados por quintuplicado en plasma, con la respuesta de los PC en ACN.



Para cada una de las determinaciones (muestras en ACN y en plasma) se estableció la relación de alturas (respuesta) entre los analitos de interés y el estándar interno (LTG/DZP). Posteriormente se determinó el porcentaje de recobro de cada nivel de concentración comparando el promedio de la respuesta obtenida en plasma con respecto a la obtenida en acetonitrilo a la misma concentración, para finalmente multiplicar por 100 para obtener el % de recobro, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro} = \left( \frac{\text{Promedio de la relación de alturas en plasma}}{\text{Promedio de la relación de alturas en ACN}} \right) \times 100$$

Una vez calculado lo anterior, se obtuvo el promedio y el % CV de cada nivel de concentración y de todos los datos (global).

El criterio de aceptación es que el porcentaje de recuperación de lamotrigina, no debe ser necesariamente del 100 %, pero debe ser consistente, preciso y reproducible (% CV  $\leq$  15 %) en todo el rango de concentración.

#### ***4.1.7.6 Influencia de la dilución de la muestra.***

Se prepararon por triplicado muestras en plasma conteniendo la concentración más alta de los puntos control (12  $\mu\text{g/mL}$ ), así como el doble de esta concentración (24  $\mu\text{g/mL}$ ). Se analizó la concentración más alta utilizando el método analítico propuesto y se realizó una dilución 1:2 de la muestra 24  $\mu\text{g/mL}$  por triplicado.

Los resultados de una muestra diluida son confiables si el valor promedio es menor o igual al 15 % del valor promedio de la concentración de 12  $\mu\text{g/mL}$  sin diluir.

#### **4.1.7.7 Límite de cuantificación.**

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del intervalo de trabajo (0.5 µg/mL) y se aplicó el método analítico verificando que se obtuviera una respuesta analítica por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco. A continuación se calculó el % CV y el % Desv. Abs.

Si el valor promedio de las cinco determinaciones cae dentro del 20 % del valor nominal y si el % CV no es mayor del 20 %, se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación.

#### **4.1.7.8 Límite de detección.**

Se continuó diluyendo una muestra de plasma adicionada del fármaco señalada en el punto anterior. Se determinó que la concentración en la cual la señal del compuesto por analizar puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra blanco de plasma extraído.

Si la respuesta es por lo menos dos veces la señal de ruido de fondo este será el límite de detección.

#### **4.1.7.9 Estabilidad.**

La estabilidad de un analito en un fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento, de sus propiedades químicas, de la matriz y del sistema de almacenamiento. La estabilidad es relevante para la matriz biológica en la que se encuentra el fármaco (plasma, suero, orina, sangre, etc.) y para un sistema de almacenamiento en particular (temperatura, presión, concentración, etc.).

Para cada una de las determinaciones de las pruebas de estabilidad se calculó la concentración recuperada, esto se realizó interpolando la relación de alturas (LTG/DZP) en la curva de calibración preparada en cada día de análisis.

En todas las pruebas se calculó el % Desv. Abs. utilizando el valor promedio de la concentración recuperada en cada nivel de concentración, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desv. Abs.} = \left( \frac{\text{Conc. recuperada}_{\text{referencia}} - \text{Conc. recuperada}_{\text{prueba}}}{\text{Conc. recuperada}_{\text{referencia}}} \times 100 \right)$$

El criterio de aceptación para las pruebas de estabilidad está dado por los valores de la % Desv. Abs. El valor promedio no deberá ser mayor al 15 % con respecto al valor original o al de referencia de acuerdo con la NOM-177-SSA-1998 a nivel nacional y con la guía para la validación de métodos bioanalíticos a nivel internacional.

#### ***a) Estabilidad a largo plazo.***

Se prepararon 6 tubos de cada uno de los PC (bajo, medio y alto) y sus respectivos blancos. Al término de un periodo de almacenamiento (-70 °C) de 30 días, se analizaron, dos series de PC congelados, dos series de PC frescos (preparados el mismo día) y dos curvas de calibración preparadas el día del análisis.

Se calcularon y se compararon, la concentración recuperada de los PC almacenados en congelación, con los valores de concentración de PC frescos a la misma concentración.

Los resultados obtenidos deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud indicados. El % CV no mayor al 15 % y el % Desv. Abs. menor o igual al 15 %, de cada día de análisis.

***b) Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación.***

Se preparó una serie de PC por duplicado y congelaron a -70 °C. Al término de 24 horas se descongeló y se volvió a congelar para descongelar nuevamente a las 24 horas, completando así 2 ciclos.

Se efectuó el análisis de las muestras, para lo cual prepararon una curva de calibración y dos series de PC frescos. Se calcularon y compararon la concentración recuperada los PC sometidos a los ciclos de congelación, con los valores de concentración de PC (a la misma concentración) frescos bajo las mismas condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud indicados. El % CV no mayor al 15 % y el % Desv. Abs. menor o igual al 15 %, de cada día de análisis.

***c) Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente).***

Se prepararon, por triplicado los PC bajo y alto en plasma de acuerdo a lo descrito en el punto 4.4. La primera serie se procesó inmediatamente. La segunda serie se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente en la mesa de trabajo. Transcurrido ese tiempo se procesó de acuerdo a lo descrito en el punto 4.5.

Se utilizó como referencia, el valor promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras de la primera serie y se calculó el % Desv. Abs.

***d) Estabilidad de las soluciones estándar en refrigeración.***

Se prepararon soluciones estándar de 400 µg/mL de LTG y DZP en ACN R.A., de acuerdo a lo descrito en el punto 4.4 y se separó en 4 tubos. El primer día, se analizaron por quintuplicado ambas soluciones, resultado correspondiente al día 0. El resto de los tubos fueron almacenados en refrigeración durante 15 días y se analizaron por quintuplicado en los días 0, 7 y 14.

Se calculó la relación de alturas de los analitos entre el estándar interno (LTG/DZP) de todas las muestras y se calculó el valor promedio. Los resultados del día cero se utilizaron como referencia para el cálculo del % Desv. Abs. de cada una de las soluciones estándar almacenadas en refrigeración durante diferentes períodos de tiempo.

## 4.2 Estudio de Biodisponibilidad.

### 4.2.1 Medicamentos utilizados en el estudio.

<b>Categoría.</b>	<b>Producto A.</b>	<b>Producto B.</b>
<b>Productos.</b>	Referencia (Lamictal).	Prueba.
<b>Principio activo.</b>	Lamotrigina.	Lamotrigina.
<b>Concentración.</b>	50 mg.	50 mg.
<b>Forma farmacéutica.</b>	Tableta dispersable.	Gragea de liberación prolongada.

### 4.2.2 Voluntarios.

El estudio se llevó a cabo en pacientes con epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). En él participaron 16 voluntarios, de los cuales 10 fueron mujeres y 8 hombres. El peso promedio fue de 70.8 kg (53 - 91 kg) y la edad promedio de 33.6 años (18 - 53 años).

Los criterios de aceptación o rechazo fueron los siguientes:

#### 4.2.2.1 Criterios de inclusión.

- a) Pacientes con diagnóstico de Epilepsia que acudan a la Consulta Externa de Epilepsia del INNN.
- b) Ambos géneros.
- c) Edad entre 18 y 55 años.
- d) Uso de lamotrigina en monoterapia o politerapia cuando menos durante un mes al momento de ingreso al estudio.
- e) Que no requieran modificar las dosis de lamotrigina, ni de los fármacos concomitantes durante el periodo de duración del estudio.
- f) Estado de salud aceptable y catalogado como clínicamente sano. Determinado por: Historia clínica, electrocardiograma, pruebas de laboratorio químico (biometría hemática, química sanguínea, examen general de orina, perfil de lípidos, pruebas de función hepática) dentro de los valores normales o en un rango compatible con los objetivos del

estudio y signos vitales: presión arterial y frecuencia cardiaca normales.

- g) Acepten participar en el estudio y firmen el consentimiento informado (apéndice A).

#### **4.2.2.2 Criterios de exclusión.**

- a) Que no acepten participar en el estudio.
- b) Hipersensibilidad o alergia a la lamotrigina.
- c) Que presenten daño hepático o renal.
- d) Resultados fuera del rango normal en las pruebas hematológicas, bioquímicas y de gabinete realizadas en la fase de selección.
- e) Participación en otro protocolo de investigación, donación de sangre o pérdida de sangre significativa en las últimas 12 semanas antes de su inclusión en el presente estudio.

#### **4.2.3 Modelo estadístico y diseño experimental.**

Se llevó a cabo un estudio clínico de tipo prospectivo, longitudinal, comparativo de causa a efecto y experimental, cruzado, doble ciego, aleatorio y con pretratamiento de cada 12 horas, por un periodo de 7 días en esquema A-B y B-A. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{j,k} + C_{(j-1,k)} + e_{ijk}$$

En donde:

- $i$  = período (1,2).
- $j$  = secuencia (A,B).
- $k$  = sujeto (1...n).
- $Y_{ijk}$  = Respuesta (ABC, Cmax).
- $\mu$  = Media.
- $S_{ik}$  = Efecto sujeto (secuencia).
- $P_j$  = Efecto del período.

- $F_{j,k}$  = Efecto de la formulación.
- $C_{(j-1,k)}$  = Efecto de la secuencia.
- $e_{ijk}$  = Error experimental (dentro de sujeto) en la determinación de  $Y_{ijk}$ .

En la tabla 11, se puede apreciar el diseño experimental. La asignación de los fármacos estuvo cegada para los investigadores y los pacientes.

**Tabla 11. Diseño del estudio.**

			PERIODO 1	PERIODO 2	
<b>16 voluntarios</b>	<b>Grupo 1 Secuencia AB 8 voluntarios</b>	Pretratamiento 7 días con LTG  Grupo 1: A Grupo 2: B	<b>LTG producto referencia A</b>	Nuevo tratamiento 7 días con LTG  Grupo 1: B Grupo 2: A	<b>LTG producto de prueba B</b>
	<b>Grupo 2 Secuencia BA 8 voluntarios</b>		<b>LTG producto de prueba B</b>		<b>LTG producto referencia A</b>

Los voluntarios recibieron un número para su ingreso al primer internamiento, para la asignación de los tratamientos, se empleó una tabla de números aleatorios.

Periodo 1:

Voluntarios 1, 3, 4, 5, 12, 14, 18 y 19 Fármaco "A".

Voluntarios 2, 6, 7, 8, 13, 15, 17 y 20 Fármaco "B".

Periodo 2:

Voluntarios 1, 3, 4, 5, 12, 14, 18 y 19 Fármaco "B".

Voluntarios 2, 6, 7, 8, 13, 15, 17 y 20 Fármaco "A".



#### **4.2.4 Protocolo del estudio.**

Para ambos periodos del estudio, los voluntarios se ajustaron al siguiente protocolo:

- a. El médico le proporcionó a cada paciente, el medicamento conteniendo lamotrigina que debían tomar durante los siguientes 7 días.
- b. El octavo día del estudio, los pacientes se presentaron en ayuno en la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), por la mañana (6:30 a.m.), sin haber tomado el medicamento.
- c. Se colocó en el antebrazo de los voluntarios, un punzocat intravenoso y una llave de tres vías para obtener muestras seriadas de sangre. Para evitar que la sangre se coagulara en el dispositivo, se utilizó heparina diluida al 80 % con agua inyectable.
- d. A las 8 a.m. se tomó la primera muestra sanguínea (blanco) y se les proporcionó el medicamento con 250 mL de agua.
- e. Posteriormente se continuó con la toma de muestras a las 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas después post-dosis.
- f. A las 12 p.m., se les proporcionó un desayuno, a las 3:00 p.m. una comida y a las 6:15 p.m. una cena ligera descritas en el apéndice B.
- g. Después de tomar la última muestra del primer periodo, el médico le proporcionó el tratamiento a seguir durante los siguientes 7 días y a esa hora se tomaron la primera dosis del nuevo tratamiento.
- h. El décimo quinto día se repitió el mismo procedimiento: Se presentaron en el INNN a las 6:30 a.m., se tomaron las muestras sanguíneas y se le proporcionaron los alimentos a la hora indicada.

- i. En ambos periodos, los voluntarios permanecieron internados en las instalaciones del INNN, durante las 12 horas post-administración del medicamento, correspondientes a la duración de cada día de estudio.
- j. Se elaboró un calendario de crisis correspondiente a los 7 días de tratamiento en cada periodo, en el que se indican también las reacciones adversas de cada paciente (Apéndice C).
- k. Se elaboraron también los controles correspondientes a los horarios de toma de muestras, de entrega al laboratorio y de centrifugación, separación y almacenamiento de muestras (Apéndices D, E y F).

En la tabla 12 se describen las actividades incluidas en el protocolo de estudio.

**Tabla 12. Horario de actividades correspondiente al periodo 1 o 2.**

<b>HORA</b>	<b>ACTIVIDAD</b>
6:30 a.m.	Inserción del catéter a los voluntarios.
7:30 a.m.	Toma de muestra blanco.
8:00 a.m.	Administración del medicamento.
9:00 a.m.	Toma de muestra 1 h.
10:00 a.m.	Toma de muestra 2 h.
11:00 a.m.	Toma de muestra 3 h.
12:00 p.m.	Toma de muestra 4 h.
12:30 p.m.	<i>Desayuno.</i>
14:00 p.m.	Toma de muestra 6 h.
16:00 p.m.	Toma de muestra 8 h.
16:30 p.m.	<i>Comida.</i>
19:00 p.m.	<i>Cena.</i>
20:00 p.m.	Toma de muestra 12 h.
20:30 p.m.	Entrega de medicamentos.

#### **4.2.5 Análisis de muestras.**

Las muestras sanguíneas se centrifugaron para obtener el plasma, el cual se guardó en congelación hasta el momento de su análisis, empleando para ello, el método analítico previamente descrito.

#### **4.2.6 Análisis de datos.**

A partir de los datos de concentración plasmática de lamotrigina vs tiempo, se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos mediante el empleo del programa Win Non Lin: el área bajo la curva en el intervalo de dosificación ( $ABC_{0-12h}$ ), la concentración plasmática máxima en el estado estacionario ( $C_{max_{ee}}$ ), el tiempo en el cual se alcanza la concentración plasmática máxima en el estado estacionario ( $T_{max_{ee}}$ ), la concentración plasmática mínima en el estado estacionario ( $C_{min_{ee}}$ ) y la fluctuación entre la concentración máxima, la concentración mínima en el estado estacionario:  $100 \times (C_{max_{ee}} - C_{min_{ee}}) / C_{prom_{ee}}$ .

Por medio de un análisis de de varianza (ANOVA) se compararon los valores de  $ABC_{0-12h}$  y de  $C_{max_{ee}}$  obtenidos en ambos tratamientos. A partir de estos se calcularán los intervalos de confianza al 90 %, el valor de Anderson Hauck, así como el poder de la prueba. Para llevar a cabo estos análisis se utilizó el software Win Non Lin versión 4.0.1.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **5.1 Método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma.**

La medición de concentraciones plasmáticas de fármaco facilita en gran medida lograr una medicación anticonvulsiva óptima, particularmente cuando se inicia el tratamiento, en caso de falla terapéutica cuando se manifiestan efectos tóxicos o en casos de politerapia. Siendo la epilepsia un problema de salud pública a nivel nacional e internacional, y al estrecho margen terapéutico de los fármacos utilizados para el tratamiento de esta enfermedad, se recomienda un monitoreo terapéutico adecuado.

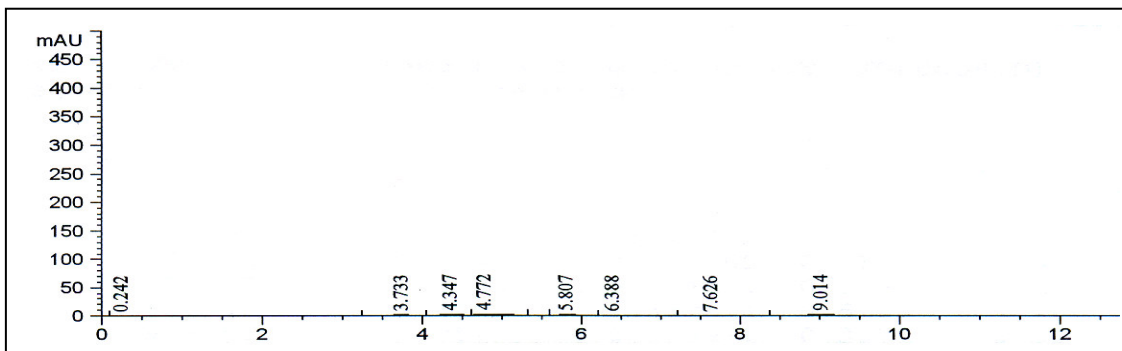
Con el fin de contar con un método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma en el estado estacionario, se inició el trabajo reproduciendo en el laboratorio algunas de las técnicas reportadas en la literatura [24,26,42-47], sin embargo, los métodos no fueron lineales o exactos en el rango de concentración esperado, por lo que fue necesario desarrollar y validar un método analítico, empleando extracción en fase sólida (figura 4).

A continuación se presentan los resultados de validación obtenidos.

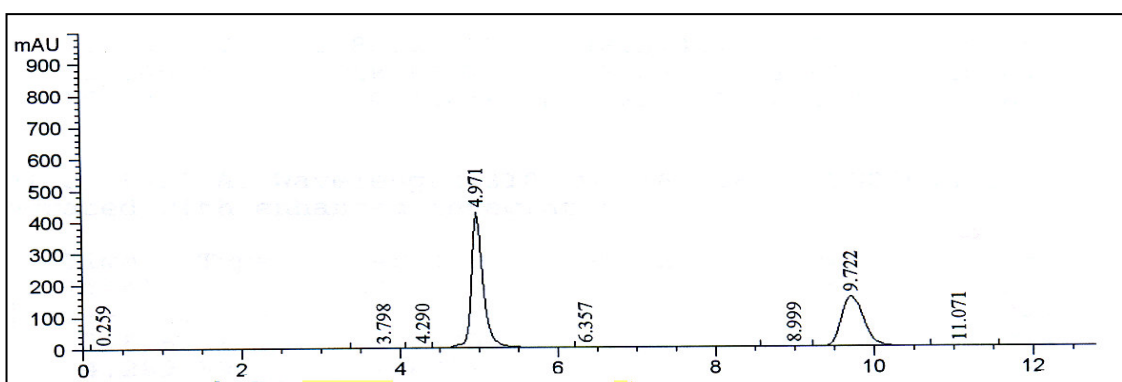
### **5.2 Validación del método analítico [48,49].**

#### **5.2.1 Selectividad.**

En las figuras 5 y 6 se presentan los cromatogramas correspondientes a una muestra de plasma blanco y una muestra plasmática adicionada de lamotrigina (LTG) y diazepam (DZP), a una concentración de 4 µg/mL y 40 µg/mL, respectivamente. En ellas se puede apreciar que no se presentan interferencias en los tiempos de retención de la LTG, ni del DZP (estándar interno).



**Figura 5. Cromatograma de un blanco de plasma.**



**Figura 6. Cromatograma típico de una muestra plasmática adicionada de LTG (4 µg/ mL)  $t_r$  = 4.971 y DZP (40 µg/mL)  $t_r$  = 9.722.**

En la tabla 13, se presentan los resultados de selectividad del método bajo diferentes condiciones del plasma o adicionando diferentes fármacos a concentraciones terapéuticas, que pudieran ser utilizados como terapia adyuvante o simplemente sustancias que pudieran encontrarse, en los rangos entre 4.3 - 5.5 min y 9 - 10.5 min, y que pudieran interferir con el análisis. En esta tabla se puede observar que la hemólisis o la lipemia no presentan ningún pico cromatográfico. Por otro lado, a pesar de que la aparición de picos cromatográficos durante el análisis de fármacos concomitantes, se considera que éstos no interfieren, ya que en su mayoría sus alturas no superan los 5 mUA. Ahora bien, en los casos de la heparina y el valproato de magnesio que presentan picos superiores a 5 mAU en el rango evaluado, estos picos no se encuentran a

los tiempos de retención de la LTG o del DZP y su altura no impacta los resultados. Dado lo anterior, el método analítico se considera selectivo. En el apéndice G se muestran los cromatogramas representativos de los pacientes a los diferentes tiempos.

**Tabla 13. Selectividad del método.**

Compuesto	Uso / Acción	Picos encontrados entre 4 - 5.5, 9 - 10.5 min	Altura > 5 mUA
Hemolizado.	-	-	-
Lipémico.	-	4.3, 4.8, 9.2	-
Heparina (70 IU/mL).	Anticoagulante.	4.3, 4.8, 9.1	7.4, 7.5, -
Cafeína (12 µg/mL).	Estimulante del SNC.	4.3, 4.8, 10.4	-
Valproato de magnesio (100 µg/mL).	Antiepiléptico.	4.3, 4.7, 9.1	9.0, 11.8, -
Carbamazepina (10 µg/mL).	Antiepiléptico.	4.3	-
Prednisona (30 µg/mL).	Corticoesteroide, antiinflamatorio.	4.3, 4.8, 9.1	-
Imipramina (1 µg /mL).	Antidepresivo.	4.3, 4.8	-
Acetaminofén (20 µg/mL).	AINE.	4.3, 4.8, 9.2	-
Ranitidina (60 µg/mL).	Inhibidor H <sub>2</sub> .	4.3, 4.8	-
Lamotrigina (0.5 µg/mL).	Antiepiléptico.	<b>4.97</b>	<b>49.5</b>
Diazepam (40 µg/mL).	Benzodiacepina.	<b>9.72</b>	<b>150.5</b>

t<sub>r</sub>: tiempo de retención, SNC: Sistema nervioso central, AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.

### 5.2.2 Linealidad.

Los valores de la relación concentración-respuesta se ajustaron a un modelo lineal. En la tabla 14 se muestran los valores de los parámetros de regresión para cada una de las rectas, mientras que la representación gráfica se muestra en la figura 7. El coeficiente de determinación promedio ( $r^2$ ) fue de 0.9985.

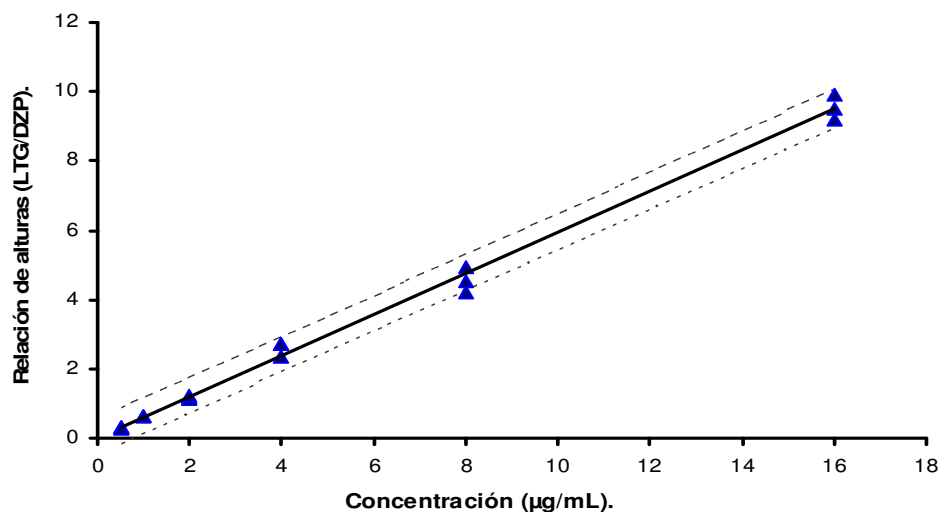
La tabla 15 muestra los datos de concentración recuperada calculada como se indica en la sección 4.1.7.2 y el % Desv. Abs. de cada una de las determinaciones, en las que se puede observar que en el en el límite de cuantificación (0.5 µg/mL) el valor absoluto de desviación fue menor al 20 %, mientras que en las demás

concentraciones los valores fueron menores al 15 %, lo que indica que el modelo lineal seleccionado es adecuado para la interpretación de los datos.

**Tabla 14. Linealidad del método analítico para la cuantificación de lamotrigina en plasma.**

Curva	$r^2$	m	b
1	0.9932	$0.581 \pm 0.07$	$0.053 \pm 0.50$
2	0.9990	$0.618 \pm 0.03$	$0.030 \pm 0.21$
3	0.9998	$0.572 \pm 0.01$	$0.036 \pm 0.09$
<b>Promedio</b>	0.9985	$0.590 \pm 0.02$	$0.040 \pm 0.16$

$r^2$ : Coeficiente de correlación, m: pendiente, b: intercepto.



**Figura 7. Curvas de linealidad de lamotrigina en plasma.**

**Tabla 15. Curvas patrón para la linealidad.**

$C_{\text{nominal}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Replica 1	% Desv. Abs.	Replica 2	% Desv. Abs.	Replica 3	% Desv. Abs.
0.5	0.48	3.05	0.50	0.94	0.44	11.72
1	1.02	1.84	1.00	0.44	1.01	0.68
2	1.96	1.84	1.77	11.74	2.09	4.54
4	4.61	15.03	4.34	8.58	4.06	1.39
8	7.14	10.75	7.91	1.08	7.86	1.77
16	16.28	1.75	15.99	0.08	16.05	0.29

$C_{\text{nominal}}$ : Concentración nominal,  $C_{\text{recuperada}}$  calculada: Concentración recuperada calculada.

### 5.2.3 Precisión.

#### - Repetibilidad Intra-día.

En la tabla 16 se muestran los resultados de repetibilidad del método analítico. En ella se puede observar que el % CV obtenido es menor al 15 %, lo cual indica que existe poca variabilidad en los resultados al aplicar el método bajo las mismas condiciones analíticas (día, analista, equipo y laboratorio).

**Tabla 16. Repetibilidad del método.**

No. Réplica	Concentración recuperada de LTG ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Punto bajo (1.5 $\mu\text{g/mL}$ )	Punto medio (6 $\mu\text{g/mL}$ )	Punto alto (12 $\mu\text{g/mL}$ )
1	1.29	5.68	10.66
2	1.28	6.35	11.45
3	1.45	5.36	11.19
4	1.25	6.77	11.61
5	1.39	5.67	11.12
<b>Promedio</b>	1.33	5.97	11.20
<b>DS</b>	0.08	0.58	0.36
<b>% CV</b>	<b>6.30</b>	<b>9.67</b>	<b>3.25</b>

#### - Reproducibilidad Inter-día.

En la tabla 17 se presentan los resultados de la reproducibilidad inter-día a los tres niveles de concentración evaluados. Dado que el % CV fue menor al 15 % el método se considera reproducible.



**Tabla 17. Reproducibilidad del método.**

		Concentración recuperada de LTG ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Día	No. Réplica	Punto bajo (1.5 $\mu\text{g/mL}$ )	Punto medio (6 $\mu\text{g/mL}$ )	Punto alto (12 $\mu\text{g/mL}$ )
1	1	1.29	5.68	10.66
	2	1.28	6.35	11.45
	3	1.45	5.36	11.19
	4	1.25	6.77	11.61
	5	1.39	5.67	11.12
2	1	1.18	6.48	12.95
	2	1.06	6.35	13.71
	3	1.07	6.77	12.70
	4	1.04	6.61	13.19
	5	1.10	6.61	14.03
3	1	1.19	6.43	13.89
	2	1.24	6.58	13.20
	3	1.15	6.16	13.43
	4	1.10	6.85	12.98
	5	1.27	6.65	13.34
	<b>Promedio</b>	1.20	6.36	12.67
	<b>DS</b>	0.12	0.45	1.15
	<b>% CV</b>	<b>9.95</b>	<b>7.09</b>	<b>9.07</b>

#### **5.2.4 Exactitud.**

A partir de los datos anteriores, se evaluó la exactitud del método en los tres niveles de concentración. Dado que % Desv. Abs. de las concentraciones recuperadas es menor al 15 %, el método se considera exacto, lo que indica que existe concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores reales.

**Tabla 18. Exactitud del método para la cuantificación de lamotrigina.**

No. Réplica	Punto bajo (1.5 µg/mL)		Punto medio (6 µg/mL)		Punto alto (12 µg/mL)	
	C <sub>recuperada</sub> (µg/mL)	% Desv. Abs.	C <sub>recuperada</sub> (µg/mL)	% Desv. Abs.	C <sub>recuperada</sub> (µg/mL)	% Desv. Abs.
1	1.29	13.99	5.68	5.38	10.66	11.20
2	1.28	14.95	6.35	5.82	11.45	4.56
3	1.45	3.41	5.36	10.66	11.19	6.75
4	1.25	16.66	6.77	12.87	11.61	3.29
5	1.39	7.66	5.67	5.45	11.12	7.36
<b>Promedio</b>	1.33	<b>11.34</b>	5.97	<b>8.04</b>	11.20	<b>6.63</b>

C<sub>recuperada</sub>: Concentración recuperada.

### 5.2.5 Recobro absoluto (% Recobro).

En la tabla 19 se presentan los resultados de recobro absoluto de acuerdo a lo propuesto en la sección 4.1.7.5. En esta tabla, se puede observar que el % CV promedio en cada nivel de concentración es menor al 15 %, cumpliendo con los criterios de precisión establecidos por la NOM-177-SSA-1998 y la guía para validación de métodos bioanalíticos de la FDA. También se observa el promedio de recobro a cada nivel de concentración, siendo el promedio de recobro de las tres concentraciones del 90 %.

**Tabla 19. Recobro absoluto de LTG en los tres niveles de concentración.**

Réplica	Punto bajo (1.5 µg/mL)		Punto medio (6 µg/mL)		Punto alto (12 µg/mL)	
	Sol. LTG/DZP	Plasma LTG/DZP	Sol. LTG/DZP	Plasma LTG/DZP	Sol. LTG/DZP	Plasma LTG/DZP
1	0.97	0.89	3.97	3.57	8.23	6.84
2	0.98	0.83	3.97	3.51	8.11	7.23
3	1.00	0.84	3.43	3.72	7.49	6.72
4	1.00	0.82	3.85	3.64	7.96	7.32
5	0.96	0.85	3.97	3.64	7.73	7.39
<b>Promedio</b>	0.98	0.85	3.84	3.61	7.94	7.10
<b>% Recobro</b>		<b>86.21</b>		<b>94.20</b>		<b>89.40</b>
<b>DS</b>	0.02	0.03	0.24	0.08	0.30	0.30
<b>% CV</b>	1.84	3.31	6.14	2.19	3.77	4.23

### 5.2.6 Influencia de la dilución de la muestra.

Los resultados de la comparación entre una muestra diluida (dilución 1:2) y una muestra preparada bajo condiciones normales, se muestran en la tabla 20. En ella se puede observar que el valor promedio de las muestras diluidas se encuentra dentro del  $\pm 15\%$  del valor promedio de la muestra sin diluir, por lo que en casos de concentraciones fuera del rango superior de la curva, se puede diluir la muestra sin que se vea afectado el análisis.

**Tabla 20. Influencia de la dilución de la muestra.**

<b>C<sub>nominal</sub></b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>C<sub>recuperada</sub></b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% Desv. Abs.</b>
12	12.16	1.31
12	12.32	2.65
12	12.44	3.67
<b>Promedio</b>	12.31	<b>2.55</b>
<b>DS</b>	0.14	
<b>% Error</b>	2.58	
<b>% CV</b>	1.13	

<b>C<sub>nominal</sub></b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>C<sub>recuperada</sub></b> <b>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% Desv. Abs.</b>
24 (1:2)	13.11	9.28
24 (1:2)	13.58	13.16
24 (1:2)	13.40	11.65
<b>Promedio</b>	13.36	<b>11.36</b>
<b>DS</b>	0.23	
<b>% Error</b>	11.33	
<b>% CV</b>	1.72	

C<sub>nominal</sub>: Concentración nominal, C<sub>recuperada</sub>: Concentración recuperada.

### 5.2.7 Límite de cuantificación.

En la tabla 21 se muestran los resultados del % Desv. Abs. y el % CV para la lamotrigina en el límite de cuantificación (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Se puede observar que el valor del coeficiente de variación y el % Desv. Abs. fueron menores al 20 %, por lo que se considera que ésta es la concentración mínima cuantificable de lamotrigina.

**Tabla 21. Repetibilidad en el límite de cuantificación.**

<b>C<sub>nominal</sub></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>C<sub>recuperada</sub></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>% Desv. Abs.</b>
0.5	0.485	3.047
0.5	0.495	0.937
0.5	0.508	1.651
0.5	0.494	1.174
0.5	0.499	0.275
<b>Promedio</b>	0.496	<b>1.417</b>
<b>DS</b>	0.008	
<b>% CV</b>	1.707	

C<sub>nominal</sub>: Concentración nominal, C<sub>recuperada</sub>: Concentración recuperada.

### **5.2.8 Límite de detección.**

Se determinó que la concentración en la cual la señal del compuesto por analizar, puede distinguirse de los niveles de ruido del blanco de plasma fue de 0.25 µg/mL.

### **5.2.9 Estabilidad [48,49].**

#### **a) Estabilidad a largo plazo.**

En la tabla 22 se muestran los resultados de estabilidad a largo plazo de lamotrigina. Se encontró que el valor promedio de la concentración recuperada está dentro del 15 % del valor promedio de las muestras frescas procesadas y el % CV no mayor al 15 %, lo cual demuestra que las muestras plasmáticas conteniendo lamotrigina son estables en congelación en un lapso de al menos 30 días, cumpliendo con los criterios establecidos por la NOM-177-SSA-1998 [48] y los establecidos por la FDA [49].

**Tabla 22. Estabilidad a largo plazo.**

Réplica	C recuperada punto bajo (1.5 µg/mL)			C recuperada punto alto (12 µg/mL)		
	Frescos	Congelados 30 días	% Desv. Abs.	Frescos	Congelados 30 días	% Desv. Abs.
1	1.21	1.25		13.82	12.78	
2	1.24	1.19		13.20	12.46	
3	1.15	1.09		13.43	13.15	
4	1.11	1.16		12.98	13.81	
5	1.30	1.04		13.34	12.26	
<b>Promedio</b>	1.20	1.15	<b>4.38</b>	13.35	12.89	<b>3.39</b>
<b>DS</b>	0.08	0.08		0.31	0.62	
<b>% CV</b>	<b>6.29</b>	<b>7.11</b>		<b>2.33</b>	<b>4.78</b>	

C<sub>recuperada</sub>: Concentración recuperada.

***b) Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación.***

En la tabla 23 se muestran los resultados de estabilidad para la lamotrigina cuando las muestras plasmáticas fueron sometidas a ciclos de congelación-descongelación.

El % Desv. Abs. se calculó tomando como referencia al valor promedio de la concentración recuperada de la serie que se mantuvo en congelación. Dado que el % CV no es mayor al 15 % y el valor promedio se encontró dentro del 15 % del valor promedio de las muestras frescas, se demuestra que la lamotrigina se mantiene estable al someter las muestras plasmáticas a tres ciclos de congelación-descongelación.

**Tabla 23. Estabilidad en 3 ciclos de congelación-descongelación.**

Réplica	C recuperada punto bajo (1.5 µg/mL)			C recuperada punto alto (12 µg/mL)		
	Frescos	3 ciclos	% Desv. Abs.	Frescos	3 ciclos	% Desv. Abs.
1	1.62	1.66		14.18	13.14	
2	1.65	1.64		13.55	12.82	
3	1.55	1.79		13.79	13.51	
4	1.52	1.67		13.34	14.17	
5	1.70	1.55		13.69	12.62	
<b>Promedio</b>	1.61	1.66	<b>3.68</b>	13.71	13.25	<b>3.29</b>
<b>DS</b>	0.08	0.09		0.31	0.61	
<b>% CV</b>	<b>4.69</b>	<b>5.19</b>		<b>2.26</b>	<b>4.64</b>	

C<sub>recuperada</sub>: Concentración recuperada.

**c) Estabilidad a corto plazo (temperatura ambiente).**

En la tabla 24 se presentan los resultados de la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente. En ella se puede observar que el valor promedio del % Desv. Abs. no fue mayor al 15 % del valor promedio de las muestras que se procesaron frescas y el % CV no es superior al 15 %. Dado lo anterior, las muestras plasmáticas conteniendo lamotrigina se mantienen estables a temperatura ambiente durante 24 horas, de acuerdo con lo establecido por la FDA y la NOM-177-SSA-1998 [48,49].

**Tabla 24. Estabilidad a corto plazo.**

Réplica	C recuperada punto bajo (1.5 µg/mL)			C recuperada punto alto (12 µg/mL)		
	Inmediatos	Mesa 24 h	% Desv. Abs.	Inmediatos	Mesa 24 h	% Desv. Abs.
1	1.79	1.90		13.35	14.61	
2	1.73	1.77		12.97	14.39	
3	1.89	1.97		14.36	15.41	
4	1.90	1.98		14.78	14.99	
5	1.91	1.85		13.71	14.84	
<b>Promedio</b>	1.84	1.89	<b>2.93</b>	13.83	14.85	<b>7.46</b>
<b>DS</b>	0.08	0.09		0.73	0.39	
<b>% CV</b>	<b>4.39</b>	<b>4.61</b>		<b>5.30</b>	<b>2.63</b>	

C<sub>recuperada</sub>: Concentración recuperada.

***d) Estabilidad de las soluciones estándar en refrigeración.***

En la tabla 25 se pueden apreciar los resultados de la estabilidad de la solución estándar de lamotrigina, mientras que en la tabla 26 los de la solución estándar de diazepam en refrigeración durante 15 días. De acuerdo a los resultados, las soluciones estándar de lamotrigina y diazepam, almacenadas en refrigeración durante 15 días, permanecieron estables, ya que el valor promedio de la relación de alturas de estas muestras, se encontró dentro del 15 % del valor promedio de la relación de alturas de las muestras procesadas inmediatamente (día 0) y el % CV no es mayor al 15 %. Dado la anterior, pueden ser utilizadas en los análisis de al menos 15 días continuos sin necesidad de renovarlas.

**Tabla 25. Estabilidad de la solución estándar de LTG en refrigeración (5 - 7 °C).**

	<b>Alturas LTG/DZP</b>				
<b>Réplica</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 7</b>	<b>% Desv. Abs.</b>	<b>Día 14</b>	<b>% Desv. Abs.</b>
<b>1</b>	27.85	27.92		27.96	
<b>2</b>	27.71	27.93		27.19	
<b>3</b>	27.63	26.89		27.43	
<b>4</b>	27.72	27.21		26.95	
<b>5</b>	27.41	27.83		26.20	
<b>Promedio</b>	27.66	27.56	<b>1.04</b>	27.15	<b>1.88</b>
<b>DS</b>	0.16	0.48		0.65	
<b>% CV</b>	<b>0.58</b>	<b>1.74</b>		<b>2.38</b>	

**Tabla 26. Estabilidad de la solución estándar de DZP en refrigeración (5 - 7 °C).**

	<b>Alturas diazepam.</b>				
<b>Réplica</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 7</b>	<b>% Desv. Abs.</b>	<b>Día 14</b>	<b>% Desv. Abs.</b>
<b>1</b>	175.21	166.18		153.59	
<b>2</b>	172.83	162.71		161.42	
<b>3</b>	163.22	163.41		161.61	
<b>4</b>	175.32	160.03		157.79	
<b>5</b>	176.97	173.97		153.16	
<b>Promedio</b>	172.71	165.26	<b>0.04</b>	157.51	<b>0.09</b>
<b>DS</b>	5.50	5.34		4.08	
<b>% CV</b>	<b>3.19</b>	<b>3.23</b>		<b>2.59</b>	

Con base en lo anterior, se demostró que el método analítico desarrollado, cumple con los parámetros establecidos de la validación incluyendo, selectividad, linealidad, precisión y exactitud. Además de presentar un recobro absoluto



satisfactorio, una estabilidad y desempeño adecuado a las condiciones de rutina y de haber determinado sus límites de cuantificación y detección, por lo que puede ser utilizado para estudios de farmacocinética clínica o en el monitoreo terapéutico de este fármaco. Esta validación se llevó a cabo de acuerdo con los criterios y parámetros establecidos por la NOM-177-SSA-1998 [48] y por la guía para la validación de métodos bioanalíticos propuesta por la FDA [49].

### 5.3 Estudio de Biodisponibilidad.

#### 5.3.1 Características demográficas de los voluntarios que participaron en el estudio.

De los 24 voluntarios pacientes reclutados, 20 se incluyeron en el estudio. De entre ellos, 4 fueron excluidos por las siguientes razones:

- Voluntarios 11 y 16 presentaron fragilidad capilar.
- Voluntario 9 con inversión del esquema de tratamiento de B-A al esquema A-B.
- Voluntario 10 presentó crisis convulsiva.

Los 16 voluntarios restantes (9 mujeres y 7 hombres), concluyeron el estudio. Todos los voluntarios se encontraban en el estado estacionario desde el inicio del estudio. En la tabla 27 se pueden apreciar los datos demográficos de los voluntarios que participaron, así como la dosis, medicamentos concomitantes y la secuencia de administración de medicamento, en la cual A corresponde al producto de referencia y B al producto de prueba.

**Tabla 27. Datos demográficos de los voluntarios.**

Voluntario	Edad.	Peso.	D (mg) LTG	Secuencia.	Medicamentos concomitantes.
1	53	78	200	A-B	Valproato de magnesio, clonazepam.
2	18	58	250	B-A	Carbamazepina.
3	35	62	300	A-B	Valproato de magnesio, levotiroxina
4	31	70	200	A-B	Valproato de magnesio.
5	50	76	200	A-B	Valproato de magnesio, carbamazepina.
6	32	87	200	B-A	Valproato de magnesio.
7	33	63	100	B-A	-
8	18	60	250	B-A	Valproato de magnesio.
12	21	52	150	A-B	Valproato de magnesio.
13	45	60	400	B-A	Valproato de magnesio, carbamazepina, risperidona.

14	35	93	200	A-B	Valproato de magnesio.
15	40	80	200	B-A	-
17	25	53	100	B-A	-
18	53	94	100	A-B	Carbamazepina, clonazepam.
19	19	57	100	A-B	Fenitoína.
20	30	91	100	B-A	-
<b>Promedio</b>	33.6	70.88	190.6		

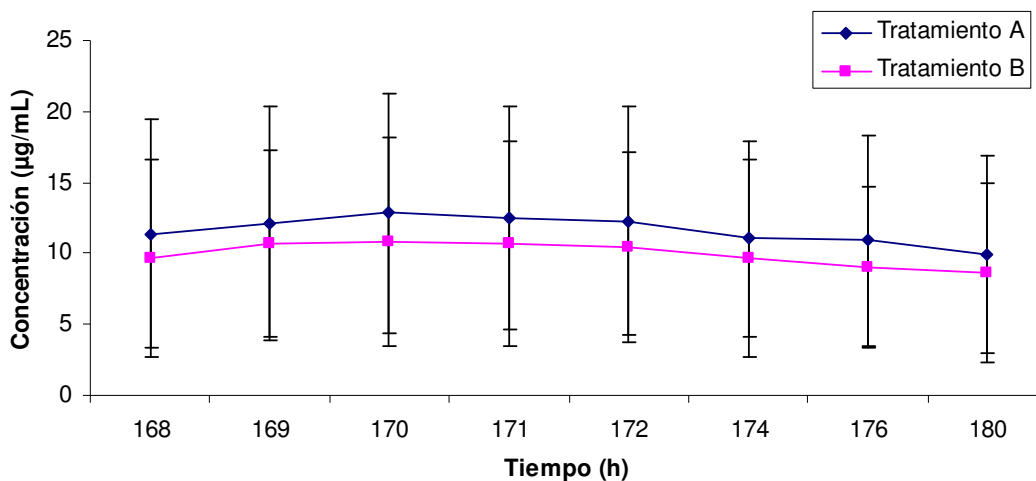
### 5.3.2 Farmacocinética.

#### 5.3.2.1 Niveles de lamotrigina en el estado estacionario

En la tabla 28 se presentan los valores promedio de la concentración plasmática de lamotrigina, en el estado estacionario a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de ambos productos y en la figura 8 se presenta la gráfica correspondiente. En ella se observa que los niveles plasmáticos promedio tienen un comportamiento similar en ambos tratamientos.

**Tabla 28. Concentraciones plasmáticas promedio de lamotrigina  $\pm$  DS, en estado estacionario después de la administración de ambos tratamientos (n=16).**

Tiempo (h)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Tratamiento A	Tratamiento B
168	11.40 $\pm$ 8.00	9.71 $\pm$ 6.94
169	12.15 $\pm$ 8.25	10.68 $\pm$ 6.56
170	12.85 $\pm$ 8.42	10.19 $\pm$ 7.60
171	12.49 $\pm$ 7.92	10.72 $\pm$ 7.23
172	12.30 $\pm$ 8.07	10.43 $\pm$ 6.71
174	11.03 $\pm$ 6.92	9.69 $\pm$ 6.92
176	10.91 $\pm$ 7.45	8.98 $\pm$ 5.66
180	9.88 $\pm$ 6.95	8.67 $\pm$ 6.34



**Figura 8. Niveles plasmáticos promedio de lamotrigina vs tiempo en el estado estacionario, durante el tratamiento A y B (n=16).**

En la tabla 29, se presentan los valores de concentración plasmática para cada voluntario después de la administración de ambas formulaciones. En ella se puede observar que en los pacientes bajo estudio, existe una gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos. Dicha variabilidad puede deberse tanto a factores exógenos como alimentos, medicamentos, régimen de dosificación, edad, actividad física o incluso la contaminación ambiental, así como a factores de tipo endógeno como ciclos hormonales, alteraciones o polimorfismos genéticos.

Al relacionar las concentraciones obtenidas con el régimen de dosificación individual, se puede observar que los voluntarios bajo tratamiento con la dosis más baja (100 mg), presentaron los niveles más bajos, sin embargo, el paciente 17, que tomó la misma dosis no presentó este comportamiento. Analizando los pacientes que tomaron 200 mg, se encontró que los niveles van de 7.23 µg/mL - 23.9 µg/mL. Dado lo anterior, se ajustaron los datos por dosis individual, a cada tiempo de muestreo (Tabla 30). Sin embargo, estos datos demuestran que dicha variabilidad se mantiene. Este comportamiento advertido durante el estudio, concuerda con lo ya reportado en 1997 por Garnett *et al.* [29], destacando la importancia que tiene la individualización del régimen de dosificación de este fármaco, de acuerdo a la respuesta terapéutica de cada paciente.

**Tabla 29. Concentraciones plasmáticas individuales después de la administración de ambos tratamientos.**

		Concentración (µg/mL)																		
		No. de voluntario.																		
D (mg)		200	250	300	200	200	200	100	250	150	400	200	200	100	100	100	100	Media	DS	% CV
Tx	t (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	12	13	14	15	17	18	19	20			
<b>A</b>	168	8.13	8.64	16.94	12.45	7.10	25.55	2.79	11.98	24.20	21.88	17.96	9.77	10.60	1.36	0.51	2.66	11.40	8.01	70.21
	169	10.04	12.71	20.44	12.58	8.42	25.49	2.80	13.69	21.62	24.25	19.42	12.45	5.66	2.21	1.18	1.41	12.15	8.25	67.91
	170	10.04	11.83	20.43	14.74	8.07	25.18	4.08	18.00	23.68	24.57	20.47	12.31	6.71	2.45	1.31	1.70	12.85	8.42	65.57
	171	10.29	12.58	20.42	13.11	7.77	22.49	3.89	16.37	21.61	24.43	21.10	13.36	5.45	2.36	1.66	2.98	12.49	7.92	63.37
	172	9.85	11.92	19.64	14.70	7.47	24.62	3.83	16.81	22.96	25.30	16.76	9.66	6.11	2.16	1.37	3.63	12.30	8.08	65.66
	174	9.10	10.56	17.05	12.14	7.51	22.31	3.30	15.44	19.64	21.24	15.94	9.38	5.42	1.87	1.84	3.76	11.03	6.92	62.72
	176	9.39	8.67	17.62	11.36	6.77	23.59	2.98	16.16	19.50	21.41	16.91	10.39	4.23	1.83	1.58	2.15	10.91	7.45	68.28
	180	8.79	7.25	14.68	11.00	4.74	21.97	3.07	13.38	18.64	18.80	17.79	9.30	3.98	1.39	1.25	2.11	9.88	6.95	70.32
<b>B</b>																				
	168	12.68	6.83	18.26	16.70	5.25	22.97	2.47	12.59	14.45	15.31	12.55	8.37	4.29	1.09	0.68	0.86	9.71	6.94	71.49
	169	12.56	6.55	18.11	15.43	7.69	23.45	1.56	14.27	16.06	17.42	10.12	10.44	9.58	-	1.07	2.71	11.13	6.52	58.56
	170	12.78	6.24	17.40	15.84	-	25.76	2.82	14.42	16.64	18.05	11.16	6.92	10.35	1.62	0.77	2.22	10.87	7.34	67.57
	171	14.04	6.73	17.43	15.65	8.44	25.83	1.37	14.80	15.38	18.88	10.50	8.86	9.03	1.61	0.59	2.38	10.72	7.23	67.43
	172	12.79	7.12	17.90	17.03	8.36	22.72	1.49	14.71	13.28	18.22	10.04	8.36	9.82	1.59	0.64	2.80	10.43	6.71	64.33
	174	11.45	5.17	17.74	15.89	7.20	23.76	1.09	12.91	15.13	16.94	9.71	7.69	5.97	1.60	0.71	2.46	9.70	6.92	71.42
	176	12.01	4.87	17.56	12.05	6.37	-	-	12.19	13.55	16.41	10.71	-	6.69	1.46	0.68	2.43	8.98	5.66	63.02
180	11.10	3.90	17.68	13.01	5.95	20.89	0.91	12.04	-	16.29	9.08	6.64	6.66	2.68	0.59	2.95	8.67	6.34	73.08	

Tx: tratamiento, t: tiempo en horas, D: dosis en miligramos.

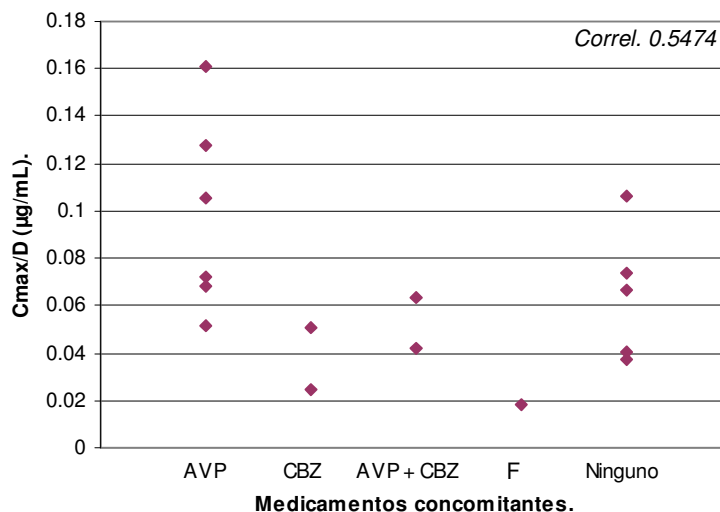
**Tabla 30. Concentraciones plasmáticas individuales ajustadas a dosis con ambos tratamientos.**

		Concentración (µg/mL)																		
		No. de voluntario.																		
D (mg)		200	250	300	200	200	200	100	250	150	400	200	200	100	100	100	100	Media	DS	% CV
Tx	t (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	12	13	14	15	17	18	19	20			
<b>A</b>	168	0.041	0.035	0.056	0.062	0.036	0.128	0.028	0.048	0.161	0.055	0.090	0.049	0.086	0.014	0.005	0.027	0.057	0.041	71.86
	169	0.050	0.051	0.068	0.063	0.042	0.127	0.028	0.055	0.144	0.061	0.097	0.062	0.057	0.022	0.012	0.014	0.060	0.037	62.08
	170	0.050	0.047	0.068	0.074	0.040	0.126	0.041	0.072	0.158	0.061	0.102	0.062	0.067	0.025	0.013	0.017	0.064	0.038	60.19
	171	0.051	0.050	0.068	0.066	0.039	0.112	0.039	0.065	0.144	0.061	0.105	0.067	0.054	0.024	0.017	0.030	0.062	0.034	54.56
	172	0.049	0.048	0.065	0.074	0.037	0.123	0.038	0.067	0.153	0.063	0.084	0.048	0.061	0.022	0.014	0.036	0.061	0.036	57.96
	174	0.046	0.042	0.057	0.061	0.038	0.112	0.033	0.062	0.131	0.053	0.080	0.047	0.054	0.019	0.018	0.038	0.056	0.030	54.47
	176	0.047	0.035	0.059	0.057	0.034	0.118	0.030	0.065	0.130	0.054	0.085	0.052	0.042	0.018	0.016	0.027	0.054	0.033	60.14
	180	0.044	0.029	0.049	0.055	0.024	0.110	0.031	0.054	0.124	0.047	0.089	0.047	0.040	0.014	0.012	0.021	0.049	0.033	65.97
<b>B</b>																				
	168	0.063	0.027	0.061	0.083	0.026	0.115	0.025	0.050	0.096	0.038	0.063	0.042	0.063	0.016	0.007	0.009	0.049	0.031	63.96
	169	0.063	0.026	0.060	0.077	0.038	0.117	0.016	0.057	0.107	0.044	0.051	0.052	0.096	0.028	0.011	0.027	0.054	0.032	58.35
	170	0.064	0.025	0.058	0.079	-	0.129	0.028	0.058	0.111	0.045	0.056	0.035	0.104	0.019	0.008	0.022	0.056	0.036	64.63
	171	0.070	0.027	0.058	0.078	0.042	0.129	0.014	0.059	0.103	0.047	0.053	0.044	0.090	0.016	0.006	0.024	0.054	0.034	63.53
	172	0.064	0.028	0.060	0.085	0.042	0.114	0.015	0.059	0.089	0.046	0.050	0.042	0.098	0.016	0.006	0.028	0.053	0.031	59.65
	174	0.057	0.021	0.059	0.079	0.036	0.119	0.011	0.052	0.101	0.042	0.049	0.038	0.060	0.016	0.006	0.025	0.048	0.032	65.50
	176	0.060	0.019	0.059	0.060	0.032	-	-	0.049	0.090	0.041	0.054	-	0.067	0.015	0.005	0.024	0.044	0.024	54.76
180	0.056	0.016	0.059	0.065	0.030	0.104	0.009	0.048	-	0.041	0.045	0.033	0.067	0.017	-	0.029	0.044	0.025	57.15	

Tx: tratamiento, t: tiempo en horas, D: dosis en miligramos.

Dado que la lamotrigina es un fármaco relativamente nuevo, existen controversias en relación al intervalo terapéutico de este fármaco. De acuerdo a lo indicado en la sección 3.6, el rango terapéutico propuesto internacionalmente es de 1 - 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [29,35,37]. Sin embargo, a pesar de estas propuestas, no se ha encontrado una relación entre el rango terapéutico y la efectividad clínica. Se menciona que algunos pacientes toleran concentraciones mayores a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sin presentar toxicidad [29,33,37,53]. De modo que, en un estudio publicado por Ryan *et al*, en el que se midieron niveles de lamotrigina en plasma y saliva en pacientes bajo tratamiento, reportando concentraciones séricas de 1.5 - 17.2  $\pm$  4.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y en saliva de 1.1 - 20.4  $\pm$  3.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [53]. Otros autores como Dasgupta *et al*. reportan concentraciones de 2.3 - 18.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incluso existe un reporte con un rango de efectividad de 2 - 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [5]. Analizando los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede observar que los voluntarios 7, 18, 19 y 20 presentan niveles plasmáticos bajos a comparación del resto, e incluso se tienen valores por debajo del rango propuesto, por lo que pudieran presentar ineficacia terapéutica. Sin embargo, al llenar el calendario de crisis (apéndice C) durante los días de estudio clínico, no se reportó ninguna crisis, con excepción del voluntario 18 que reportó una durante el mes de duración del estudio. Por su parte los voluntarios 3, 6, 12, 13 y 14 presentan concentraciones plasmáticas que sobrepasan los 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante el tiempo de estudio, en por lo menos uno de los tratamientos sin presentar efecto adverso alguno. Por lo que, sería conveniente llevar a cabo más estudios para determinar el rango terapéutico real de este fármaco.

En la figura 9 se relacionan los niveles de concentración máxima ajustada por dosis vs los medicamentos concomitantes. Se observa que los pacientes que presentan las mayores concentraciones plasmáticas, tomaban un inhibidor enzimático (valproato de magnesio). Sin embargo, los voluntarios 4, 5 y 8 tomando el mismo inhibidor, no se ven afectados. Adicionalmente, la correlación entre estos factores es baja, indicando que no existe realmente una relación directa entre ellos. Los pacientes 18 y 19, bajo tratamiento con inductores enzimáticos como carbamazepina y fenitoína, fueron los que presentaron niveles más bajos.



**Figura 9. Relación entre la Cmax/D y los medicamentos concomitantes.**

Los datos presentados establecen la necesidad de individualizar la terapia de este fármaco, especialmente al utilizarlo con inhibidores enzimáticos, para con ello asegurar la eficacia y seguridad en su administración.

Además de los factores analizados anteriormente, la variabilidad encontrada puede deberse también a factores de tipo endógeno. Tal y como se señala en la sección 3.6, el metabolismo de la lamotrigina es catalizado por la UGT1A4. Las uridin difosfato glucuronosil transferasas son una superfamilia de enzimas encargadas de la eliminación de un gran número de compuestos tanto exógenos como endógenos. La isoforma 1A4 presenta substratos como alcoholes, aminas primarias y secundarias, incluyendo la nicotina, la imipramina, las saponinas, la trifluoroperazina y el tamoxifén entre otros. A nivel endógeno se encarga de andrógenos, progestágenos y hormonas esteroideas. Se expresa principalmente en hígado, ductos biliares, colon, intestino delgado y páncreas. También se ha encontrado una posible asociación entre la UGT1A4 con carcinoma hepatocelular [55,56].

Recientemente se ha encontrado que esta enzima del metabolismo de fase II, presenta al menos 21 variaciones genéticas (polimorfismos) en su primer exón [55,56]. Algunos estudios han demostrado, que existen diferencias en la capacidad de glucuronidación de esta isoforma dependiendo de la variante



polimórfica de la que se trate. De modo que, se presenta una reducción en el metabolismo hepático en la glucoronidación de substratos tales como la  $\beta$ -naftilamina, la bencidina, la trans-andosterona y la dihidrotestosterona [55-57]. Dado lo anterior, es posible que el metabolismo de la lamotrigina se vea afectado por la variante polimórfica que cada individuo presenta, resultando en una gran variabilidad en los niveles plasmáticos de LTG, como sería nuestro caso.

Ahora bien, se ha encontrado que la regulación transcripcional de los genes que codifican para la expresión de las UGTs, esta mediada por receptores nucleares a nivel celular, tales como el receptor constitutivo de androstanos, el receptor de pregnanos X y el receptor activado-proliferador de peroxisomas. Por lo que su inducción se ve afectada por los ciclos hormonales endógenos. Así mismo, la expresión de estas enzimas, es regulada por el receptor para aril hidrocarburos (AhR) [58,59]. Cuando este último se une a su ligando y se activa, se une a la proteína nuclear translocadora del AhR (ARNT), formando un heterodímero que a su vez, se une a los elementos de respuesta para xenobióticos, localizados en el promotor del gen y regiones reguladoras 5' del gen, activando la transcripción de genes que codifican a las enzimas de Fase I y II del metabolismo. Es por ello que la UGT1A4 es inducida por contaminantes ambientales como la bencidina, la  $\beta$ -naftilamina y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), de hecho esta última es utilizada como biomarcador de exposición a HPA [56,57,59,60]. Por lo que es posible que al estar expuestos a contaminantes ambientales, o bien dependiendo los ciclos hormonales endógenos o terapéuticos [61], esta enzima catalizadora se vea inducida, afectado el metabolismo de fármacos como la LTG, resultando en una gran variabilidad en los niveles plasmáticos del mismo.

### 5.3.2.2 Parámetros farmacocinéticos.

En la tabla 31 se presentan los resultados individuales de los parámetros farmacocinéticos de lamotrigina en los 16 voluntarios, para los dos tratamientos, utilizando el programa Win Non Lin versión 4.0.1. En la tabla se muestran también los valores promedio del cociente B/A en valor porcentual. En ella se puede observar la similitud entre tratamientos. Así mismo, el promedio del cociente B/A es superior al 85 % en todos los parámetros.

**Tabla 31. Parámetros farmacocinéticos ajustados por dosis, con ambos tratamientos en estado estacionario.**

	<b>Tmax<sub>ee</sub> (h)</b>		<b>Cmax<sub>ee</sub> (µg/mL)</b>		<b>ABC<sub>0-12h</sub> (µg·h/mL)</b>		<b>Cmin<sub>ee</sub> (µg/mL)</b>		<b>Cprom<sub>ee</sub> (µg/mL)</b>		<b>Fluctuación%</b>	
	<b>Tratamiento</b>		<b>Tratamiento</b>		<b>Tratamiento</b>		<b>Tratamiento</b>		<b>Tratamiento</b>		<b>Tratamiento</b>	
<b>Voluntario</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
1	171	171	10.29	14.04	113.16	146.04	8.13	11.1	9.43	12.17	22.91	24.16
2	169	172	12.71	7.12	120.95	66.37	7.25	3.9	10.08	5.53	54.17	58.22
3	169	168	20.44	18.26	215.54	212.44	14.68	17.4	17.96	17.7	32.07	4.86
4	170	172	14.74	17.03	149.07	174.77	11	12.05	12.42	14.56	30.11	34.19
5	169	171	8.42	8.44	83.83	84.77	4.74	5.25	6.99	7.06	52.68	45.16
6	168	171	25.55	25.83	282.2	278.32	21.97	20.89	23.52	23.19	15.22	21.3
7	170	170	4.08	2.82	39.59	16.31	2.79	0.91	3.3	1.36	39.1	140.53
8	170	171	18	14.8	185.39	158.32	11.98	12.04	15.45	13.19	38.97	20.92
12	168	170	24.2	16.64	248.51	119.04	18.64	13.28	20.71	14.22	26.85	23.62
13	172	171	25.3	18.88	266.45	205.03	18.8	15.31	22.2	17.09	29.27	20.9
14	171	168	21.1	12.55	213.3	122.83	15.94	9.08	17.78	10.24	29.03	33.9
15	171	169	13.36	10.44	126.03	93.63	9.3	6.64	10.5	7.8	38.66	48.7
17	168	170	10.6	10.35	63.78	91.17	3.98	4.29	5.31	7.6	124.56	79.77
18	170	180	2.45	2.68	22.95	20.46	1.36	1.09	1.91	1.7	56.99	93.28
19	174	169	1.84	1.07	17.33	6.27	0.51	0.59	1.44	0.52	99.02	149.28
20	174	180	3.76	2.95	31.06	30.05	1.41	0.86	2.59	2.5	90.81	83.46
<b>B/A (%)</b>	-		88.80		85.22		89.09		86.51		-	
<b>Promedio</b>	170.25	171.44	13.55	11.49	136.19	114.11	9.52	8.40	11.35	9.78	48.78	55.14
<b>DS</b>	1.88	3.56	8.22	7.06	90.15	78.64	6.94	6.46	7.51	6.66	30.67	43.23
<b>% CV</b>	1.10	2.10	60.70	61.40	66.20	68.90	72.80	76.90	66.20	68.10	62.90	78.40

A pesar de las similitudes en los datos promedio, en las figuras 10 y 11 se presentan las gráficas mostrando las diferencias a nivel individual entre sujetos, así como las diferencias existentes dependiendo del tratamiento, para  $C_{max_{ee}}$  y  $ABC_{0-12h}$ .

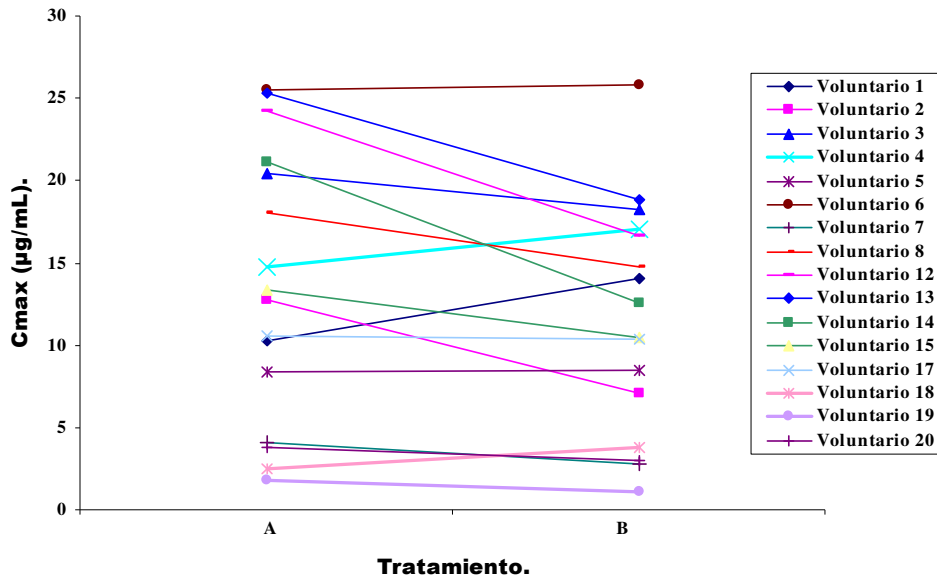


Figura 10. Variabilidad intra e inter individual en la  $C_{max}$  de lamotrigina.

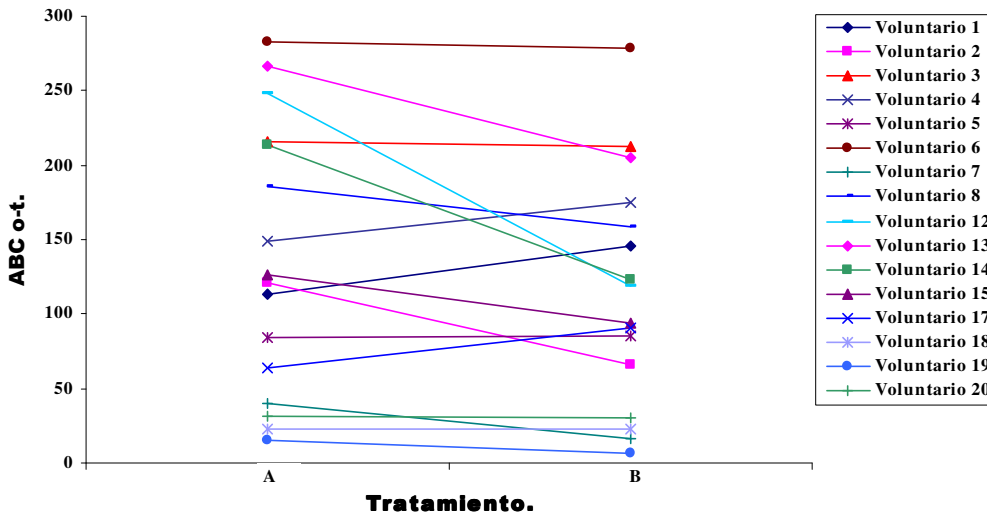
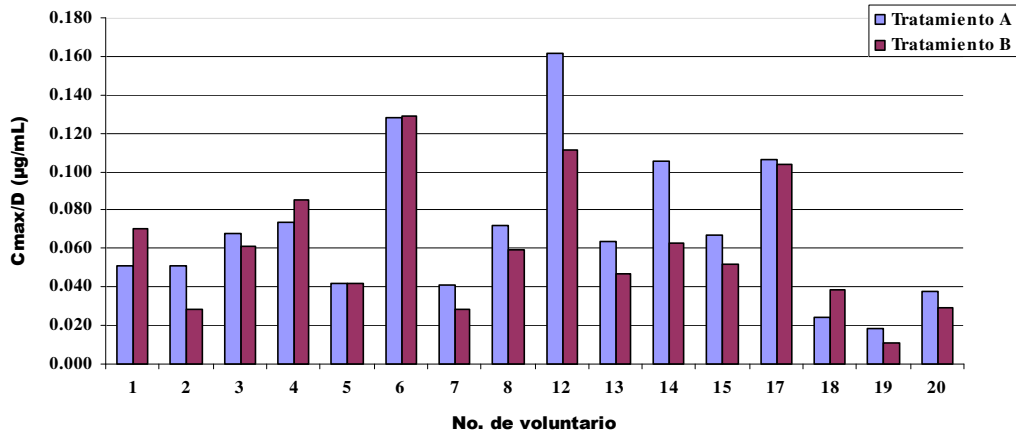


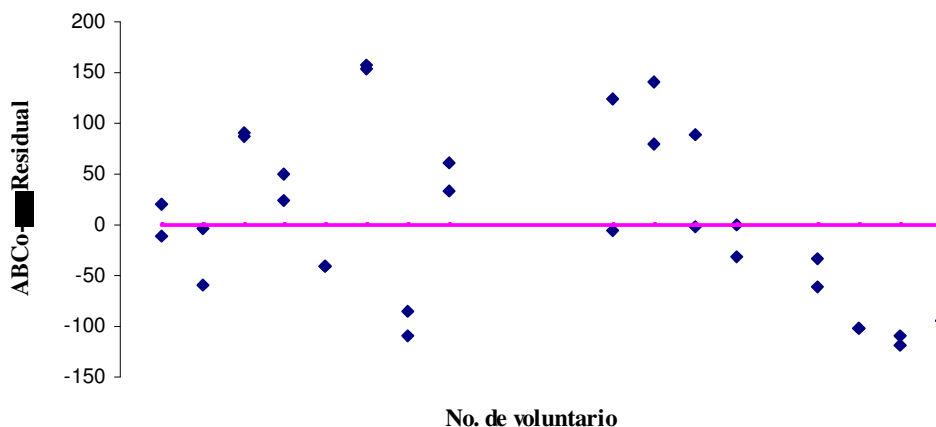
Figura 11. Variabilidad intra e inter individual en la  $ABC_{0-\infty}$  de lamotrigina.

En la figura 12, se pueden apreciar los valores individuales de  $C_{max_{ee}}$  ajustados por dosis. En esta gráfica se constata que a pesar del ajuste, los niveles individuales presentan grandes diferencias.



**Figura 12. Comparación entre tratamientos individual para  $C_{max}$  ajustado por dosis.**

Con el fin de determinar si los datos seguían una distribución normal, se graficó el valor residual estandarizado del área bajo la curva. En la figura 13 se muestra la gráfica de la distribución de los datos. Como se puede apreciar, los datos se distribuyen normalmente y en ninguno de los casos la desviación estándar es mayor a 2, lo que indica que los datos cumplen con el criterio de homocedasticidad.



**Figura 13. Distribución de los datos residuales del  $ABC_{0-12h}$  (homocedasticidad).**

### **5.3.3 Análisis estadístico de los datos.**

En el análisis de la biodisponibilidad, las variables a considerar son el ABC, que garantiza que con el producto de prueba se mantenga la cantidad absorbida y  $C_{max}$  que al igual que  $T_{max}$ , influyen en la velocidad de absorción. Estos parámetros pueden verse afectados a nivel individual por factores como las propiedades del principio activo, su origen, los excipientes, la tecnología, variación intra formulación (variación comprimido a comprimido), la interacción sujeto-formulación o a las variables propias del estudio.

Para determinar si existen diferencias en  $C_{max}$  y ABC entre formulaciones, es decir, del producto de prueba en relación al producto de referencia, se calculó el intervalo de confianza al 90 %. Para ello se requiere llevar a cabo un análisis de varianza de un diseño cruzado, balanceado, doble ciego y aleatorizado, por lo que las fuentes de variación por determinar fueron las siguientes:

#### **Entre sujetos:**

- Secuencia (Sec).
- Sujeto (secuencia) (Suj(sec)).

#### **Dentro de sujetos :**

- Período (Per).
- Formulación (For).
- Residual (Res).
- Total (Tot).

y cuyo modelo estadístico se presenta en la sección 4.2.3. De acuerdo con éste último la secuencia, el periodo y la formulación son efectos fijos e independientes. El sujeto anidado a la secuencia Suj (sec), es un efecto al azar, es decir, es una variable independiente con distribución normal al azar, al igual que el error experimental.

Dado que la mayor parte de las guías recomiendan el uso de transformaciones logarítmicas de estos parámetros ( $\ln ABC_{0-t}$  y  $\ln C_{max_{ee}}$ ), el análisis de

varianza se llevó a cabo empleando datos logarítmicos transformados con ayuda del programa Win Non Lin [48,62].

En la tabla 32 se muestran los resultados de este análisis. Como podemos observar en esta tabla, el valor de  $p > 0.05$  indica que no existe efecto de la secuencia sobre el  $ABC_{0-t}$ , ni sobre  $Cmax_{ee}$ , se observa también que no existe efecto del periodo. El programa no arroja resultados del suj (sec) al ser una variable al azar y el efecto de las formulaciones se analizará ampliamente en la construcción del intervalo de confianza, por lo que se procedió a su cálculo.

**Tabla 32. Análisis de varianza de los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos logarítmicos.**

Variable	Fuente de variación.	F	gl	p
<b>Ln <math>ABC_{0-12h}</math></b>	<b>Secuencia.</b>	0.0640	14	<b>0.8040</b>
	<b>Suj(sec).</b>	318.478	14	-
	<b>Periodo.</b>	0.0059	14	0.9399
	<b>Formulación.</b>	4.9999	14	0.0421
	<b>SC Residual.</b>	0.0837	14	
	<b>Var (Residual)</b>	1.17291		
<b>Ln <math>Cmax_{ee}</math></b>	<b>Secuencia.</b>	0.0866	14	<b>0.7728</b>
	<b>Suj(sec).</b>	106.659	14	-
	<b>Periodo.</b>	1.1900	14	0.2937
	<b>Formulación.</b>	4.79802	14	0.0459
	<b>SC Residual.</b>	0.6114	14	
	<b>Var (Residual)</b>	0.04367		

SC: Suma de cuadrados. gl: Grados de libertad, F: Distribución de F.

### **5.3.5 Biodisponibilidad.**

A partir del análisis de varianza, se estimaron los intervalos de confianza clásico y el de Westlake al 90 % para el la relación B/A. Se considera que no existe diferencia en la biodisponibilidad, si el intervalo de confianza al 90 % del

cociente de los valores promedio, se encuentra entre 0.8 y 1.25 (80% - 125 %), empleando datos transformados logarítmicamente [48,62]. Además, se calculó el valor de Anderson-Hauck que entre más cercano a 0 es más confiable la prueba y el poder de la prueba que debe ser cercano a 1, como se muestra en la tabla 33.

**Tabla 33. Resultados del análisis de biodisponibilidad.**

<b>Parámetro Farmacocinético</b>	<b>Intervalo clásico al 90 %</b>	<b>Intervalo de Westlake al 90 %</b>	<b>Anderson Hauck</b>	<b>Poder de la prueba al 20 % *</b>
<b>Ln ABC<sub>0-12h</sub></b>	66.42 – 95.26	69.31 – 130.68	0.521456	0.659877
<b>Ln Cmax<sub>ee</sub></b>	74.67 – 96.88	77.00 – 122.99	0.210235	0.885742

\* Para un nivel de confianza al 90 %.

En esta tabla, se presentan los resultados del intervalo de confianza al 90 % para ambos parámetros. Como se puede observar, los resultados del intervalo de confianza (IC) no se encuentran dentro del rango establecido. El valor se encuentra hacia la parte baja del IC propuesto. Sin embargo, el valor de Anderson-Hauck y el poder de la prueba al 20 %, indican que la potencia de la prueba es baja principalmente en el ABC<sub>0-t</sub>, por lo que los resultados de la prueba no son concluyentes. Es muy posible que lo anterior, se deba a diferentes factores entre ellos, al número de voluntarios que participaron en el estudio y a las variables que no pudieron controlarse durante el estudio y que son las propias de pacientes ambulatorios y de difícil control como es nuestro caso. Dentro de estas variables se encuentra la dieta alimenticia, así como el apego al régimen de dosificación tanto de la lamotrigina como de los medicamentos concomitantes. En muchas ocasiones los pacientes, no se encuentran en pleno uso de sus facultades mentales y en muchas otras simplemente no pueden valerse por si mismos, por lo que la dieta y dosificación dependen de familiares u otras personas a cargo.

Ahora bien, es importante mencionar que la formulación de prueba se presenta como una formulación de liberación prolongada. Este tipo de formulaciones

esta fundamentada en el principio descrito por Urquhart *et al.* [63] de que las propiedades terapéuticas de una sustancia, dependen mucho más del grado y velocidad de su absorción en el organismo, que de la propia dosis administrada. Por lo que la liberación controlada, debe ser continua a lo largo del tiempo, logrando prolongar la duración de la acción farmacológica y alargar así la frecuencia de administración. Por ende, se logran niveles plasmáticos y tisulares sostenidos con menores fluctuaciones entre el máximo y el mínimo.

En los resultados mostrados en este trabajo, la fluctuación del producto de prueba B, no se vio reducida. Los niveles plasmáticos a lo largo del intervalo de muestreo presentan un comportamiento similar al del producto convencional y, el régimen de dosificación recomendado, es el habitual para lamotrigina de liberación inmediata. Por lo que no se observan características ni ventajas de la liberación prolongada.

Esta es la primera vez que se lleva a cabo un estudio de niveles plasmáticos de lamotrigina en pacientes a nivel nacional. Por los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda se realicen estudios posteriores en voluntarios sanos en monodosis, o bien si se desea hacerlo en pacientes estos deberán estar hospitalizados; con el fin de controlar las variables antes mencionadas.



## 6. CONCLUSIONES.

Se desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, para la cuantificación de lamotrigina en plasma, empleando una técnica de extracción en fase sólida, el cual es sencillo y rápido.

El método demostró ser lineal, preciso y exacto en el rango de concentración de 0.5 - 16 µg/mL sin influencia de dilución, con un por ciento de recobro promedio del 90%. Además el método es selectivo, sin presentar interferencias del plasma, ni de otros fármacos que pueden administrarse concomitantemente tales como acetaminofén, valproato de magnesio, prednisona, imipramina, ranitidina, ni en presencia de heparina o cafeína.

En pacientes bajo terapia con lamotrigina, existe una gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos en el estado estacionario. Entre los factores que pueden contribuir a esta variabilidad se encuentran la dosis, los fármacos concomitantes, los polimorfismos en las enzimas metabolizadoras y otros posibles factores como los ciclos hormonales o la exposición a contaminantes ambientales que puedan inducirlos.

Dada la variabilidad intra e inter individual, así como el tamaño de muestra utilizado al ser un estudio piloto, no fue posible establecer si el producto de prueba presenta la misma biodisponibilidad que el producto de referencia.

## **7. PERSPECTIVAS.**

Llevar a cabo un estudio en voluntarios sanos que permita determinar la biodisponibilidad del producto de liberación controlada, en relación al producto de referencia.

Determinar las variables y covariables que afectan los niveles de lamotrigina, que permitan explicar la variabilidad interindividual.

Realizar un estudio poblacional, que permita determinar los polimorfismos enzimáticos de la UGT1A4 y la manera en que estos afectan el metabolismo de la lamotrigina.

Establecer un rango terapéutico para este fármaco en población mexicana.

Evaluar y comparar los perfiles de disolución de ambos productos, llevados a cabo bajo las mismas condiciones, para establecer las posibles diferencias.

Llevar a cabo estudios en diferentes formas farmacéuticas que contengan lamotrigina, como ciclodextrinas o microemulsiones, que pudieran garantizar la apropiada liberación del principio activo, mejorando su dosificación y sosteniendo sus niveles terapéuticos, evaluando así el impacto en sus parámetros farmacocinéticos.

## APÉNDICE A. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Protocolo: “**Estudio de biodisponibilidad de productos conteniendo lamotrigina**”.

Antes de estar de acuerdo en participar en el estudio que se le ha propuesto, es importante que esté informado sobre las características del estudio y los procedimientos en los que participará. **SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO ES ENTERAMENTE VOLUNTARIA.** En caso de participar, podrá abandonar el estudio en cualquier momento. Este estudio está respaldado por el Comité de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

### **Estudio.**

El estudio tiene como objetivo evaluar la biodisponibilidad de un producto de liberación modificada (producto B), conteniendo 50 mg de lamotrigina. Esta presentación es una formulación de liberación modificada, por lo que se espera que con este producto la absorción sea más lenta y los niveles se mantengan por un período más prolongado de tiempo.

En el estudio participarán 20 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión propuestos por el estudio.

A continuación se describe la metodología que deberá seguir:

- a. Se les informará sobre las características del estudio y en caso de que acepten participar, firmarán esta carta de consentimiento informado.
- b. Los pacientes serán divididos al azar en 2 grupos. El grupo 1 tomará primeramente el producto de referencia (producto A) y posteriormente el producto de prueba (producto B), mientras que el grupo 2, tomará primeramente el producto de prueba (B) y posteriormente el producto de referencia (A).
- c. El médico les proporcionará el medicamento que deberán tomar (Lamotrigina), durante 7 días y se les indicará el día que deben iniciar con la toma del medicamento.
- d. El octavo día del estudio, deberá presentarse en AYUNO en la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por la mañana (6:30 a.m.), SIN HABER TOMADO EL MEDICAMENTO.
- e. Se le colocará en el antebrazo un punzocat intravenoso y una llave de 3 vías para muestras seriadas de sangre. El punzocat se mantendrá permeable utilizando heparina.
- f. A las 8 a.m. se le proporcionará el medicamento y se tomará con 250 mL de agua.
- g. Se le tomarán muestras sanguíneas de 6 mL antes de la dosis y a las 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas después de la administración del mismo.
- h. A las 12 a.m., se le proporcionará un desayuno, a las 4:00 p.m. una comida, a las 7:15 p.m. una cena ligera y la salida del estudio será a las 8:00 p.m.
- i. Después de tomar la última muestra, el médico le proporcionará el tratamiento a seguir durante los siguientes 7 días y a esa hora ingerirá la primera dosis del nuevo tratamiento proporcionando.
- j. El décimo quinto día volverá a repetirse el mismo procedimiento: Se presentará en el Instituto a las 6:30 a.m., se tomarán las muestras sanguíneas y se le proporcionarán los alimentos a la hora indicada en el punto h.

- k. Los días del estudio se les ofrecerá el pago de traslado del INNN a su domicilio.
- l. Una vez terminada esta sesión, el médico le proporcionará un tratamiento gratuito de lamotrigina para 15 días.

**Beneficios.**

Su participación en este estudio es importante, ya que permitirá establecer si los niveles plasmáticos con el producto B son más constantes que con el producto de referencia, ayudando a fijar menos costos para usted y otros pacientes que toman lamotrigina. Usted no obtendrá un beneficio directo al participar en el estudio, salvo recibir el tratamiento en forma gratuita.

**Riesgos.**

No se esperan efectos adversos por los medicamentos administrados dado que usted ya está bajo tratamiento con lamotrigina. Es posible que al hacer el intercambio de los productos se presente algún cambio en las crisis epilépticas (ya sea aumento o disminución) por lo que llevará un calendario de crisis y en cualquier caso deberá comunicarse inmediatamente con el médico residente Dr. Alberto González Aguilar.

**Confidencialidad.**

La información clínica recopilada es estrictamente confidencial. Su nombre nunca aparecerá en ningún reporte o publicación, ya que se siguen los reglamentos internos del INNN y del manual de Buenas Prácticas de Manufactura.

**Importante.**

Su participación es enteramente voluntaria, si desea abandonar el estudio podrá hacerlo en cualquier momento y deberá notificar al investigador a cargo.

**Gracias por tomarse el tiempo de leer detenidamente esta información.**

A través del presente, doy mi consentimiento para participar como voluntario en el protocolo de investigación “**Estudio de biodisponibilidad de productos conteniendo lamotrigina**”.

“Hago constar que he recibido toda la información acerca de la naturaleza y propósito del estudio. He recibido, leído y entendido la carta de información del estudio así como el riesgo descrito. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de ésta forma de consentimiento. Estoy de acuerdo que la información clínica derivada del estudio de mi caso sea comunicada a la comunidad médica verbalmente o por escrito, pero sin revelar mi identidad”.

\_\_\_\_\_ **Nombre y firma del voluntario.**

\_\_\_\_\_ **Nombre y firma del testigo 1.**

\_\_\_\_\_ **Nombre y firma del testigo 2.**

\_\_\_\_\_ **Fecha.**

## **APÉNDICE B. DIETA PROPORCIONADA A LOS PACIENTES LOS DÍAS DE ESTUDIO.**

### **\* *Desayuno (12 a.m.).***

- 1 Cóctel de frutas.
- 1 Sandwich de pollo.
- 1 Jugo.
- 1 Gelatina.
- 1 Vaso de leche o 1 licuado.

### **\* *Comida (4 p.m.).***

- Sopa.
- Ensalada.
- Carne.
- Arroz.
- Postre.
- Agua de frutas.

### **\* *Cena (7:15 p.m.).***

- 1 Yogourth.
- 1 Dona.
- 1 Bebida de chocolate
- 1 Manzana.

**APÉNDICE C. CALENDARIO DE CRISIS Y EFECTOS ADVERSOS.**

**Estudio de Biodisponibilidad de Lamotrigina.**

Nombre del voluntario: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ No. Voluntario: \_\_\_\_\_

Hrs.	16 Nov	17 Nov	18 Nov	19 Nov	20 Nov	21 Nov	22 Nov	23 Nov
0:00								
1:00								
2:00								
3:00								
4:00								
5:00								
6:00								
7:00								
8:00								
9:00								
10:00								
11:00								
12:00								
13:00								
14:00								
15:00								
16:00								
17:00								
18:00								
19:00								
20:00								
21:00								
22:00								
23:00								

Efectos adversos y observaciones:

---

---

---

---

---

**APÉNDICE D. REGISTRO DE TOMA DE MUESTRAS.**

**Estudio de biodisponibilidad de lamotrigina.**

Periodo: \_\_\_\_\_. Fecha: \_\_\_\_\_.

Analista: \_\_\_\_\_.

Muestra	Tiempo (h)	Tiempo real (h)									
		Vol. 1	Vol. 2	Vol. 3	Vol. 4	Vol. 5	Vol. 6	Vol. 7	Vol. 8	Vol. 9	Vol. 10
0	8:00										
1	9:00										
2	10:00										
3	11:00										
4	12:00										
6	14:00										
8	16:00										
12	20:00										

**Observaciones:**

---

---

---

---

---

---

---

---

## APÉNDICE E. ENTREGA Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS.

### Estudio de Biodisponibilidad de lamotrigina.

Periodo: \_\_\_\_\_. Fecha: \_\_\_\_\_.

Analista: \_\_\_\_\_.

**Muestra:** \_\_\_\_\_.

Voluntario	Entregó analista (iniciales)	Recibió (iniciales)	Entregó en laboratorio	Recibió en laboratorio	Hora
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					



## APÉNDICE F. SEPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO.

### Estudio de biodisponibilidad de lamotrigina.

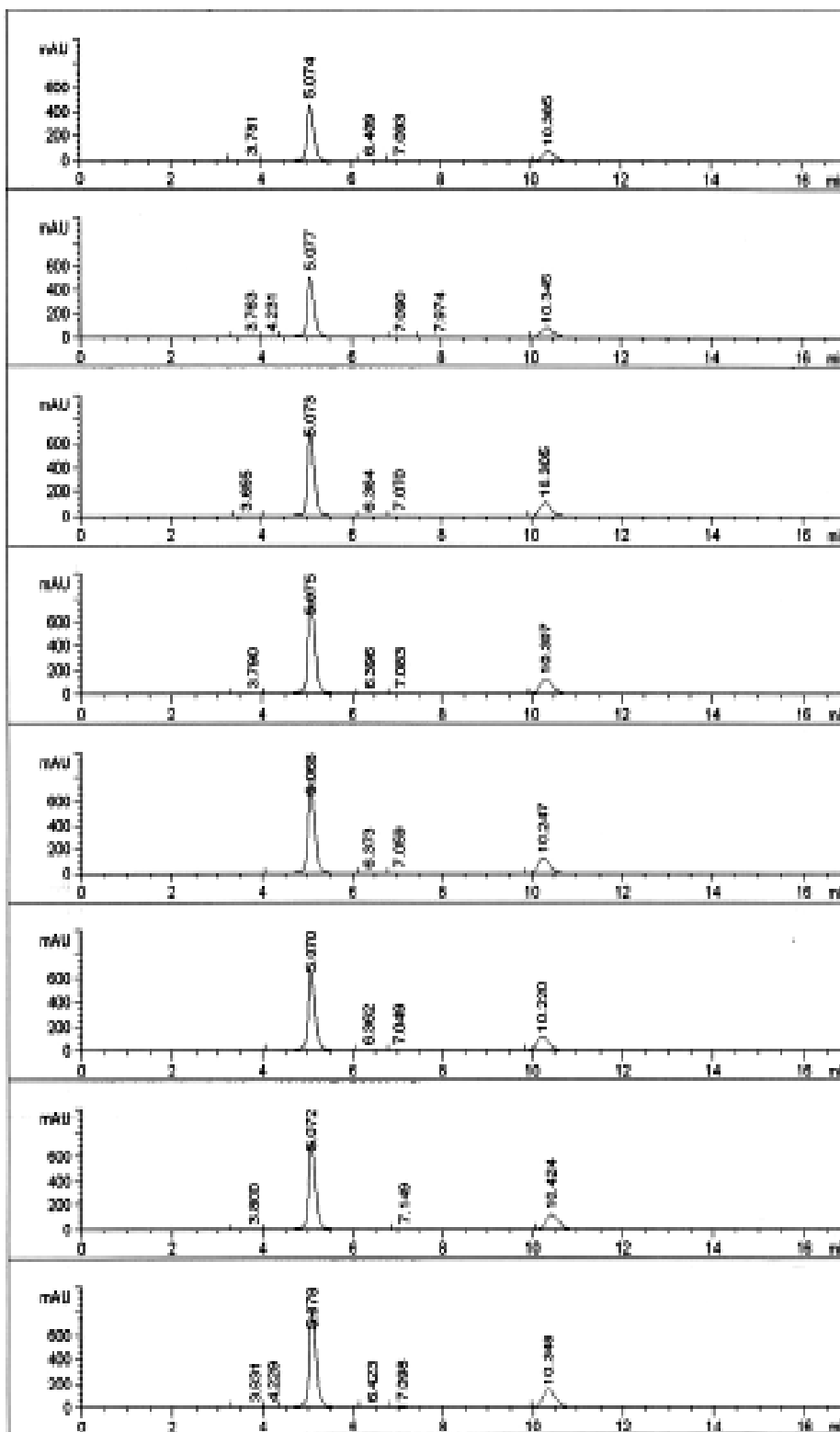
Periodo: \_\_\_\_\_. Fecha: \_\_\_\_\_.

Analista: \_\_\_\_\_.

**Muestra:** \_\_\_\_\_.

Voluntario	Hora de centrifugación	Hora de separación	Separó (iniciales)	Hora de congelación (REVCO)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

**APÉNDICE G. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LOS VOLUNTARIOS A LOS DIFERENTES TIEMPOS.**



Tratamiento: A  
Muestra: 168 h

Tratamiento: A  
Muestra: 169 h

Tratamiento: A  
Muestra: 170 h

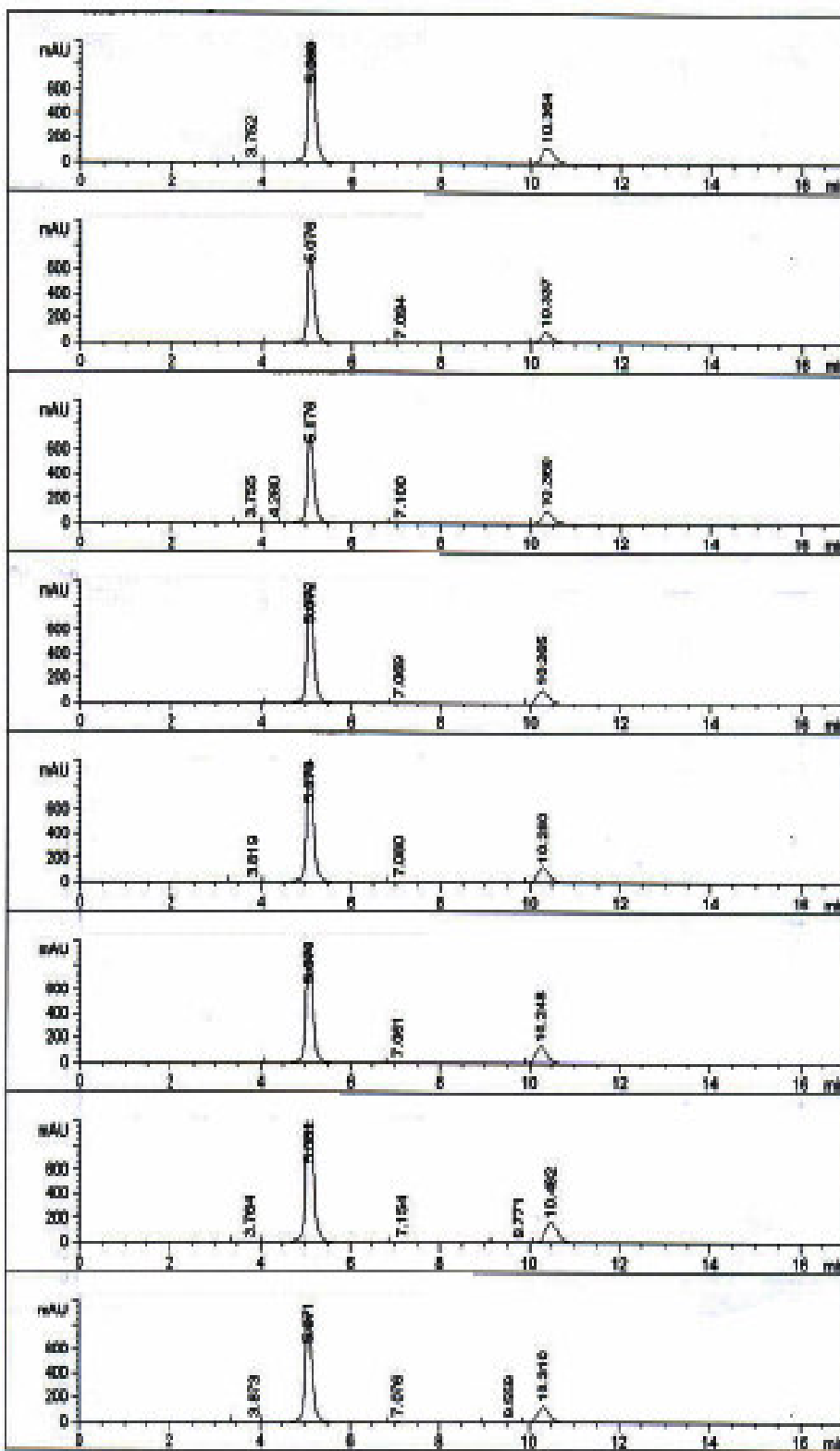
Tratamiento: A  
Muestra: 171 h

Tratamiento: A  
Muestra: 172 h

Tratamiento: A  
Muestra: 174 h

Tratamiento: A  
Muestra: 176 h

Tratamiento: A  
Muestra: 180 h



Tratamiento: B  
Muestra: 168 h

Tratamiento: B  
Muestra: 169 h

Tratamiento: B  
Muestra: 170 h

Tratamiento: B  
Muestra: 171 h

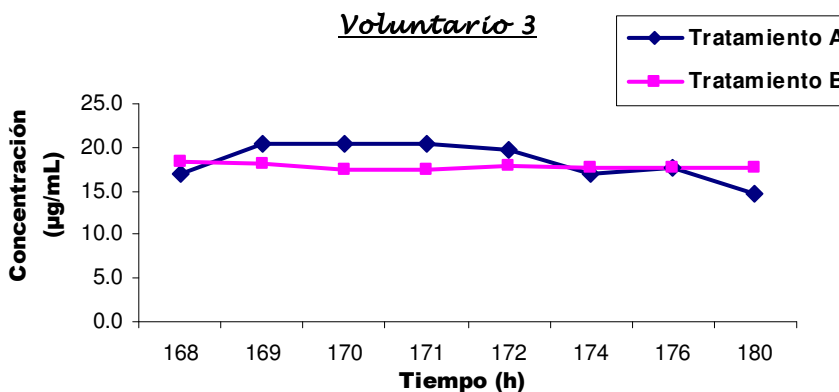
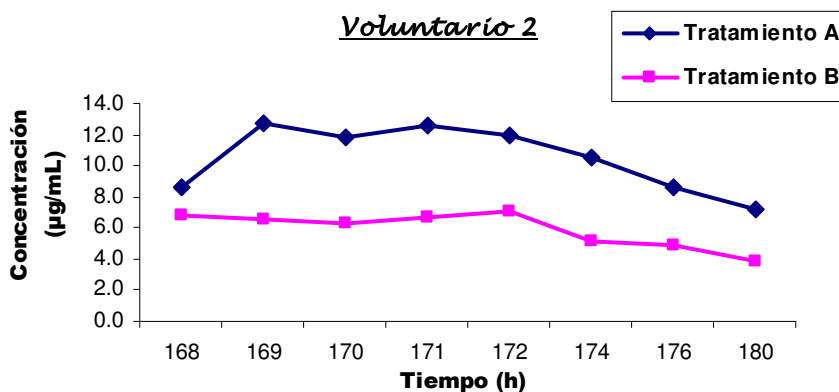
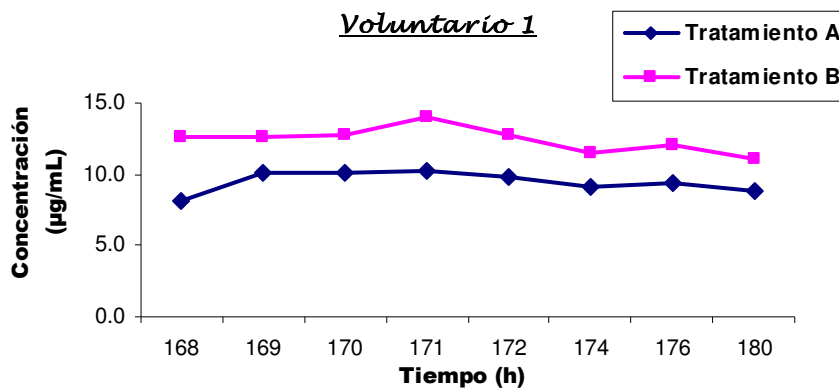
Tratamiento: B  
Muestra: 172 h

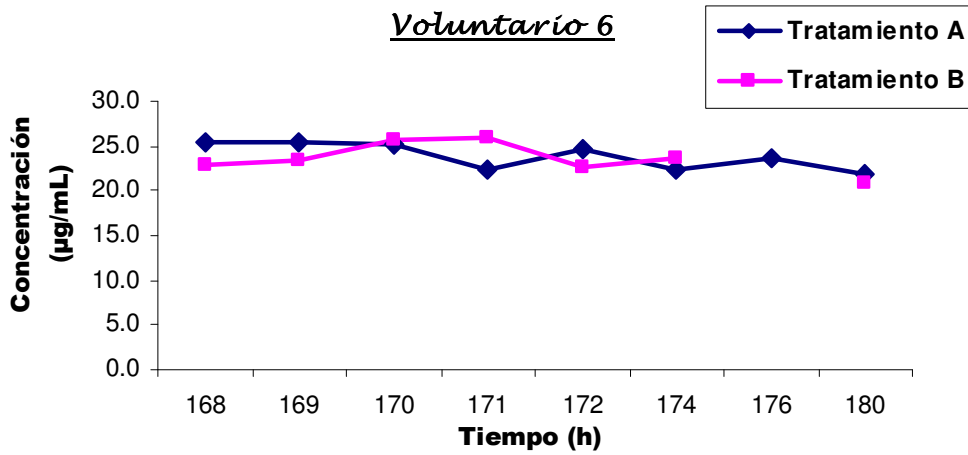
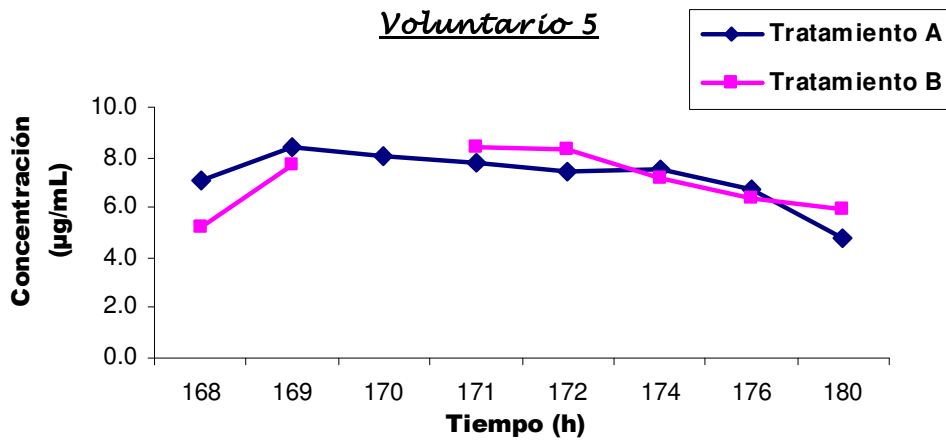
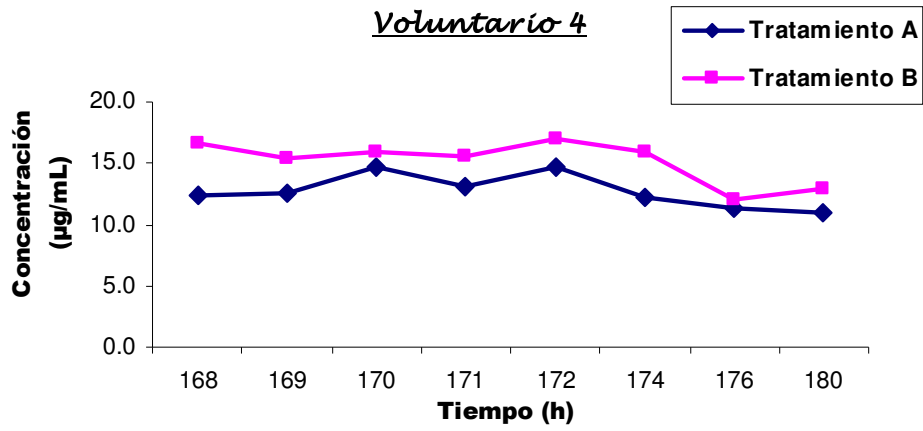
Tratamiento: B  
Muestra: 174 h

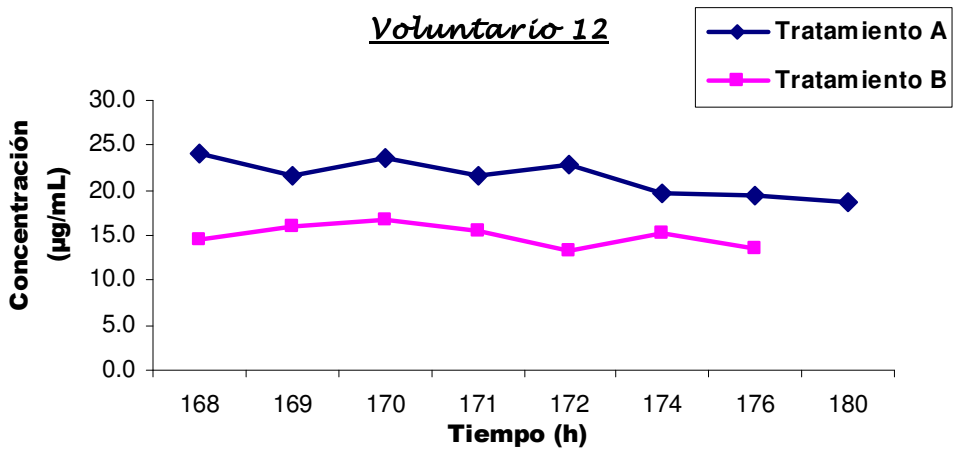
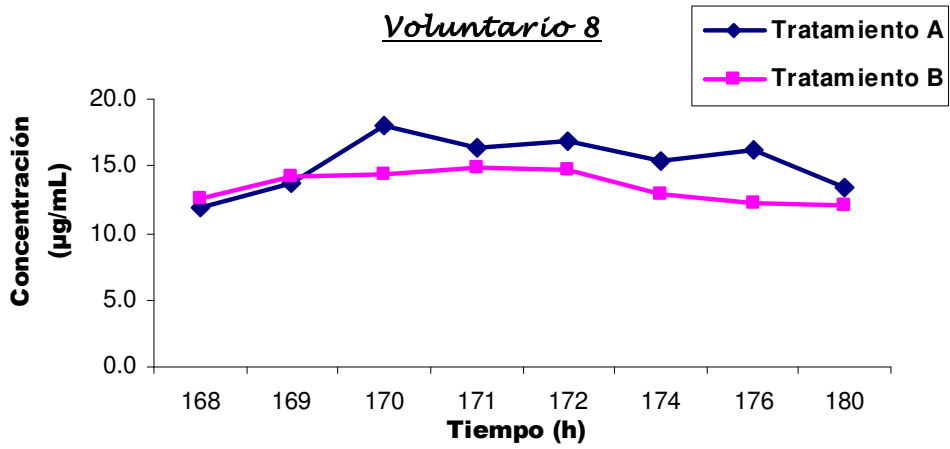
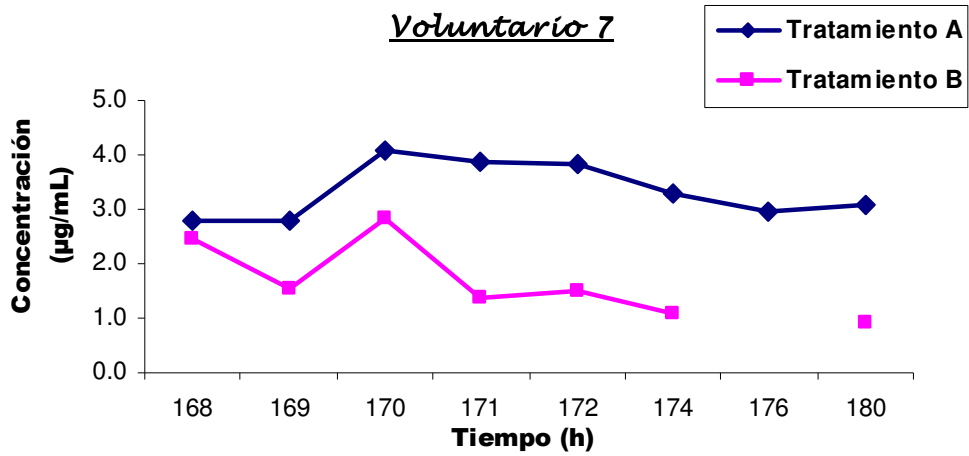
Tratamiento: B  
Muestra: 176 h

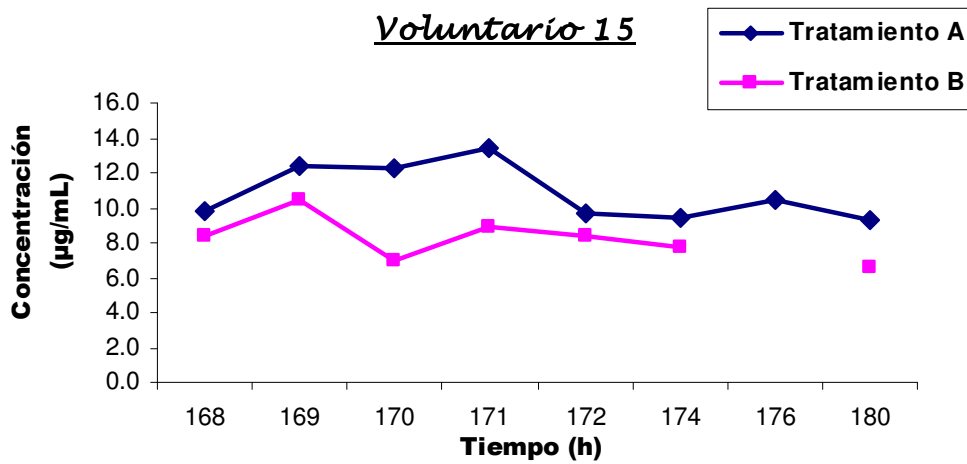
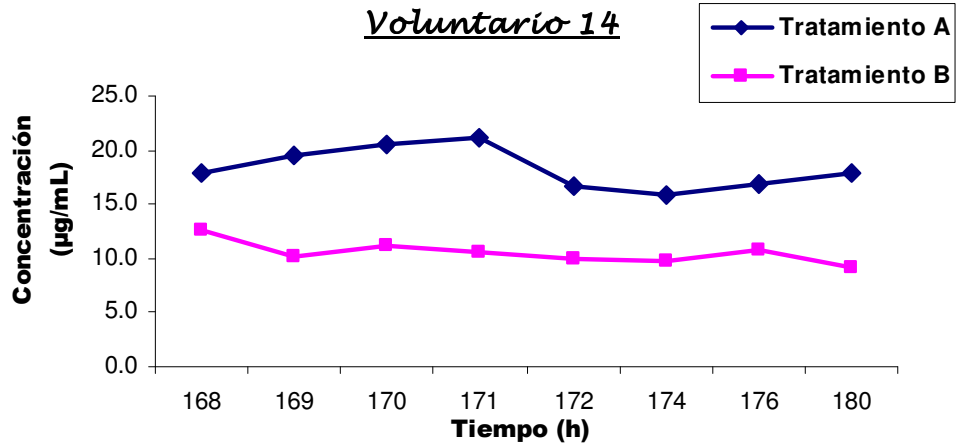
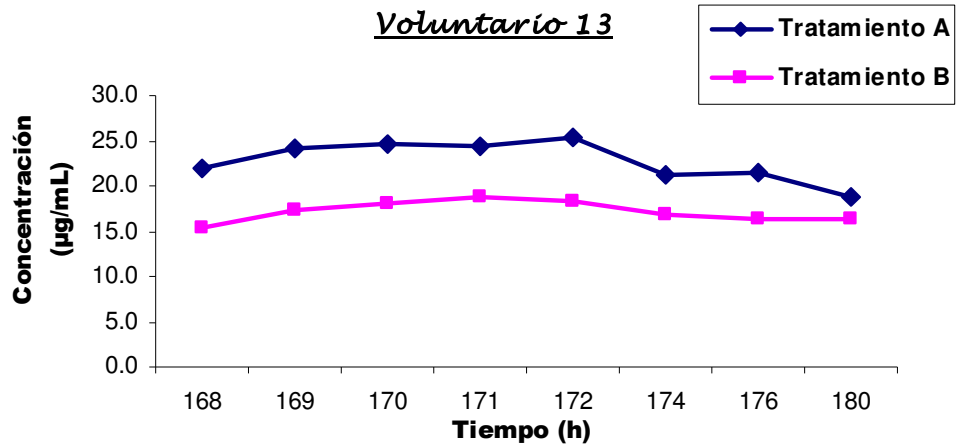
Tratamiento: B  
Muestra: 180 h

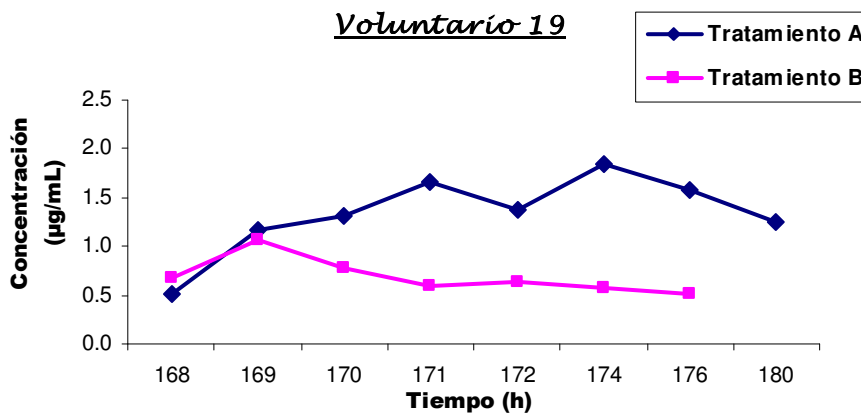
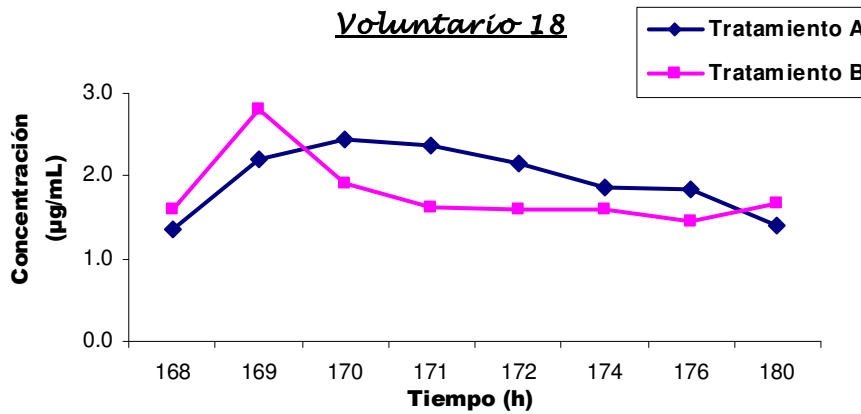
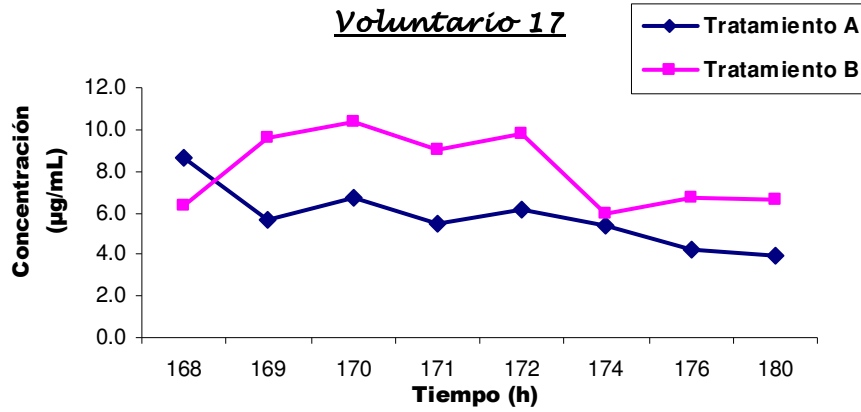
**APÉNDICE H. GRÁFICOS DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LTG vs TIEMPO, EN EL ESTADO ESTACIONARIO.**





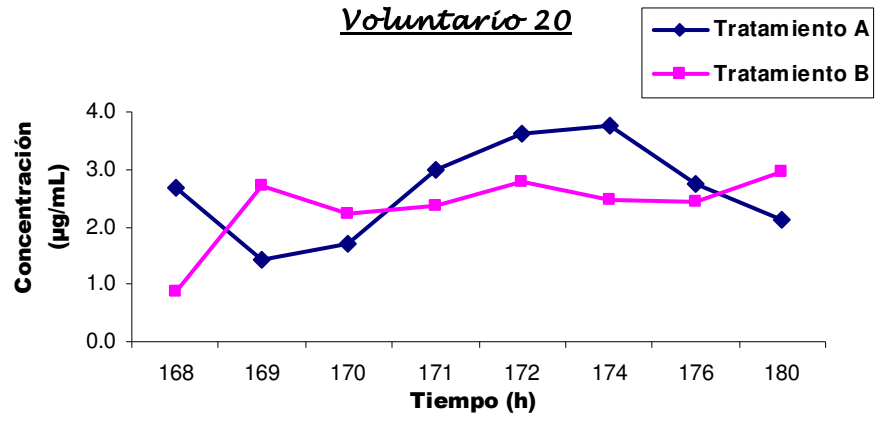








Voluntario 20



## 8. REFERENCIAS.

- 1) Bell, GS. and Sander, JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure* (2001); 10: 306–316.
- 2) Burneo, JG., Tellez-Zenteno, J. and Wiebe, S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research* (2005); 66: 63–74.
- 3) Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/es/>
- 4) Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. pp 491-519.
- 5) Murphy, J. Clinical Pharmacokinetics. American society of Health-System Pharmacist. Segunda edición. pp 61-74.
- 6) Jefferson, JW. Lamotrigine in psychiatry: Pharmacology and therapeutics. *CNS Spectr.* (2005); 10(3): 224-232.
- 7) Rowan, AJ., Ramsay, RE., Collins, JF., Pryor, F., Boardman, KD., Uthman, BM., Spitz, M., Frederick, T., Towne, A., Carter, GS., Marks, W., Felicetta, J., Tomyanovich, ML; VA Cooperative Study 428 Group. New onset geriatric epilepsy: a randomized study of gabapentin, lamotrigine, and carbamazepine. *Neurology* (2005); 64(11):1868-1873.
- 8) Marson, AG., Al-Kharusi, AM., Alwaidh, M., Appleton, R., Baker, GA., Chadwick, DW., Cramp, C., Cockerell, OC., Cooper, PN., Doughty, J., Eaton, B., Gamble, C., Goulding, PJ., Howell, SJ., Hughes, A., Jackson, M., Jacoby, A., Kellett, M., Lawson, GR., Leach, JP., Nicolaidis, P., Roberts, R., Shackley, P., Shen, J., Smith, DF., Smith, PE., Smith, CT., Vanoli, A., Williamson, PR; SANAD Study group. The SANAD study of effectiveness of carbamazepine, gabapentin, lamotrigine, oxcarbamazepine, or topiramate for treatment of partial epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. *Lancet* (2007); 369: 1000-1015.
- 9) French, JA et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: Treatment of refractory epilepsy. *Neurology* (2004); 62: 1237-1261.
- 10) Posner, EB., Mohamed, K. and Marson, AG. A systemic review of treatment of typical absence seizures in children and adolescents with ethosuximide, sodium valproate or lamotrigine. *Seizure* (2005); 14: 117-122.

- 11) International League Against Epilepsy: <http://www.ilae.org>
- 12) Alva, A. Manual de Epilepsia para el peditra y el médico general. Ed. Trillas. México 2006.
- 13) Wallace, SJ. Newer antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *Brain and Development* (2001); 23 (5): 277-283.
- 14) Löscher, W. and Schmidt, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. *Epilepsy Research* (2006); 69: 183-272.
- 15) Kwan, P. and Brodie, MJ. Early Identification of Refractory Epilepsy. *N Engl J Med* (2000); 342 (5): 314-319.
- 16) Food and Drug Administration. The Orange Book: <http://www.fda.gov>
- 17) Guidance for industry. Providing clinical evidence of effectiveness for human drug and biological products. FDA. 1998: <http://www.fda.gov>
- 18) Bialer, M., Johannessen, SI., Kupferberg, HJ., Levy, RH., Perucca, E. and Tomson, T. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Research* (2007); 73 (1): 1-52.
- 19) Salpekar, JA., Conry, JA., Doss, W., Cushner-Weinstein, S., Pearl, PL., Weinstein, SL. and Gaillard, WD. Clinical experience with anticonvulsant medication in pediatric epilepsy and comorbid bipolar spectrum disorder. *Epilepsy & Behavior* (2006); 9 (2): 27-334.
- 20) McAllister-Williams, RH. And Ferrie, N. Pharmacological management of bipolar affective disorder. *Psychiatry* (2006); 5 (6): 195-198.
- 21) Clark. Isolation and identification of drugs. 1986.
- 22) The Merck Index. 13<sup>th</sup> edition. Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, USA. 2001.
- 23) Sigma–Aldrich: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
- 24) Cheng, C.L., Chen-His, C. Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 817 (2005) 199–206.
- 25) Therapeutic System Research Laboratories: [www.tsrlinc.com](http://www.tsrlinc.com)
- 26) Castel-Branco, MM., Almeida, AM., Falcao, AC., Macedo, TA., Carmona, MM., and López, FG. Lamotrigine analysis in blood and brain

- by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* (2001); 755: 119-127.
- 27) Peck A. Clinical pharmacology of lamotrigine. *Epilepsia* 32 (Suppl 2): 59-512, 1991.
- 28) Stefani, A., Spadoni, F., Siniscalchi, A. and Bernardi, G. Lamotrigine inhibits Ca<sup>2+</sup> currents in cortical neurons: functional implications. *Eur J Pharmacol* (1996); 307 (1): 113-116.
- 29) Garnett W. Lamotrigine: Pharmacokinetics. *J Child Neurol* (1997); 12 Health & Medical Complete: S10-S15.
- 30) Morrow, DG. Lamotrigine monograph. Health Sciences Center. University of New Mexico, 2003.
- 31) Sharma, C., Dubey, R., Kumar, H. and Saha, N. Food reduced the bioavailability of lamotrigine. *Indian J Med Res* (2005); 121: 59-664.
- 32) Lardizabal, DV., Morris, HH., Hovinga, CA. and Carreño, MM. Tolerability and pharmacokinetics of oral loading with lamotrigine in epilepsy monitoring units. *Epilepsia* (2003); 44 (4): 536-539.
- 33) Dose, DR., Brodie, MJ., Wilson, EA., Chadwick, D., Oxbury, J., Berry, DJ., Schwabe, S. and Bialer, M. Topiramate and lamotrigine pharmacokinetics during repetitive monotherapy and combination therapy in epilepsy patients. *Epilepsia* (2003); 44 (7): 917-922.
- 34) Prescribing information. Drug safety information. Center for drug evaluation and research. Food and drug administration 2005.
- 35) Gidal, BE. Pharmacokinetics of the new antiepileptic drugs. *Am J Manag Care* (2001); 7 (Suppl 7): S215-220.
- 36) Patsalos, PN. Properties of antiepileptic drugs in the treatment of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* (2005); 46 (Suppl 9): 140-148.
- 37) Morris, RG., Black, AB., Harris, AL., Batty, AB. and Sallustio, BC. Lamotrigine and therapeutic drug monitoring: retrospective survey following the introduction of a routine service. *Br J Clin Pharmacol* (1998); 46: 547-551.
- 38) Theis, JGW., Sidhu, J., Palmer, J., Job, S., Bullman, J. and Ascher, J. Lack of pharmacokinetic interaction between oxcarbamazepine and lamotrigine. *Neuropsychopharmacol* (2005); 30: 2269-2274.

- 39) Patient information sheet. Drug safety information. Center for drug evaluation and research. Food and drug administration 2006.
- 40) Cunnington, M. and Tennis, P. Lamotrigine and the risk of malformations in pregnancy. *Neurology* (2005); 64(6): 955-960.
- 41) Furlan, V., Demirdjian, S., Bourdon, O., Magdalou, J. and Taburet, AM. Glucoronidation of drugs by hepatic microsomes derived from healthy and cirrhotic human livers. *J Pharmacol Exper Therap* (1999); 289(2): 1169-1175.
- 42) Barbosa, N. and Midio, A. Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma. *J Chromatogr B* (2000); 741: 289-293.
- 43) Angelis-Stoforidis, Morgan, D., O'Brian, T. and Vajda, F. Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* (1999); 727: 113-118.
- 44) Londero, D. and Greco, P. New micromethod for determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* (1997); 691: 139-144.
- 45) Franceschi, L. and Furlanut, M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbamazepine, carbamazepina, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacological Research* (2005); 51: 297-302.
- 46) Bugamelli, F., Sabbioni, C., Mandrioli, R., Kenndler, E., Alvani, F. and Raggi, M.A. Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid extraction. *Analytica Chimica Acta* (2002); 472: 1-10.
- 47) Yamashita, S., Furuno, K., Kawasaki, H., Gomita, Y., Yoshinaga, H., Yamatogi, Y. and Ohtahara, S. Simple and rapid analysis of lamotrigine, a novel antiepileptic, in human serum by high-performance liquid chromatography using solid phase extraction technique. *J Chromatogr B* (1995); 670: 354-357.
- 48) Secretaría de Salud. NOM-177-SSA1-1998. Pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

- 49) Guidance for Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration. May 2001.
- 50) Doménech, J., Martínez, J. y Plá, J. Biofarmacia y farmacocinética. Volumen 2: Biofarmacia. Editorial Síntesis, S.A. Madrid 1998.
- 51) The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. [www.mhra.gov.uk](http://www.mhra.gov.uk)
- 52) Miller, JN. y Miller, JC. Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta Ed. Pearson Educación, S.A. Madrid, 2002.
- 53) Ryan, M., Grim, SA., Miles, MV., Tang, PH., Fakhoury, TA., Strawsburg, RH., deGrauw, TJ. and Baumann, RJ. Correlation of lamotrigine concentrations between serum and saliva. *Pharmacother* (2003); 23(12):1550-1557.
- 54) Dasgupta, A. and Hart, AP. Lamotrigine analysis in plasma by gas chromatography – mass spectrometry after conversion to a tert-butyl dimethylsilyl derivative. *J Chromatogr B* (1997); 693: 101-107.
- 55) Saeki, M., Saito, Y., Jinno, H., Sai, K., Hachisuka, A., Kaniwa, N., Ozawa, S., Kawamoto, M., Kamatani, N., Shirao, K., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Komamura, K., Kotake, T., Morishita, H., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H. and Sawada, J. Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* (2005); 20(2): 144-151.
- 56) Ehmer, U., Vogel, A., Schütte, JK., Krone, B., Manns, MP. and Strassburg, CP. Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyl transferase UGT1A4. *Hepatol* (2004); 39(4): 970-977.
- 57) Ehmer, U., Vogel, A., Barut, A., Bleidistel, B., Manns, MP. and Strassburg, CP. High frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPS) at the human UGT1A gene locus: Differential alterations of Glucuronidation of two novel SNPS of the hepatic UGT1A4 gene. *Hepatol* (2003); 38(4) Suppl. 1: 238.
- 58) Zhou, J., Zhang, J. and Xie, W. Xenobiotic nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyl transferases. *Curr Drug Metab* (2005); 6(4): 289-398.

- 59) Court, M. Selective probe substrates for *in vitro* studies of human UDP-glucuronosyl transferasas. *Methods Enzymol* (2005); 400: 104-117.
- 60) Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H. y Gutiérrez, A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clin Latinoam* (2005); 39(1): 27-36.
- 61) Contin, M., Albani, F., Ambrosetto, G., Avoni, P., Bisulli, F., Riva, R., Tinuper, P. and Baruzzi, A. Variation in lamotrigine plasma concentrations with hormonal contraceptive monthly cycles in patients with epilepsy. *Epilepsia* (2006); 47(9): 1573-1575.
- 62) Guidance for Industry. Bioavailability and bioequivalence studies for oral administered drug products. General considerations. US department of health and human services. Center for drug evaluation and research. Food and drug administration. March 2003.
- 63) Urquhart, J., Fara, JW. and Willis, KL. Rate-controlled delivery systems in drug and hormone research. *Ann Rev Pharmacol* (1984); 24: 199-236.