

T  
598

96447



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Investigación Biofarmacéutica

"ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE CUATRO NUEVAS FORMAS FARMACÉUTICAS DE  
DAPSONA: SOLUCIÓN ORAL, SUSPENSIÓN E INYECTABLE PARENTERAL  
(FORMULACIÓN A Y B) EN RATAS WISTAR MACHO ADULTAS"

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

P R E S E N T A

LUIS ANTONIO TRISTÁN LÓPEZ

MATRÍCULA 203180673

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: DR. JAIME KRAVZOV JINICH  
ASESOR: DRA. MARINA ALTAGRACIA MARTÍNEZ  
ASESOR: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

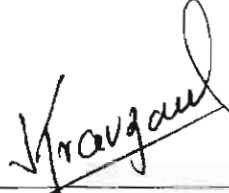
MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2006

**COMITÉ TUTORIAL**

**Vo. Bo.**

**TUTOR**



**Dr. Jaime Kravzov Jinich**

**ASESOR**



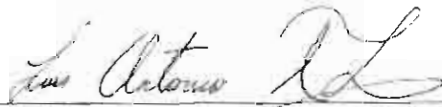
**Dra. Marina Altagracia Martínez**

**ASESOR**



**Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**

**ALUMNO**



**QFB. Luis Antonio Tristán López**  
**Matrícula 203180673**

## JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

**Presidente**

Dr. Sergio Montes López

**Vocal**

Dra. Inés Fuentes Noriega

**Secretario**

Dr. Jaime Kravzov Jinich

*EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LAS INSTALACIONES DEL DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA, "MANUEL VELASCO SUÁREZ".*

*LA GENEROSA DONACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO NECESARIO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE ESTUDIO, FUE HECHA POR EL LABORATORIO FARMACÉUTICO "REPRESENTACIONES MÉX-AMÉRICA S.A. DE C.V.".*

*LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO, FUERON PROPORCIONADAS POR EL LABORATORIO EXPERIMENTAL MULTIDISCIPLINARIO DE FARMACIA, DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLÁN.*

GRACIAS.....

*A mis padres, hermanos y al resto de mi familia. Gracias por todo su cariño, apoyo, fé y paciencia.*

*A mi abue Sixta..... Perdón por no estar a tu lado en los últimos días.*

*A mis tutores: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda, Dra. Marina Altagracia Martínez y Jaime Kravzov Jinich y sinodales: Dra. Inés Fuentes Noriega y Dr. Sergio Montes López, por sus aportaciones a este trabajo.*

*A la radioescucha número 1 de radiopatética (G.S.A.), por todo lo que significas para mí.*

*A la clase 78' (Heidi e Iván), gracias por todo jóvenes, su cariño es invaluable para mí.*

*A todos los que compartieron conmigo este camino, (en clases, en la planta piloto de la UAM-X y en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía). A todos Ustedes mi infinita gratitud y mis disculpas si en algún momento les fallé.*

*A todos los que en mi tierra, me tuvieron en mente y me brindaron palabras de apoyo y cariño a lo largo de todo este tiempo a través de sus correos y llamadas. Mil gracias.....*

# ÍNDICE

I.- Introducción .....	1
II.- Marco teórico.....	3
2.1. Enfermedades cerebrovasculares.....	3
2.1.1. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares.....	4
2.1.1.1. Infarto aterotrombótico.....	4
2.1.1.2. Enfermedad aterotrombótica de la arteria carótida interna y de sus ramas.....	5
2.1.1.3. Enfermedad aterotrombótica del sistema vertebrobasilar-cerebral posterior.....	5
2.1.1.4. Hemorragia intracraneal.....	6
2.1.2. Diagnóstico de las enfermedades cerebrovasculares.....	6
2.1.2.1. Síndrome del accidente cerebrovascular.....	6
2.1.2.2. Imagenología.....	7
2.1.3. Situación global de las enfermedades cerebrovasculares.....	8
2.1.3.1. Costo del infarto cerebral.....	11
2.1.3.2. Tendencia mundial del infarto cerebral.....	11
2.1.3.3. Factores de riesgo.....	12
2.1.4. Situación nacional del infarto cerebral.....	13
2.1.5. Patofisiología del accidente cerebrovascular.....	14
2.1.5.1. Autorregulación.....	15
2.1.5.2. Cambios hemodinámicos durante la isquemia cerebral.....	16
2.1.5.3. Patogénesis del daño celular en el tejido isquémico.....	17
2.1.5.3.1. Excitotoxicidad.....	18
2.1.5.3.2. Óxido nítrico.....	18
2.1.5.3.3. Especies reactivas del oxígeno.....	19
2.1.5.3.4. Inflamación.....	20
2.1.5.3.5. Apoptosis.....	21
2.1.6. Tratamiento de la enfermedad cerebrovascular.....	21
2.1.6.1. Terapia trombolítica.....	21
2.1.6.2. Neuroprotección.....	22
2.1.6.2.1. Mecanismos de acción de los agentes neuroprotectores estudiados.....	23
2.1.6.2.1.1. Intervención contra la despolarización de membranas.....	23
2.1.6.2.1.2. Bloqueadores de los canales voltaje dependientes de sodio.....	24
2.1.6.2.1.3. Bloqueadores de los canales voltaje-dependientes de calcio.....	24
2.1.6.2.1.4. Inhibidores de la vía del óxido nítrico.....	25
2.1.6.2.1.5. Antioxidantes.....	25
2.1.6.2.1.6. Agentes anti-inflamatorios.....	26
2.1.6.2.1.7. Intervención contra la muerte celular programada.....	27
2.2. Dapsona.....	27
2.2.1. Características físico-químicas generales.....	27
2.2.2. Antecedentes históricos.....	28
2.2.3. Propiedades terapéuticas.....	29
2.2.3.1. Uso terapéutico antimicrobiano.....	29
2.2.3.1.1. Mecanismo de acción antimicrobiana.....	29
2.2.3.2. Uso terapéutico en dermatología.....	30
2.2.3.2.1. Mecanismo de acción anti-inflamatoria.....	30
2.2.3.3. Uso en infecciones oportunistas.....	31
2.2.3.4. Indicaciones terapéuticas en neurología.....	31
2.2.4. Farmacocinética de la dapsona.....	32
2.2.4.1. Administración oral.....	32
2.2.4.2. Administración intravenosa.....	32

2.2.5. Metabolismo.....	32
2.2.6. Distribución.....	33
2.2.7. Excreción.....	33
2.2.8. Contraindicaciones.....	34
2.2.8.1. Anemia hemolítica.....	34
2.2.8.2. Metahemoglobinemia.....	36
2.2.9 Efectos adversos idiosincráticos.....	38
2.2.9.1. Agranulocitosis.....	38
2.2.9.2. Neuropatía.....	39
2.2.9.3. Otros efectos neurológicos.....	40
2.2.9.4. Efectos gastrointestinales.....	41
2.2.9.5. Síndrome de hipersensibilidad a la dapsona.....	41
2.2.9.6. Erupciones cutáneas por sensibilidad al fármaco.....	42
2.2.9.7. Carcinogénesis.....	42
2.2.9.8. Embarazo y lactancia.....	42
2.2.10. Interacciones farmacológicas de la dapsona.....	43
2.3. Estudios farmacocinéticos.....	46
2.3.1. Definición de farmacocinética.....	46
2.3.2. Antecedentes históricos.....	47
2.3.3. Farmacocinética no-clínica.....	49
2.3.3.1. Farmacocinética y toxicocinética en animales.....	49
2.3.3.2. Estudios ADME en animales.....	50
2.3.3.3. Escalamiento alométrico.....	51
2.3.3.3.1. Modelos de escalamiento Inter-especie.....	51
2.3.3.4. Número de especies en el escalamiento alométrico.....	52
2.3.3.5. Unión a proteínas.....	53
2.3.4. Estudios farmacocinéticos no clínicos previos de dapsona.....	53
2.3.4.1. Ratón.....	53
2.3.4.2. Perro.....	54
2.3.4.3. Ratas.....	55
2.3.4.5. Otras especies.....	57
2.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	58
2.4.1. Generalidades.....	58
2.4.2. Columnas.....	59
2.4.3. Tipos de relleno.....	59
2.4.4. Elución.....	60
2.4.4.1. Tipos de elución.....	61
2.4.5. Solventes para CLAR.....	62
2.4.6. Inyección.....	62
2.4.6.1. Bombas y válvulas de inyección.....	62
2.4.6.2. Sistemas de inyección.....	63
2.4.6.2.1. Válvulas de inyección.....	63
2.4.6.2.2. Inyectores automáticos.....	64
2.4.7. Detectores.....	64
2.4.7.1. Detector de absorbancia ultravioleta-visible.....	65
2.4.7.2. Detectores de fluorescencia.....	65
2.4.7.3. Detector electroquímico.....	66
2.5. Validación de un método analítico.....	66
2.5.1. Tipos de validación.....	67
2.5.2. Etapas de una validación.....	68
2.5.2.1. Preparación del estándar de referencia.....	68
2.5.2.2. Desarrollo del método analítico.....	69
2.5.2.3. Aplicación del método analítico al análisis rutinario de fármacos.....	72
III.- Planteamiento del problema.....	74



IV.- Hipótesis.....	75
V.- Objetivos.....	75
5.1. Objetivo general.....	75
5.2. Objetivos específicos.....	75
VI.-Métodos.....	76
6.1. Validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	76
6.1.1. Descripción del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	76
6.1.2. Reactivos y equipos.....	77
6.1.3. Pruebas de validación.....	77
6.2. Estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar macho adultas.....	81
6.2.1. Descripción del estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar macho adultas.....	82
VII.- Resultados.....	85
7.1. Validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	85
7.1.1. Linealidad del sistema.....	85
7.1.2. Linealidad del método.....	87
7.1.3. Recuperación absoluta.....	89
7.1.4. Límite de cuantificación.....	90
7.1.5. Precisión del método.....	91
7.1.5.1. Repetibilidad.....	91
7.1.5.2. Reproducibilidad.....	92
7.1.6. Exactitud del método analítico.....	93
7.1.7. Estabilidad del analito.....	94
7.1.7.1. Prueba de estabilidad a temperatura ambiente por 24 horas.....	94
7.1.7.2. Prueba de estabilidad a -70° C por 30 días.....	95
7.1.7.3. Prueba de estabilidad de la muestra 24 horas después de su procesamiento a 8 °C.....	97
7.1.7.4. Prueba de ciclos de congelación-descongelación a -20°C.....	98
7.2. Estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar machos adultas.....	100
7.2.1. Perfil concentración-tiempo de la forma farmacéutica de solución oral.....	100
7.2.2. Perfil concentración-tiempo de la forma farmacéutica de suspensión.....	102
7.2.3. Perfil concentración-tiempo de la forma farmacéutica solución intravenosa.....	104
7.2.3.1. Formulación A.....	104
7.2.3.2. Formulación B.....	106
7.2.4. Obtención de parámetros farmacocinéticos.....	108
VIII.- Discusión de resultados.....	111
8.1. Validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	111
8.2. Estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar machos adultas.....	116
8.2.1. Solución y suspensión orales.....	116
8.2.2. Formulaciones A y B de la solución intravenosa.....	117
8.2.3. Biodisponibilidad de las formulaciones orales.....	118
IX.- Conclusiones.....	120
X.- Bibliografía.....	122

## I.- INTRODUCCIÓN

La dapsona (DDS, 4,4'-diaminodifenilsulfona) ha sido durante las últimas siete décadas uno de los fármacos más importantes para el tratamiento de la lepra y actualmente es uno de los más utilizados contra las infecciones oportunistas en pacientes con VIH/SIDA y para el tratamiento de algunos desórdenes dermatológicos. Para tales indicaciones se emplea el tratamiento por la vía oral mediante una forma farmacéutica sólida<sup>1</sup>.

Sin embargo, en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces que los actualmente existentes para el tratamiento de algunos desórdenes neurológicos, se ha demostrado que la dapsona tiene un efecto anticonvulsivo y neuroprotector, comprobados de manera preclínica en modelos experimentales y en estudios clínicos con pequeños grupos de pacientes en estudios piloto<sup>2-3</sup>. Para estas nuevas aplicaciones, la DDS requiere de una administración rápida a pacientes generalmente inconscientes, lo que obliga al desarrollo de formas farmacéuticas de dapsona acordes a sus nuevas indicaciones terapéuticas, incluyendo una solución oral, una suspensión y una solución para su administración parenteral con el objetivo de lograr una absorción y una distribución más rápida y así aumentar la velocidad de la aparición de su efecto farmacológico, en casos de infarto cerebral o crisis convulsivas refractarias, entre otros.

Si bien hasta el día de hoy las necesidades terapéuticas de los pacientes que requieren el tratamiento con este fármaco han sido cubiertas con la dosificación enteral a través de la administración de comprimidos, la propuesta de una nueva indicación de la dapsona como neuroprotector en casos de infarto cerebral y fármaco anti-epiléptico, demanda formas farmacéuticas de dosificación acordes con la situación clínica que dicha indicación requiere, es por esto que es necesario el desarrollo de las nuevas formas medicamentosas propuestas para una administración más efectiva del fármaco.

En relación con las nuevas indicaciones terapéuticas de la DDS, hay que resaltar que la alta incidencia de los problemas provocados por las enfermedades cerebrovasculares (infarto cerebral aterotrombótico, principalmente) y de la epilepsia refractaria, destacan la

importancia de probar y analizar el perfil farmacocinético de esas formulaciones para la administración del fármaco como solución oral, suspensión o inyectable, ya que permitirían su utilización en situaciones de emergencia clínica en las que las actuales formas de dosificación sólidas resultan inadecuadas.

Como una primera aproximación al problema del desarrollo de formas farmacéuticas nuevas para la DDS, se precisa la realización de estudios preclínicos en animales de laboratorio para dilucidar el comportamiento farmacocinético del fármaco tras la administración oral o intravenosa de las formulaciones en estudio, resultando de especial interés la formulación parenteral. Aunque se han descrito soluciones del fármaco en mezclas de agua con disolventes orgánicos en la literatura mundial, los perfiles concentración-tiempo después de una administración intravenosa en bolo se hallan descritos sólo en un par de estudios realizados en modelos animales, mientras que únicamente se hallan disponibles datos de un estudio farmacocinético en humanos para una administración intravenosa del fármaco mediante una infusión<sup>4</sup>.

Este estudio farmacocinético que se realizó en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología "Manuel Velasco Suárez", llevó a cabo la comparación farmacocinética de las nuevas formas farmacéuticas solubles que han sido desarrolladas para la dapsona: solución oral, suspensión oral y solución inyectable intravenosa (formulaciones A y B) en ratas Wistar macho adultas. El análisis farmacocinético de las formas propuestas de la dapsona ha permitido dilucidar el comportamiento del fármaco administrado en las formulaciones propuestas para efectos de su disposición y eliminación con la finalidad de realizar las primeras pruebas para verificar la seguridad de dichas formulaciones para su administración en voluntarios sanos y posteriormente a pacientes, estableciendo la relación entre los parámetros de exposición a la formulaciones propuestas y su posible toxicidad<sup>5</sup>.

## II.- MARCO TEÓRICO

### 2.1. Enfermedades cerebrovasculares

El término *enfermedades cerebrovasculares* denota cualquier anormalidad del cerebro que es resultado de un proceso patológico de los vasos sanguíneos, sean arterias, arteriolas, capilares, venas o senos venosos. El cambio patológico en dichas estructuras se presenta en forma de la oclusión por trombos o émbolos, o bien de ruptura. Las anormalidades que surgen en el encéfalo son de dos tipos: isquemia, con infarto o sin éste y hemorragia. Otras formas de enfermedades cerebrovasculares son las causadas por trastornos en la permeabilidad de los vasos, hipertensión y mayor viscosidad u otros cambios en las características de la sangre. La alteración de la permeabilidad vascular causa cefalea, edema cerebral y convulsiones de la encefalopatía hipertensiva.

La frecuencia relativa en los Estados Unidos de Norteamérica con que aparecen las variedades principales de enfermedades cerebrovasculares se señalan en la Tabla 1<sup>7</sup>.

Tabla 1. Tipos principales de enfermedades cerebrovasculares y su frecuencia<sup>7</sup>.

	Serie de Harvard de los accidentes cerebrovasculares (756 casos sucesivos) *	Serie de necropsias del Boston City Hospital (179 casos) †
Trombosis aterosclerótica	244 (32 %)	21 (12 %)
Lagunas	129 (18 %)	34 (18.5 %)
Embolia	244 (32 %)	57 (32 %)
Hemorragia hipertensiva	84 (11 %)	28 (15.5 %)
Aneurismas y malformaciones vasculares rotas	55 (7 %)	8 (4.5 %)
Indeterminadas		17 (9.5 %)
Otras ‡		14 (8 %)

### **2.1.1. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares**

La más simple clasificación es aquella que distingue dos grupos principales:

1. Oclusivas o isquémicas (trombóticas o embólicas).
- 2.- Hemorrágicas.

Es necesario tomar en cuenta los eventos isquémicos reversibles, la encefalopatía hipertensiva y la trombosis venosa que no están consideradas en esta clasificación<sup>8</sup>.

#### **2.1.1.1. Infarto aterotrombótico**

La mayor parte de los casos de enfermedad vascular cerebral se pueden atribuir a trastornos tales como aterosclerosis e hipertensión arterial sistémica. Estos dos factores interaccionan en muy diversas maneras. La aterosclerosis, al reducir la elasticidad de las grandes arterias, induce hipertensión; a su vez, la hipertensión sostenida empeora la aterosclerosis provocando la impregnación de las tunicas del vaso sanguíneo con un material lípido hialino, proceso denominado lipohialinosis. El proceso ateromatoso en las arterias del encéfalo es idéntico al que se observa en las arterias coronarias, aorta y otras de gran tamaño.

Existen revisiones que muestran que en 75% de los pacientes, la mayoría de las enfermedades cerebrovasculares van precedidas por cambios menores a uno o más ataques transitorios con disfunción neurológica focal<sup>8</sup>. Los antecedentes de las crisis prodrómicas ayudan a establecer el diagnóstico de trombosis cerebral. En caso de enfermedad de las arterias carótida y cerebral media, los ataques transitorios de advertencia consisten en ceguera monocular, hemiplejía, hemianestesia, trastornos del habla y el lenguaje, confusión, etc. En el sistema vertebro-basilar los pródromos toman más a menudo la forma de crisis de mareos, diplopia, adormecimiento, trastornos de la visión y disartria.

### **2.1.1.2. Enfermedad aterotrombótica de la arteria carótida interna y de sus ramas**

Este tipo de infarto se clasifica por la localización. El origen de la arteria carótida interna es la zona en la que más se producen aterosclerosis y aterotrombosis. Los émbolos que nacen de una lesión aterosclerótica situada en el origen de la arteria carótida interna pueden producir la oclusión de la arteria oftálmica, de la porción proximal de la arteria cerebral media o de alguna de sus ramas, o bien de la arteria cerebral anterior. El sitio en el que con mayor frecuencia ocurren eventos embólicos es en el trayecto de la arteria cerebral media; cuando se ocluye toda esta arteria, el cuadro clínico que se produce es el de una hemiplejía y hémianestesia contralaterales. Si se afecta el hemisferio dominante, también se produce afasia global. En cambio, el infarto del territorio de la arteria cerebral anterior es raro y suele deberse a embolia y no a aterotrombosis. El paciente presenta un cuadro de abulia profunda (retraso en las respuestas verbales y motrices) con signos piramidales bilaterales y paraplejía<sup>8</sup>.

### **2.1.1.3. Enfermedad aterotrombótica del sistema vertebrobasilar-cerebral posterior**

Las dos arterias vertebrales se unen para formar la arteria basilar, a su vez esta arteria se divide en dos arterias cerebrales posteriores que se dividen en ramas que riegan al cerebelo, bulbo, protuberancia, mesencéfalo, subtálamo, tálamo, hipocampo y zonas mediales de los lóbulos temporal y occipital y de ahí se derivan las manifestaciones clínicas. Los pacientes pueden cursar con abulia, somnolencia, coma, signos piramidales bilaterales, o pueden cursar con alteraciones en la percepción del dolor, temperatura, o propiocepción; otro síntoma es la ceguera cortical que sugiere un infarto bilateral en el territorio de la arteria cerebral posterior.

Las arterias cerebelosas como lo son la superior, la posterioinferior y la anterior suelen ser causas relativamente frecuentes de infarto. Los pacientes pueden cursar con ataxia cerebelosa, disartria, pérdida contralateral de la sensibilidad para el dolor y la temperatura, nistagmo y tinnitus<sup>8</sup>.

#### **2.1.1.4. Hemorragia intracraneal**

La hemorragia subaracnoidea es una enfermedad común y en algunos casos devastadora, se ha demostrado que produce un 25% de mortalidad y el pronóstico depende del estado de conciencia en el que se encuentre el paciente al inicio del tratamiento. La rotura de un aneurisma intracraneal es la causa más frecuente de hemorragia subaracnoidea, seguida de las malformaciones arteriovenosas. Los cuadros de cefalea súbita e inexplicada de cualquier localización deben plantear la sospecha de una hemorragia subaracnoidea, que se debe investigar mediante tomografía axial computarizada (TAC) para detectar la presencia de sangre en las cisternas basales; la punción lumbar hemorrágica puede ayudar al diagnóstico.

Otro tipo de hemorragia es la dependiente de la hipertensión arterial, la cual se produce principalmente a nivel del putamen, la cápsula interna, el tálamo, la protuberancia y el cerebelo. Las hemorragias intracraneales hipertensivas son más frecuentes en los pacientes con hipertensión prolongada y mantenida. Las manifestaciones clínicas dependen de la localización del sangrado<sup>8</sup>.

### **2.1.2. Diagnóstico de las enfermedades cerebrovasculares**

#### **2.1.2.1 Síndrome del accidente cerebrovascular**

El cuadro característico con que se manifiesta una enfermedad de vasos cerebrales es el accidente cerebrovascular o apoplejía, definido como cualquier déficit neurológico focal repentino o agudo no convulsivo. En su forma más grave, el individuo queda hemipléjico o cae al piso exánime, situación tan impresionante que ha justificado su nombre: "apoplejía", "accidente cerebrovascular", ataque o, coloquialmente, choque. Si el individuo no muere en el término de horas o días, casi siempre habrá recuperación parcial de la función. Este perfil cronológico de los hechos neurológicos, ocurridos en varios minutos, como en el ataque isquémico transitorio, u horas o días, basta para el diagnóstico. Las variaciones en el perfil reflejan el tipo de lesión vascular. Los accidentes embólicos de manera característica comienzan de modo repentino y absoluto, si bien sus

efectos recurrentes rápidamente o persisten. Los accidentes trombóticos tienen un comienzo súbito, pero a menudo evolucionan con un poco de más lentitud en lapso de minutos u horas, o incluso días. La hemorragia cerebral desde su comienzo por lo común ocasiona déficit notable, pero en ocasiones progresivo durante horas o días<sup>9</sup>.

### **2.1.2.2 Imagenología**

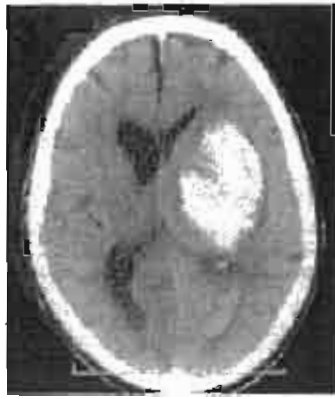
La evaluación clínica en los pacientes con un evento cerebrovascular es la clave para el diagnóstico y el tratamiento temprano.

La angiografía cerebral sigue siendo el método más confiable para valorar el sistema cerebrovascular. Este estudio permite observar lesiones ulcerosas, estenosis intensas, la presencia de trombos murales, procesos aterotrombóticos o disección de algún vaso.

Las técnicas de imagen cerebral constituyen la prueba más importante de la fase aguda de un accidente cerebrovascular. La tomografía axial computarizada (TAC) permite descartar hemorragia como causa del evento cerebrovascular, pero tal vez no demuestre los pequeños infartos isquémicos y no permite detectar con fiabilidad el infarto cerebral durante las primeras 24 a 28 horas.

La resonancia magnética es de gran utilidad para documentar la magnitud y localización de los infartos, no sólo de los situados en la corteza, sino también de los de la sustancia blanca durante la primera hora siguiente a su aparición. En la actualidad se está utilizando con mayor frecuencia la angiorresonancia de cráneo la cual ha mostrado beneficios. Otros estudios necesarios en el abordaje inicial de estos pacientes son el electrocardiograma, placa de tórax, doppler carotídeo (en situaciones específicas), biometría hemática, plaquetas, tiempo de tromboplastina, tiempo de protrombina, química sanguínea, electrolitos séricos y pruebas de funcionamiento hepático. Una imagen obtenida mediante la técnica de resonancia magnética, tras un infarto severo en el hemisferio derecho se muestra en la figura 1, donde se puede observar de manera clara la extensa hemorragia intracerebral<sup>10-11</sup>.





**Figura 1.** Imagen de resonancia magnética de una hemorragia cerebral post-infarto en hemisferio derecho.

### **2.1.3. Situación global de las enfermedades cerebrovasculares**

En orden de frecuencia, las enfermedades cerebrovasculares ocupan el tercer lugar como causa de muerte en el mundo occidental, después de las cardiopatías y el cáncer; en términos generales, cuando menos la mitad de todos los pacientes neurológicos tienen algún tipo de enfermedad de esta índole<sup>12</sup>.

Las enfermedades cerebrovasculares constituyen un problema de importancia en salud pública, no solamente por la mortalidad, sino también por la morbilidad; así por ejemplo se observa que en los Estados Unidos de Norteamérica y en los países desarrollados las enfermedades cerebrovasculares ocupan el tercer lugar entre las causas de mortalidad, después de las cardiopatías y el cáncer; aunque en los últimos años, gracias a las campañas preventivas de la hipertensión arterial y la arteriosclerosis, los índices promedio de muerte están declinando. Sin embargo, diversos estudios de mortalidad y morbilidad muestran altas incidencias de muerte por enfermedades cerebrovasculares en Japón, China, Suecia, Inglaterra, Finlandia, Dinamarca y Australia. Se ha estimado que en los Estados Unidos de Norteamérica, la mortalidad es de 50-100 por 100,000 habitantes, la incidencia de 100 a 200 por 100,000 y la prevalencia de 500 a 600 por 100,000 habitantes<sup>8</sup>.

Los datos epidemiológicos se obtienen a partir de diferentes fuentes que presentan de forma inherente algunos problemas metodológicos en su captura:

#### **A) Certificados de defunción**

Los datos provistos de los certificados de defunción se hallan fácilmente disponibles, sin embargo no son de naturaleza precisa en cuanto a la información acerca de la mortalidad por infarto cerebral, ya que obviamente omiten las formas moderadas que raramente son de naturaleza fatal y no pueden distinguir de manera confiable los tipos patológicos más básicos ésta enfermedad (ej. infarto isquémico vs hemorragia intracerebral primaria). La precisión también puede verse comprometida por la manera en que el infarto se ha registrado y codificado en el certificado de defunción<sup>11,13</sup>.

#### **B) Incidencia del infarto cerebral**

La incidencia basada en muestras representativas de la comunidad, provee de una epidemiología más detallada en la población de lo que la mortalidad lo hace. Sin embargo los estudios basados en la comunidad requieren de considerables recursos y rigurosos métodos, siendo aún así difícil asegurar que la totalidad de los casos han sido hallados y correctamente diagnosticados. Es también necesario recalcar que el tamaño de muestra en estos estudios resulta inferior para la realización de comparaciones precisas de la incidencia por tiempo y lugar.

La incidencia ha sido estudiada de forma confiable solamente en varias poblaciones blancas, entre las cuales el dato resulta más o menos similar (cerca de dos infartos nuevos por 1000 por año en la población total, cerca de cuatro en la población entre 45 y 84 años), excepto en Rusia, donde la incidencia parece ser mayor y en Francia donde es menor<sup>13</sup>.

### **C) Prevalencia del infarto cerebral**

La prevalencia de los sobrevivientes a un infarto depende tanto de la incidencia como de la fatalidad de los casos, factores que no se hallan influenciados por los mismos factores. Por lo que para la utilización de cualquier variación de interés con respecto al tiempo o al lugar para la obtención de una explicación probable, resulta todavía necesaria la información de la incidencia. Además, los casos de prevalencia presentan más sesgos por la sub-representación de casos fatales que se hallan dentro de los datos de incidencia, como por ejemplo en los estudios caso-control.

La medición de la prevalencia es un trabajo difícil y pesado debido a la necesaria recopilación de datos de la gran población sobreviviente a todo tipo de infarto cerebral en el pasado, con una inevitable dificultad para conocer si realmente ha ocurrido un infarto y a cual tipo específico pertenece.

La prevalencia puede ser estimada a partir de la incidencia y la fatalidad de los casos, siendo necesario en este caso hacer primero la medición de la incidencia<sup>11,13</sup>.

### **D) Resultados esperados a largo plazo.**

Los resultados a largo plazo después de un infarto cerebral pueden ser medidos de diferentes medidas con distintos grados de exactitud. En total, cerca del 20 % de los pacientes que presentan su primer infarto, mueren a un mes de presentarlo (casos de fatalidad temprana). De los sobrevivientes a los seis meses, cerca de un tercio de ellos dependen de otras personas para la realización de sus actividades cotidianas. Sin embargo, estas estimaciones ocultan una enorme cantidad de variaciones individuales, las cuales no sólo dependen del tipo y subtipo de infarto sino de muchas otras características, incluyendo la severidad del primer infarto y de discapacidades pre-infarto.

La tasa de recurrencia de infarto es de 5 % por año, pero tiende a aumentar en las primeras semanas y meses, especialmente si el infarto es debido a una estenosis severa en

la carótida. Debido a que los sobrevivientes a un accidente vascular cerebral usualmente tienen una enfermedad vascular que afecta todo su sistema circulatorio y no solo la circulación cerebral, tales pacientes tienen un alto riesgo de de serios eventos circulatorios (cerca de un 3 % por año)<sup>13</sup>.

#### **2.1.3.1. Costo del infarto cerebral**

Aunque el costo del infarto cerebral resulta ser claramente un importante tema de salud pública así como de relevancia en las políticas de salud colectiva, resulta muy complicado de evaluarse debido a que depende en gran medida de aquello que se incluya en el balance económico final.

Se estima que en los Estados Unidos de Norteamérica se generan anualmente 4.4 millones de sobrevivientes de infarto que padecen algún grado de invalidez posterior al accidente cerebrovascular, de los cuales el 70% nunca vuelve a generar ganancias económicas incluso después de siete años del infarto. Tal situación genera costos directos e indirectos para el cuidado de dichos sobrevivientes de hasta 51 billones de dólares por año<sup>14</sup>.

Existen aún más complicaciones cuando los costos post-infarto de un paciente no se deben enteramente al infarto por si mismo; pueden existir confusiones con demencia y problemas de movilidad que no son provocados por el infarto, tales como la artritis y otras causas de discapacidad y dependencia ajenas al accidente cerebrovascular.

#### **2.1.3.2. Tendencia mundial del infarto cerebral**

Aunque la mortalidad por accidente cerebrovascular ha disminuido en muchos países en los últimos 50 años, particularmente en el occidente y Japón, en muchos otros se ha incrementado, especialmente en el oriente de Europa. Sin embargo, el hecho de que esta variación refleje solamente un cambio en los hábitos de la captura de los certificados de

defunción y no un cambio real en la incidencia o la fatalidad de los casos, no se ha dilucidado aún.

El monitoreo preciso de la incidencia del infarto cerebral a través del tiempo es una muy complicada tarea y se ha logrado difícilmente, aunque resultaría de gran importancia la evaluación de los efectos de programas de prevención masivos y dirigidos.

Existen datos que indican que en Rochester, Minnesota, la incidencia se halla nuevamente en ascenso, también se halla registrado un aumento en Siberia y Suecia, mientras que en Nueva Zelanda la tasa permanece sin cambio. En los lugares donde la incidencia del infarto cerebral ha cambiado, las razones pueden ser casi con certeza atribuidas a factores ambientales en vez de factores genéticos<sup>13</sup>.

### **2.1.3.3. Factores de riesgo**

Los primeros factores de riesgo a considerar son la edad, género, raza e historia familiar de enfermedad cerebrovascular. Aunque estos factores de riesgo no son modificables, identifican a los individuos con mayor riesgo de presentarla y, por lo tanto, en los que se deben implantar medidas de prevención más rigurosas con el tratamiento de los factores de riesgo modificables<sup>15</sup>.

Un factor determinante para desarrollar enfermedad cerebrovascular es la edad, resulta conocido el efecto acumulativo de los años en relación con el envejecimiento en el sistema cardiovascular. En relación con el género, se considera que la incidencia es 1.25 veces mayor en hombres que en mujeres. La raza negra y la hispanoamericana tienen elevada incidencia y mayor mortalidad, en comparación con la raza blanca. La historia familiar de eventos vasculares es un marcador de la presencia de otros factores de riesgo establecidos, que son susceptibles de tratamiento<sup>8</sup>.

La hipertensión arterial es otro de los factores de riesgo para desarrollar enfermedad cerebrovascular. Diferentes estudios han demostrado que la incidencia de esta enfermedad aumenta de dos a cuatro veces en pacientes con Diabetes mellitus, además, la

gravedad y la mortalidad de infarto cerebral son mayores en pacientes diabéticos. El tabaquismo y el alcoholismo, así como el sedentarismo y la obesidad son factores que influyen en la aparición de enfermedad cerebrovascular. Muchos padecimientos cardíacos se han relacionado con mayor riesgo de enfermedad cerebrovascular, a través del mecanismo cardioembólico como: las valvulopatías, infarto agudo al miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva y fibrilación auricular. Está bien establecida la relación entre los niveles elevados de colesterol como factor de riesgo para aterosclerosis y a su vez para enfermedades cerebrovasculares. Se ha demostrado que el uso de anticonceptivos orales multiplica los efectos de la edad y de otros factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cerebrovascular, y por sí solos son un factor de riesgo<sup>8,11</sup>.

#### **2.1.4. Situación nacional del infarto cerebral.**

En nuestro país, las enfermedades cerebrovasculares también conocidas como infarto cerebral, accidente cerebrovascular, ictus o apoplejía, ocupan un lugar significativo debido a que son la causa de incapacidad más frecuente en la población adulta mayor de 64 años, y se consideran un problema de salud pública nacional.

La mediana de 1995-1999 muestra que en México ocurrían 34,410 anuales casos de enfermedad cerebrovascular, con una tasa de 36.32 casos por 100,000 habitantes, y una incidencia importante en el grupo de 45 a 64 años, sobresaliendo en el grupo de los 65 años y más, observándose una tasa anual desde 54.47 en 1995, hasta 31.1 en 1999 con 30,517 casos. Los registros por entidad federativa mostraron que, no obstante que las tasas habían descendido. Aguascalientes, Chihuahua, Nuevo León y Tamaulipas notificaron las cifras más altas en el territorio nacional, incluyendo al Distrito Federal y Yucatán en los últimos dos años del periodo mencionado. En México, en la década de los 90, las afecciones crónico degenerativas que se presentaron con mayor frecuencia fueron las enfermedades del corazón, tumores malignos, diabetes mellitus y enfermedades cerebrovasculares, representando 39% del total de los fallecimientos registrados en el país. En 1995 se registraron 23,400 defunciones por accidentes cerebrovasculares representando 5.4% del total de las

defunciones, para 1999 aumentó a 25,836 defunciones con un porcentaje de 5.8% y una tasa de 26.3 casos por 100,000 habitantes. En el grupo de edad productiva ( de 14 a 64 años de edad ), para 1999 se registraron 6,352 defunciones, representando 44.1 % de las defunciones por esta causa.

Por entidad federativa se observó que Colima, Distrito Federal, Veracruz, Yucatán y Zacatecas se mantienen constantes entre los primeros lugares de mortalidad por accidente cerebrovascular en el periodo 1995-1999. La tendencia en la mortalidad fué de incremento lento, pero ya notable de un año a otro.

Para el año 2002, las enfermedades cerebrovasculares registraron en el país una tasa de incidencia de 36.3 casos por 100,000 habitantes, siendo el grupo poblacional femenino de 65 años o más el más afectado con una tasa de 58.60 por 100,000. En cuanto a la incidencia por entidad federativa, de acuerdo al Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, de la Dirección General de epidemiología de la Secretaría de Salud, los estados más afectados fueron ese año: Sonora, Tamaulipas y Chihuahua, mientras los que registraron la incidencia más baja son: Colima, Michoacán, Oaxaca y Chiapas<sup>16</sup>.

En el año 2003 el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), registró 472,140 defunciones en el país, reportando un aumento de 3 % con respecto a las defunciones por accidente cerebrovascular documentadas en 2002. El grupo más afectado fue la población femenina de más de 65 años nuevamente<sup>17</sup>.

### **2.1.5. Patofisiología del accidente cerebrovascular**

El cerebro humano constituye el 2 % de la masa corporal, recibe el 15 % del bombeo cardíaco y requiere del 20 % del oxígeno y del 25 % de la glucosa del consumo corporal total.

La demanda energética del cerebro es satisfecha prácticamente de forma exclusiva por la oxidación metabólica de la glucosa. En condiciones normales, el consumo de oxígeno de un cerebro adulto humano es de cerca de 170 mmol/g\*min. Cuando el flujo sanguíneo cerebral es normal (55 ml/100 mg\*min), el cerebro extrae cerca del 50 % del oxígeno y 10 % del suministro de glucosa. El oxígeno es liberado pasivamente al tejido desde la sangre (difusión), mientras que la glucosa cruza la barrera hematoencefálica por medio de una proteína de alta afinidad acarreadora. La glucosa es metabolizada por la vía de la glucólisis aerobia produciendo 33 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) por molécula de glucosa. Cerca del 60-70 % de la energía producida es para mantener gradientes iónicos, el resto es utilizado para síntesis, liberación y recaptura de neurotransmisores así como para el recambio de estructuras celulares<sup>18</sup>.

La materia gris del cerebro requiere un mayor suministro energético que la materia blanca debido a la presencia de cuerpos celulares y a la muy alta densidad sináptica. Por lo tanto, el funcionamiento del cerebro depende de la presencia de un regular intercambio tanto de oxígeno como de glucosa con el compartimiento sanguíneo<sup>18</sup>.

#### **2.1.5.1. Autorregulación**

El mantenimiento de un flujo sanguíneo cerebral constante representa una prioridad absoluta en el organismo. Este es en parte alcanzado a través de una estructura particular de la base vascular cerebral la cual es capaz de modular su resistencia cuando ocurren cambios en la presión de la perfusión cerebral. Dicho fenómeno, conocido como “autorregulación cerebral”, es debido a la interacción de factores locales metabólicos con el tono mio-vascular.

El cambio local de la resistencia vascular cerebral es el principal mecanismo para mantener el flujo sanguíneo cerebral constante cuando ocurren cambios en la presión de la perfusión cerebral, lo cual es llevado a cabo mediante la modulación del tono de arteriolas precapilares. En condiciones fisiológicas, la autorregulación produce una reducción (vasodilatación) o un incremento (vasoconstricción) de la resistencia arterial



cuando la presión de la perfusión cerebral respectivamente disminuye o se incrementa. La autorregulación del tejido cerebral, como la mayoría de los mecanismos biológicos, tiene un limitado rango de acción. El detrimento de la presión de la perfusión cerebral a aproximadamente 50-60 mm Hg determina una respuesta vasodilatadora máxima, cuyo valor representa por lo tanto el límite más bajo de autorregulación. Por debajo de esos valores, el flujo sanguíneo cerebral depende pasivamente en la presión de la perfusión cerebral<sup>19</sup>.

#### **2.1.5.2. Cambios hemodinámicos durante la isquemia cerebral**

Cuando la reducción de la presión de la perfusión cerebral sobrepasa el límite del umbral de autorregulación y por lo tanto existe una disminución del flujo sanguíneo cerebral, el tejido cerebral extrae más oxígeno desde el compartimiento vascular con el fin de mantener su propio metabolismo oxidativo. Tal condición crítica se conoce como "perfusión pobre" y es caracterizada por: extrema vasodilatación con incremento del volumen sanguíneo cerebral, moderada reducción del flujo cerebral sanguíneo, incremento en la fracción de extracción de oxígeno y niveles normales de la proporción metabólica del oxígeno cerebral (oligaemia). Una reducción mayor de la presión de la perfusión cerebral induce una severa disminución del flujo cerebral sanguíneo y los cambios de la fracción de extracción de oxígeno y el volumen sanguíneo cerebral resultan insuficientes para asegurar la oxidación metabólica normal desencadenando la cascada isquémica de eventos que conducen a la muerte neuronal.

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que existen dos umbrales críticos de flujo sanguíneo cerebral durante una isquemia cerebral focal. Cuando el flujo sanguíneo cerebral es menor que 18-20 ml/100 mg\*min, las neuronas pierden su capacidad de conducción eléctrica tanto espontánea como provocada. Cuando el flujo sanguíneo cerebral alcanza el umbral de 10-12 ml/100mg\*min la homeostasis iónica se pierde rápidamente y el colapso general en la función de las membranas comienza a manifestarse<sup>19</sup>.

La existencia de dos distintos umbrales de flujo sanguíneo cerebral para el cese de la transmisión de las señales y la pérdida de la homeostasis membranal, permite la introducción del concepto “penumbra isquémica” que define la condición en la cual una región de tejido cerebral pierde excitabilidad, pero mantiene la viabilidad neuronal.

El área de tejido celular que se halla en el centro de una lesión isquémica se denomina “núcleo”, en ésta región, el flujo sanguíneo cerebral está ausente o fuertemente reducido (por debajo de 10-12 ml/ 100 mg\*min) y sus capacidades se hallan irreversiblemente perdidas.

El grosor de la penumbra isquémica y el tiempo de su supervivencia dependen de varios factores: el flujo sanguíneo cerebral residual, la densidad neuronal, las condiciones metabólicas pre-isquémicas y la apertura de las venas cerebrales. Tales consideraciones introducen el concepto de “ventana terapéutica”, definida como el tiempo en el cual el flujo sanguíneo cerebral normal es reestablecido y/o un agente neuroprotector bloquea o reduce la progresión de la penumbra isquémica hacia la muerte neuronal<sup>20</sup>.

### **2.1.5.3. Patogénesis del daño celular en el tejido isquémico**

Por debajo de un flujo sanguíneo cerebral de 10 ml/100 mg min, las bombas iónicas usualmente fallan en el mantenimiento de una distribución normal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  entre los compartimientos intracelular y extracelular, resultando en una liberación masiva de  $\text{K}^+$  hacia el fluido extracelular y una movilización al interior de calcio. El exceso de calcio en el fluido intracelular es un actor esencial para eventos patofisiológicos irreversibles los cuales conducen tanto a las células de la penumbra isquémica como a las adyacentes al núcleo de la lesión tanto a su propia muerte como a la de las células vecinas.<sup>21</sup> Los principales mecanismos promotores de la muerte celular incluyen la excitotoxicidad, el daño por óxido nítrico, especies reactivas del oxígeno, inflamación y apoptosis<sup>22</sup>.

### 2.1.5.3.1 Excitotoxicidad

La intensa despolarización de la membrana neuronal condiciona el aumento de la liberación de cantidades excesivas de glutamato y de otros aminoácidos excitadores. El glutamato estimula receptores ionotrópicos de membrana, fundamentalmente el del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolil propiónico) AMPA , el del N-metil-D-aspartato (NMDA). La estimulación del receptor AMPA provoca una despolarización de la membrana celular al aumentar la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular que conduce a una liberación mayor de glutamato, ocasionando edema celular y abriendo nuevos canales no específicos voltaje-dependientes permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la activación del receptor AMPA contribuye a la sensibilización de más receptores NMDA, ya que facilita la extrusión de un número mayor de moléculas de  $\text{Mg}^{2+}$ .

La estimulación de los receptores NMDA es responsable del notable aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y de la puesta en marcha de la cascada isquémica dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  que conduce a la muerte celular.

La elevación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , activa una serie de enzimas (proteincinasas, proteasas, endonucleasas, proteinfosfatasa y sintasa del óxido nítrico) y condiciona la expresión de varios genes de respuesta inmediata<sup>22-23</sup>.

### 2.1.5.3.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un neurotransmisor gaseoso y ubicuo con múltiples funciones en el sistema nervioso central (SNC). Es producido a partir de arginina por tres formas distintas de sintasa del óxido nítrico (NOS). La sintasa del óxido nítrico neuronal, es una enzima neuronal constitutiva calcio-dependiente. Esta especie es prevalente en áreas cerebrales irrigadas por la arteria cerebral media que son susceptibles a convertirse en el núcleo isquémico durante el accidente cerebrovascular. Durante la isquemia, la actividad de la sintasa del óxido nítrico neuronal se encuentra aumentada y el NO producido

reacciona con especies reactivas del oxígeno (ERO<sup>s</sup>), produciendo radicales altamente reactivos que tienen efectos negativos sobre la supervivencia neuronal.

La sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) es una isoforma de la enzima cuya actividad es independiente de calcio y el óxido nítrico producido por esta, tiene también efectos dañinos que, se ha demostrado se presentan en la fase tardía del infarto.

Finalmente se encuentra la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS), la cual también es calcio-dependiente, pero a diferencia de las otras especies, ésta tiene una función que puede ser neuroprotectora debido al efecto vasodilatador que mejora la perfusión cerebral<sup>22</sup>.

La toxicidad NMDA depende en gran parte de la subsecuente formación de óxido nítrico. La activación de los receptores NMDA y la subsecuente entrada de Ca<sup>2+</sup> estimula la sintasa del óxido nítrico neural (nNOS) a través el del Ca<sup>2+</sup> unido a la calmodulina; además la calcineurina desfosforila la nNOS y la activa para producir mayores cantidades de óxido nítrico.

La formación de óxido nítrico en presencia de un exceso del radical superóxido, origina la producción de peroxinitrito, que es responsable de la muerte neuronal al reaccionar con radicales sulfhidrilo, proteínas, lípidos y con los ácidos nucleicos<sup>23</sup>.

#### **2.1.5.3.3. Especies reactivas del oxígeno**

En la isquemia cerebral, la formación de radicales libres de oxígeno (ROS), puede exceder la capacidad antioxidante de las neuronas, ocasionando alteraciones de algunos constituyentes celulares, como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las especies reactivas de oxígeno responsables del estrés oxidativo en las neuronas son el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-1</sup>), el radical hidroxilo (OH<sup>-1</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito (ONOO<sup>\*</sup>).

El anión superóxido se genera a través de múltiples vías metabólicas y es el radical libre de oxígeno que inicia la cascada del estrés oxidativo en la isquemia cerebral. La activación del receptor NMDA estimula la fosfolipasa A<sub>2</sub>, con la consiguiente liberación de ácido araquidónico, prostaglandina, leucotrienos y tromboxano. El superóxido es formado durante el metabolismo del ácido araquidónico y estimula nuevamente la fosfolipasa A<sub>2</sub>, constituyendo una retroalimentación positiva. El radical superóxido también se produce por la conversión de la xantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa, reacción igualmente estimulada por el incremento de la concentración intracelular de calcio<sup>22</sup>.

El radical superóxido actúa en el interior de la neurona donde se produce, ya que es incapaz de atravesar la membrana neuronal. Sin embargo, mediante la acción de la superóxido dismutasa, el superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno, el cual es fácilmente difusible en la célula donde se origina y en las neuronas situadas en la proximidad<sup>22-24</sup>.

#### **2.1.5.3.4. Inflamación**

La presencia de células inflamatorias en la región isquémica, pueden incrementar el daño celular. Las células polimorfonucleares pueden ocasionar daño debido a los efectos de sus enzimas tóxicas tales como la mieloperoxidasa, la cual puede ocasionar daño a la membrana celular. Las citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa, y las interleucinas 1 y 6 parecen ser activadas y secretadas una hora después de la lesión isquémica. Estas citocinas pueden inducir una reacción inflamatoria y también actuar como una sustancia quimiotáctica para los leucocitos. Las moléculas de adhesión como ICAM y ELAM y las metaloproteinasas tisulares son también expresadas de manera temprana después de la lesión, facilitando la penetración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica<sup>22-23</sup>.

### **2.1.5.3.5 Apoptosis**

La muerte neuronal en la zona de penumbra isquémica también es, en parte, el resultado de un proceso apoptótico. La lesión del DNA a través de las endonucleasas o de las especies reactivas del oxígeno, inicia un complejo mecanismo autodestructivo que implica una alteración de la expresión génica. Cada vez existen más evidencias que demuestran el papel de las mitocondrias en la inducción de esta muerte celular programada. Reducciones moderadas del ATP mitocondrial originan la liberación de caspasas, citocromo-c y de un factor de inducción de la apoptosis, que actúan como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica. La apoptosis neuronal no mediada por caspasas también puede ocurrir, pero existe poca evidencia de que contribuya de manera significativa al daño cerebral después de la isquemia. Los procesos intracelulares que contribuyen a la muerte neuronal mediada por caspasas son blancos potenciales para la terapia neuroprotectora.

La apoptosis es un fenómeno relacionado con el de la tolerancia isquémica. Las neuronas no son uniformemente vulnerables a la isquemia. En aquellas neuronas que sobreviven al daño isquémico inicial, es decir, en las neuronas situadas en la zona de penumbra isquémica, la estimulación del receptor NMDA y el aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  inducen a una familia de genes de respuesta inmediata capaces de sintetizar nuevos mRNA (c-fos, c-jun), que a su vez, pueden regular la síntesis proteica (proteínas de estrés, factores de crecimiento tumoral, etc) puede ejercer un papel promotor de la supervivencia y recuperación neuronal, o bien, activar la muerte programada o apoptosis<sup>25-26</sup>.

## **2.1.6. Tratamiento de la enfermedad cerebrovascular**

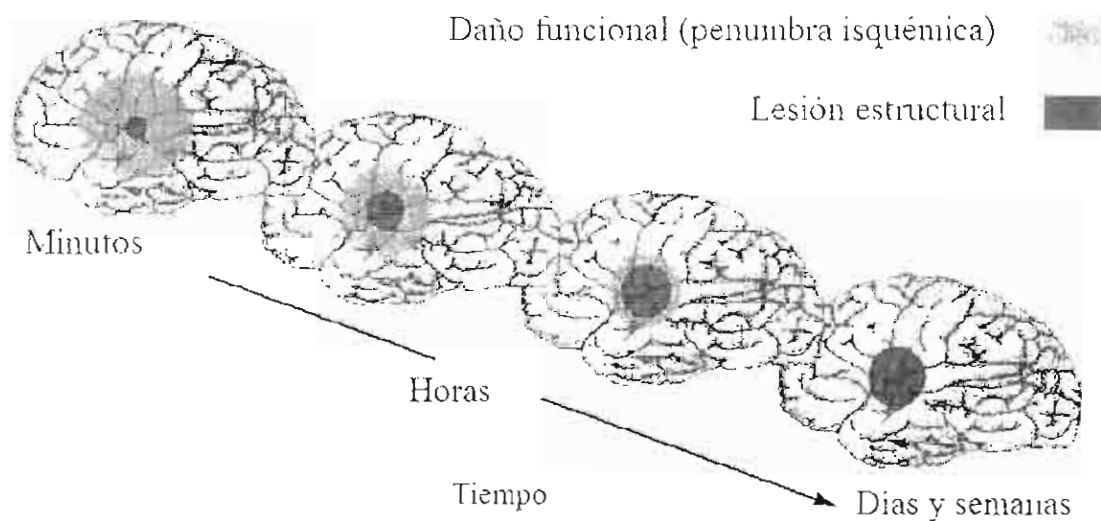
### **2.1.6.1. Terapia trombolítica**

Con base en el ensayo clínico controlado, multicéntrico y aleatorizado, llevado a cabo por el Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos e Infartos (NINDS) fue aprobada en Estados Unidos en el año de 1995, la terapia con plasminógeno activo tisular

recombinante (rtPA), para su uso dentro de las tres primeras horas desde el establecimiento de la lesión a pacientes sin problemas de hipertensión, ya que podría provocarse una hemorragia intracerebral, al demostrar un 11 a 13 % de incremento en las posibilidades de presentar un daño mínimo o inexistente a 3 meses<sup>27-28</sup>.

### 2.1.6.2. Neuroprotección

El blanco para la intervención farmacoterapéutica en un infarto cerebral, es la zona de penumbra isquémica, zona de incompleta isquemia cerebral, donde las neuronas se hallan funcionalmente inactivas pero siguen siendo viables. La evolución de la penumbra isquémica se halla en función del tiempo (figura 2.), ya que la muerte celular ocurre en horas o días debido a una serie de eventos bioquímicos denominados “cascada isquémica”, en la que se desencadenan los mecanismos de daño celular previamente explicados (2.1.5.3.1. a 2.1.5.3.5.)<sup>29</sup>.



**Figura 2.** Representación del daño estructural producido por un infarto cerebral, la zona de penumbra isquémica, donde existen todavía células funcionales, se convierte en zona de daño estructural en función del tiempo.

Los compuestos que interfieren con estos eventos bioquímicos han demostrado actividad neuroprotectora en modelos preclínicos de infarto. Una fracción de estos han entrado en desarrollo clínico y algunos de estos que han sobrevivido a las etapas tempranas en

ensayos sobre su seguridad, han sido estudiados en ensayos de eficacia controlados, aleatorizados, doble ciego con placebo (ensayos clínicos fase III). Dichos ensayos requieren de la participación de muchos pacientes con infarto cerebral, un comité médico de diferentes centros con una disponibilidad de 24 horas y una inversión económica de una compañía farmacéutica que se estima de entre 30 y 40 millones de dólares. A pesar de todos esos esfuerzos, todos los ensayos fase III realizados hasta el momento han fracasado en demostrar la eficacia de los agentes neuroprotectores en estudio<sup>21</sup>.

#### **2.1.6.2.1. Mecanismos de acción de los agentes neuroprotectores estudiados**

##### **2.1.6.2.1.1. Intervención contra la despolarización de las membranas celulares**

El ácido gama-aminobutírico es (GABA) es el mayor neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, el cual balancea al mayor neurotransmisor excitatorio, glutamato. La estimulación del receptor GABA resulta en la entrada del ión cloruro a la célula y por lo tanto provoca la hiperpolarización de la membrana celular. Los inhibidores de los receptores de glutamato, particularmente aquellos que bloquean los receptores NMDA, pueden reducir el volumen de infarto y los déficits neurológicos en modelos permanentes y reperfusivos de isquemia cerebral focal<sup>30</sup>. El uso de antagonistas NMDA de glutamato fue discontinuado prematuramente en los estudios Fase I y Fase II debido a efectos adversos inaceptables, en su mayoría efectos psicomiméticos (agitación, alucinación, paranoia y delirio), además de sedación catatonía y severa neurotoxicidad. Solo el selfotel y aptiganel, fueron llevados a ensayos de fase III, sin embargo debido a la desfavorable balance riesgo-beneficio, ambos ensayos fueron terminados.

#### **Clometiazol**

El clometiazol es un fármaco antiepiléptico que provoca la hiperpolarización neuronal por un aumento de la actividad del GABA en los receptores GABA<sub>A</sub>, inhibiendo la acción del glutamato y por lo tanto protegiendo a la célula contra la isquemia. Sin embargo un amplio estudio con 1,350 pacientes resulto negativo, pero indicando en un



análisis post-hoc que podría beneficiar un tipo específico de isquemia (síndrome de circulación anterior total), lo cual inició un nuevo ensayo ahora en 1,200 pacientes<sup>31</sup>.

#### **2.1.6.2.1.2. Bloqueadores de los canales voltaje-dependientes de Na<sup>+</sup>**

La activación de los canales presinápticos de sodio puede inducir la liberación de neurotransmisores, por lo que de manera notable el glutamato mismo, así como algunos antagonistas de este efecto han sido propuestos para revertir la toxicidad del glutamato, un ejemplo de los fármacos probados que se cree actúan mediante este mecanismo es el BW619C89<sup>32</sup>.

#### **Fosfenitoína**

Tras dilucidar el mecanismo mediante el cual ofrece neuroprotección a tejido hipocampal in vitro tras la privación de oxígeno y glucosa<sup>33</sup>, la fosfenitoína profármaco de la fenitoína ha sido evaluada en un ensayo clínico fase III, sin embargo el enrolamiento se detuvo a los 462 pacientes debido a que no se halló ninguna diferencia en los puntos de evaluación primario y secundario escogidos para el estudio<sup>21</sup>.

#### **2.1.6.2.1.3. Bloqueadores de los canales voltaje-dependientes de Ca<sup>2+</sup>**

Una estrategia obvia en el tratamiento del infarto cerebral, es la regulación de la entrada de calcio a la célula usando inhibidores de sus canales voltaje-dependientes.

#### **Nimodipina y flunarizina**

La nimodipina es un inhibidor de los canales de calcio tipo L, mientras que la flunarizina actúa principalmente sobre los canales de calcio tipo T. Ambos reducen el tamaño del infarto cuando se administran poco tiempo después de una isquemia cerebral permanente o transitoria, sin embargo su potencia es menor a la de un antagonista de los receptores del glutamato. Aunque un meta-análisis de 9 estudios con dosis oral de 120 mg/día

sugería un posible beneficio de la nimodipina dentro de las primeras doce horas después de la lesión, el ensayo “uso muy temprano de la nimodipina en infarto” (VENUS) llevado a cabo para confirmar tal hipótesis, fue detenido ya que no se evidenció estadísticamente ningún beneficio<sup>34</sup>. El desarrollo clínico de la flunarizina en el infarto cerebral fue también cancelado después de los resultados negativos del “estudio de flunarizina en infarto” (FIST)<sup>35</sup>.

#### **2.1.6.2.1.4. Inhibidores de la vía del óxido nítrico**

##### **Lubeluzol**

El lubeluzol es un compuesto benzotiazólico que previene el incremento en las concentraciones extracelulares de glutamato e inhibe la neurotoxicidad inducida por el glutamato relacionada al óxido nítrico. El lubeluzol reduce el volumen de infarto en modelos roedores de infarto cerebral trombótico inducido fotoquímicamente y mejora la respuesta neurológica. Tras la realización del ensayo fase II, fueron conducidos en 3,177 pacientes tres ensayos fase III a una dosis de 7.5 mg. Los tres ensayos fallaron en demostrar el efecto benéfico del lubeluzol en los resultados primarios esperados, por lo que el estudio fue abandonado<sup>36</sup>.

#### **2.1.6.2.1.5. Antioxidantes**

Las especies reactivas de oxígeno, dañan aparentemente las células cerebrales durante la reperusión hacia el área isquémica después de la recanalización, cuando los mecanismos de defensa antioxidativa son insuficientes. La formación de los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo, pueden resultar en la lesión de los lípidos de membrana, oxidación de proteínas y daño al DNA, por lo que agentes antioxidantes como el tirilazad detienen estos procesos<sup>21</sup>.

## **Tirilazad**

El tirilazad es un 21-aminoesteroide no glucocorticoide inhibidor de la peroxidación de lípidos que actúa como un agente antioxidante. En animales tratados entre los 10 y los 15 minutos después de una isquemia cerebral focal, redujo el área infartada, sin embargo en dos grandes ensayos fase III, no se pudo demostrar una mejora en los resultados esperados. Debido a la sugerencia de que la dosis utilizada en ambos estudios era muy pequeña (6 mg/ kg / día por tres días), dosis mayores fueron probadas, deteniéndose los estudios prematuramente debido a la aparición de problemas de seguridad<sup>37</sup>.

## **Ebselen**

El compuesto seleno-orgánico, ebselen, el cual tiene una actividad antioxidante a través de la imitación de la glutatión-peroxidasa, fué estudiada en Japón, mejorando las expectativas de los resultados a un mes, pero no a tres meses después de comenzar el tratamiento. Se esperan nuevos estudios con esta molécula<sup>38</sup>.

### **2.1.6.2.1.6. Agentes anti-inflamatorios**

#### **Anticuerpos ICAM-1 (Enlimomab)**

Dentro de las horas posteriores al establecimiento de la isquemia, los niveles de moléculas intercelulares de adhesión 1 (ICAM-1) se incrementan en la zona de isquemia cerebral focal, lo que permite la entrada de leucocitos hacia área cerebral isquémica. Las citocinas liberadas desde las células blancas invasoras contribuyen al daño del tejido cerebral. Los anticuerpos anti-ICAM-1 reducen el volumen del infarto en ratas cuando el modelo incluye reperfusión. Enlimomab, un anticuerpo monoclonal murino contra ICAM-1 ha sido estudiado en un ensayo fase III, sin llenar las expectativas generadas en el laboratorio. Incluso se detectó una tendencia hacia un deterioro neurológico temprano en los pacientes que recibían el tratamiento, lo cual se intentó explicar como una reacción inmunológica intrínseca al enlimomab que cancelaba cualquier efecto benéfico<sup>39</sup>.

### 2.1.6.2.1.7. Intervención contra la muerte celular programada (apoptosis)

#### Factores de crecimiento

Inhibidores de los genes de expresión patológicos y la síntesis de proteínas puede bloquear la degeneración de neuronas cultivadas después del retiro de los factores de crecimiento<sup>21</sup>.

La cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, reduce significativamente el tamaño del infarto e inhibe la síntesis de proteína nueva hasta en un 70 % cuando se da por vía intravenosa por 24 horas comenzando 30 minutos antes del establecimiento de un modelo de infarto<sup>40</sup>.

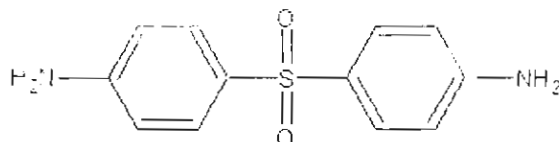
## 2.2. Dapsona

### 2.2.1. Características fisico-químicas generales

**Nombre químico:** 4,4'-diaminodifenilsulfona

**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S

**Fórmula estructural:**



**Peso molecular:** 248.30 g/mol

**Clave de registro en el chemical abstract:** CAS-80-08-0

**Características físicas:** Polvo cristalino, blanco o amarillo pálido sin olor.

**Punto de fusión:** 175 -176 °C (existe una forma con un punto de fusión de 180.5 °C).

**Solubilidad:** Casi insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y muy soluble en acetona.

**pK<sub>b</sub>:** 13.0

**Características especiales:** Producto fotosensible<sup>41-42</sup>.

### 2.2.2 Antecedentes históricos

La dapsona fue sintetizada en 1908 por Fromm y Wittmann. Su síntesis no estuvo basada en un problema terapéutico, pero representó un avance en el campo de la química al ser identificada como una molécula importante para la producción de colorantes azo.

Aunque la dapsona fue sintetizada en 1908, mucho tiempo antes de que se sintetizaran las primeras sulfonamidas, sus efectos antibacteriales fueron investigados por primera vez a finales de los años treinta. Dos grupos independientes de investigadores, Buttle y cols. en Inglaterra y Forneau y cols. en Francia, retornaron a las investigaciones con dapsona para descubrir sus propiedades quimioterapéuticas<sup>43</sup>.

Desde 1937 se ha reportado que las sulfonas inhibían el crecimiento de varias bacterias patogénicas, tales como *Streptococci*, *Staphylococci*, *Gonococci*, *Pneumococci*, *Mycobacteria leprae*, el bacilo de la tuberculosis entre otras cepas. Sin embargo los beneficios observados en la eliminación de las bacterias en infecciones inducidas experimentalmente en ratones, parecieron estar asociados con efectos tóxicos secundarios, y las sulfonas fueron entonces consideradas demasiado tóxicas para su uso en seres humanos y de ningún valor para el tratamiento de infecciones en el hombre. Tales efectos secundarios fueron sin duda el resultado de las excesivas dosis de dapsona administradas en esos tiempos comparada con las utilizadas hoy en día. Algunos estudios sobre dapsona y algunas sulfonas relacionadas (glucosulfona) continuaron y a principios de los años cuarenta, ganaron el reconocimiento mundial como una terapia eficaz en el tratamiento de la lepra así como de otras enfermedades infecciosas.

En 1950, una asunción incorrecta preparó el camino para las sulfonas en el campo de la dermatología. Dos investigadores portugueses, quienes asumieron que la dermatitis herpetiforme era una enfermedad infecciosa, examinaron el efecto de diferentes sulfonas sobre este mal, y de manera casual hallaron que el efecto resultaba excelente. Otros investigadores pronto confirmaron la eficacia de este compuesto para esta y otras enfermedades dermatológicas<sup>43-44</sup>.

### 2.2.3. Propiedades Terapéuticas

Actualmente la dapsona es uno de los componentes del régimen multi-fármaco aconsejado por la Organización Mundial para la Salud (OMS) en el tratamiento de la lepra. Es también utilizado en la profilaxis de la malaria, en desórdenes dermatológicos de origen autoinmune (dermatitis herpetiforme y lupus miliar), en artritis reumatoide y en medicina veterinaria<sup>45</sup>.

#### 2.2.3.1. Uso terapéutico antimicrobiano

Las sulfonas tienen actividad bacteriostática, pero no bactericida contra *Micobacterium leprae* y se ha calculado que la sensibilidad al fármaco es de 1 a 10 ng/ml en microorganismos de recuperados de pacientes no tratados. La dosis habitual en adultos con lepra es de 100 mg diarios del fármaco. El tratamiento por lo común se inicia con dosis menores y se van aumentando hasta llegar a las dosis recomendadas, en un lapso de uno o dos meses. Hay que continuar con el tratamiento durante tres años como mínimo y a veces se necesita prolongarlo toda la vida.

##### 2.2.3.1.1. Mecanismo de acción antimicrobiana

El mecanismo de acción de las sulfonas es el mismo que el de las sulfonamidas, actúan como análogos estructurales y antagonistas del ácido para-aminobenzoico (PABA) y, por tal razón, impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico (ácido pteroilglutámico). De modo más específico, son inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico. Los microorganismos sensibles sintetizan su propio ácido fólico. La bacteriostasis inducida por las sulfonas es antagonizada en forma competitiva por PABA. Las sulfonas no afectan las células de mamífero por este mecanismo por que necesitan ácido fólico preformado y no lo sintetizan; por tal razón, son similares a las bacterias no sensibles a sulfonas que utilizan ácido fólico preformado. Tanto las sulfonas como las sulfonamidas, poseen en promedio

el mismo espectro de actividad antibacteriana y ambas son antagonizadas por el ácido para-aminobenzoico<sup>46</sup>.

### **2.2.3.2. Uso terapéutico en dermatología**

La dapsona es un fármaco útil en el tratamiento de enfermedades dermatológicas que cursan con la infiltración de neutrófilos en la piel. Algunas de las enfermedades dermatológicas tratadas actualmente con dapsona incluyen al acné, el pénfigo, la dermatitis herpetiforme y la epidermólisis bulosa<sup>43</sup>.

#### **2.2.3.2.1 Mecanismo de acción anti-inflamatoria**

La desaparición de la infiltración neutrofílica después de la administración de dapsona, se ha explicado mediante la inhibición en la producción de estímulos quimiotácticos a los neutrófilos y mediante la disminución en la respuesta de los neutrófilos a las señales quimiotácticas.

Experimentalmente se ha demostrado que la dapsona inhibe la unión de leucotrieno B<sub>4</sub> a neutrófilos, inhibiendo su respuesta quimiotáctica y que además inhibe la síntesis de productos de la 5-lipooxigenasa en los leucocitos polimorfonucleares, bloqueando su efecto inflamatorio ante la reducción en la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Se ha señalado también que la dapsona podría inhibir de manera local y específica la función de los neutrófilos en los sitios de inflamación, ya que se ha demostrado experimentalmente que la dapsona previene las lesiones mediadas por la mieloperoxidasa y la eosinófilperoxidasa en tejido, en sitios donde las enzimas peroxidadas son secretadas y diluidas en un medio neutral del espacio intersticial tisular<sup>44,47-48</sup>.

### 2.2.3.3. Uso en infecciones oportunistas

Con el aumento de infecciones oportunistas en pacientes HIV-positivos, la dapsona ha recobrado importancia como un antibiótico oral, cuya combinación con trimetoprim, es aconsejada para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis carinii*, y su mezcla con pirimetamina en la prevención de toxoplasmosis, tuberculosis y neumonía por *Pneumocystis*<sup>49-50</sup>.

### 2.2.3.4. Indicaciones terapéuticas en neurología

A principios de la década de los años noventa, los grupos de Hamada y cols.<sup>51</sup> y Altagracia y cols.<sup>52</sup>, descubrieron que la dapsona tenía un efecto anticonvulsivo en diferentes modelos experimentales de epilepsia desarrollados en ratas Wistar y en gato. Dicha propiedad fue confirmada electrofisiológicamente para la dapsona y algunos de sus análogos en años recientes por López-Naranjo y cols.<sup>53</sup>, generando diversas hipótesis acerca de su mecanismo de acción, el cual al ser considerado análogo al del fármaco anticonvulsivo zonisamida (antagonista de los canales de calcio dependientes de voltaje). Estos hallazgos llevaron a la idea de que la dapsona podría emplearse como un posible agente neuroprotector en un modelo de infarto cerebral focal realizado en rata Wistar, obteniéndose excelentes resultados al disminuir significativamente el área de infarto con respecto al grupo experimental control al que no se le administró la sulfona<sup>54</sup>.

Para poder establecer si la dapsona podía actuar sobre los mecanismos de daño celular producidos durante el infarto celular, se han realizado experimentos en los cuales se ha demostrado que es capaz de antagonizar las acciones evocadas por la excitotoxicidad del glutamato y es además capaz de inhibir la lipoperoxidación de lípidos<sup>55</sup>.

Tales descubrimientos en el campo de la terapéutica neurológica han conducido a la realización de diferentes estudios pilotos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" con pacientes que sufren epilepsia refractaria o



infarto cerebral aterotrombótico para dilucidar la eficacia de la dapsona en el ser humano para el tratamiento de dichos padecimientos.

#### **2.2.4. Farmacocinética de la dapsona**

##### **2.2.4.1. Administración oral**

La dapsona se absorbe en forma rápida y casi completa, desde vías gastrointestinales. Después de dos a ocho horas de administrar dapsona, se detectan cifras máximas de ella en plasma; la vida media es de unas 20 a 30 horas. Veinticuatro horas después de la ingestión de 100 mg, las concentraciones plasmáticas varían de 0.4 a 1.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y una dosis de 100 mg de dapsona al día produce un promedio de 2  $\mu\text{g}$  de dapsona “libre” por gramo de sangre o tejido hepático. En promedio, 70 % del fármaco está ligado a proteínas plasmáticas<sup>45-46</sup>.

##### **2.2.4.2. Administración intravenosa**

Perfiles tiempo-concentración para una administración intravenosa en bolo de dapsona, no se hallan descritos, debido a la dificultad para preparar un inyectable intravenoso por su pobre solubilidad en agua. Soluciones en mezclas de agua con solventes orgánicos han sido descritas, pero no existen estudios farmacocinéticos al respecto<sup>56</sup>.

#### **2.2.5. Metabolismo**

La acetilación es una de las dos principales rutas del metabolismo de la dapsona. La enzima N-acetiltransferasa, la cual se halla presente en el hígado y en la mucosa del yeyuno, es la responsable de este proceso metabólico. Un grupo amino de la dapsona es acetilado para formar monoacetildapsona, pero la acetilación del segundo grupo amino no ocurre en una cantidad significativa. Un equilibrio constante entre la acetilación y la desacetilación es alcanzado dentro de pocas horas tras la administración de dapsona.

La hidroxilación es la segunda principal ruta de metabolismo de la dapsona y puede ser la responsable por la de los efectos hematológicos adversos. Sin embargo ha sido poco estudiada debido a la inestabilidad y reactividad química que hace difícil la medición de los productos de la hidroxilación en los fluidos biológicos además de las bajas concentraciones de estos en plasma. La N-hidroxilación es efectuada en el hígado por el sistema oxidasa de función mixta del retículo endoplásmico en presencia de oxígeno y NADPH. La N-hidroxilación puede también llevarse a cabo en la fracción microsomal del tejido enterohepático<sup>45,57</sup>.

#### **2.2.6. Distribución**

Las sulfonas se distribuyen en el agua corporal total y están presentes casi en todos los tejidos. Tienden a ser retenidas en piel y músculo y, sobretudo en hígado y riñones; en dichos órganos, se detectan huellas de los fármacos incluso tres semanas después de interrumpir su consumo. Las sulfonas son retenidas en la circulación por largo tiempo por resorción intestinal, desde la bilis; por esta razón, es conveniente interrumpir de manera periódica el tratamiento. La dapsona es acetilada en el hígado, y la velocidad de acetilación depende de mecanismos genéticos; interviene la misma enzima que lleva a cabo la acetilación de la isoniazida.

La administración diaria de 50 a 100 mg genera valores plasmáticos que rebasan las concentraciones inhibitoras mínimas usuales, incluso en sujetos acetiladores rápidos, en quienes la vida media de dapsona y algunos otros fármacos desde el suero es más breve de la normal<sup>45-46</sup>.

#### **2.2.7. Excreción**

La excreción de las sulfonas por orina varía con el tipo de fármaco y por ella se elimina 70 a 80 % de una dosis de dapsona. El fármaco aparece en orina en la forma de un mono-N-glucurónido lábil a ácido y un mono-N-sulfamato, además de una cifra no precisada de metabolitos no identificados. Disminuye la excreción de los metabolitos de dapsona

acidolábiles por orina en grado significativo, y los de la dapsona libre en menor extensión<sup>45</sup>.

### **2.2.8. Contraindicaciones**

La dapsona se halla contraindicada en pacientes con hipersensibilidad documentada al fármaco. Pacientes con riesgo de enfermedades cardiopulmonares y hematológicas o por deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) deben ser monitoreados con mucho cuidado.

El uso clínico efectivo de la dapsona está limitado por las reacciones hematológicas adversas dependientes de la dosis, aún a la dosis diaria de 100 mg diarios en la terapia contra la lepra y en condiciones dermatológicas. Además en pacientes con una genética deficiente de ciertas enzimas involucradas en el proceso de la toxicidad son más susceptibles a los efectos hematológicos aún a dosis terapéuticas. El efecto adverso más común es la metahemoglobinemia la cual es significativa a una dosis de 100 mg en pacientes fenotípicamente normales y es severa en pacientes con una deficiencia de la metahemoglobina reductasa NADH-dependiente<sup>58</sup>.

#### **2.2.8.1. Anemia hemolítica**

El desarrollo de metahemoglobinemia y anemia hemolítica ha sido ampliamente reconocido como un evento adverso relacionado con la dapsona y ocurre en cierto grado en todos los individuos a los que se les administra. Hay sin embargo una significativa variabilidad en el grado e importancia en los cambios hematológicos. Aunque los pacientes predispuestos de manera dosis-dependiente pueden presentar efectos significativos después de una dosis única de 100 mg<sup>59</sup>.

Datos que confirman el hecho de que la dapsona no es directamente tóxica para los eritrocitos en modelos in vivo y el que los niveles de dapsona no correlacionan con los efectos hematológicos adversos, han conducido al descubrimiento de que la

hemotoxicidad de la dapsona se debe a sus metabolitos N-hidroxilados, como lo reportaron Hjelm y cols. en 1965<sup>60-61</sup>.

Estos metabolitos son potentes oxidantes. La habilidad de los eritrocitos para tolerar el stress oxidativo se halla relacionado al abastecimiento de glutatión reducido y a habilidad de la desviación de la vía de la hexosa monofosfato para reparar el daño oxidativo.

Debido a que los eritrocitos no pueden sintetizar nuevas proteínas, su habilidad para resistir el stress oxidativo decrece con el tiempo. El daño oxidativo provoca cambios estructurales a la membrana del eritrocito. Después la célula es marcada como “envejecida” por el cuerpo y es removida por el bazo (hemólisis extravascular), lo que probablemente cuenta para el decremento inicial en la cantidad de hemoglobina que se conserva en los pacientes que comienzan a ingerir dapsona<sup>59</sup>.

Una corrección parcial en los niveles de hemoglobina sobreviene después debido al aumento en la producción de nuevas células por la médula ósea. Cierta grado de hemólisis intravascular continúa presente debido a la fragilidad de los eritrocitos debida a los cambios estructurales en su membrana.

La susceptibilidad a los eventos adversos hematológicos se halla aumentada en individuos que tienen deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Dicha deficiencia resulta en el daño de la desviación de la hexosa monofosfato y en una disminución del abastecimiento de glutatión<sup>62</sup>. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se halla más frecuentemente ausente en los afroamericanos (10 % de la población americana negra). Existe variabilidad de la función enzimática en personas de descendencia de medio oriente y asiática, lo cual resulta en una hemólisis significativa<sup>63-64</sup>.

El mecanismo de este efecto adverso se muestra en la figura 3.

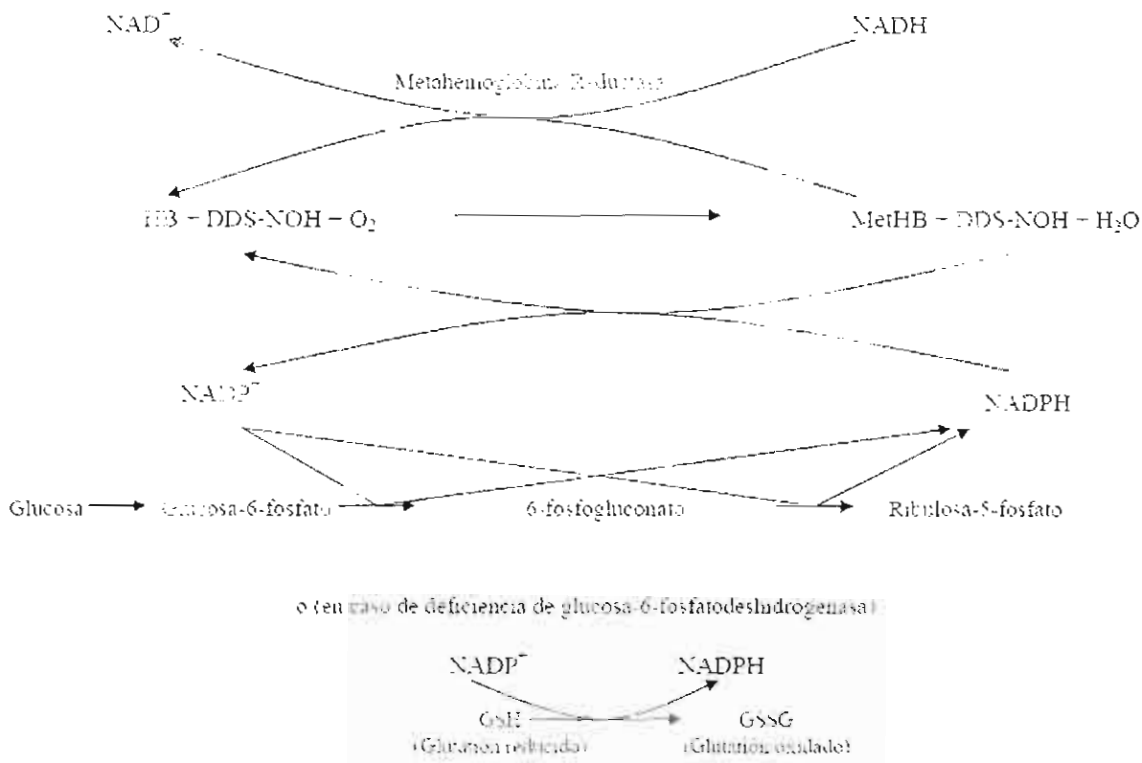


Figura 3. Formación de metahemoglobina en sujetos normales y deficientes de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa<sup>45</sup>.

### 2.2.8.1. Metahemoglobinemia

El efecto adverso más importante después de la anemia hemolítica es la metahemoglobinemia. La metahemoglobina es formada cuando el hierro dentro de la molécula heme es oxidado a su estado férrico por los metabolitos hidroxilamina de la dapsona. La reversión de esta reacción requiere de glutatión reducido y de la enzima de la metahemoglobina reductasa como lo describen Gill y cols.<sup>59, 65</sup>.

No se ha reportado una relación clara entre la metahemoglobinemia y la anemia hemolítica observada en pacientes que ingieren dapsona. La metahemoglobina no puede transportar oxígeno y existe un impacto sobre todo el sistema de abastecimiento de oxígeno solo a concentraciones mayores del 30% en individuos normales. La importancia clínica de la metahemoglobinemia en un paciente se halla relacionada con su nivel total

de hemoglobina y su reserva cardiopulmonar. Los síntomas y signos de toxicidad incluyen, somnolencia, dolor de cabeza, disnea y cianosis del paciente<sup>66</sup>.

No es posible predecir el grado de metahemoglobinemia basado en el grado de cianosis presente en el paciente. Además se ha demostrado que la metahemoglobinemia puede producir errores en las mediciones con el oxímetro de pulso. Los oxímetros de pulso miden la saturación de oxihemoglobina basándose en la absorbancia de longitud de onda relativa de la oxi y desoxihemoglobina. El espectro de absorción de la metahemoglobina es similar al de la hemoglobina desoxigenada, por lo que los valores resultarán bajos, aunque la metahemoglobina no tiene la misma implicación clínica que la desoxihemoglobina.

Prussick y cols.<sup>67</sup>, han demostrado que la vitamina E (800 UI/día) mejoran los marcadores de hemólisis y disminuye los niveles de metahemoglobinemia en pacientes tomando dapsona para el tratamiento de dermatitis herpetiforme, sin embargo los beneficios clínicos no se han documentado.

Coleman y cols.<sup>68</sup>, han encontrado que la cimetidina muestra un decrecimiento de la formación de metahemoglobinemia en pacientes a los cuales se les administra dapsona. Este fenómeno quizás se deba a que la cimetidina actúa inhibiendo la hidroxilación de la dapsona y de sus metabolitos, sin embargo los niveles de metahemoglobinemia después de dos meses de coadministración de ambos fármacos. Sugiriendo que el uso de ambos fármacos podría ser de utilidad en pacientes que requieren un incremento de la dosis de dapsona para obtener una mayor respuesta terapéutica pero se hallan limitados por los efectos adversos hematológicos.

En casos de severa metahemoglobinemia, Dawson y cols.<sup>69</sup>, recomiendan la administración oral (100-300 mg/día) o intravenosa (1 mg/kg en 5 min con una dosis de repetición 30 a 60 minutos después), de azul de metileno el cual puede ser utilizado para disminuir de manera aguda el nivel de metahemoglobina. El azul de metileno puede estimular la actividad de metahemoglobina reductasa dependiente de NADH, una vía de

reducción que requiere de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, por lo que los pacientes que presentan una deficiencia en esta enzima no tienen la capacidad de responder a la terapia con azul de metileno.

### **2.2.9. Efectos adversos idiosincráticos**

Los mecanismos de los efectos adversos idiosincráticos de la dapsona se hallan poco estudiados por lo que su comprensión es menor a los efectos adversos farmacológicos. Estos efectos no son dependientes de la dosis y no existe un criterio clínico para predecir su desarrollo<sup>57</sup>.

#### **2.2.9.1. Agranulocitosis**

La agranulocitosis es una de las reacciones adversas idiosincráticas más serias a la dapsona. El mecanismo por el cual esta se desarrolla no se halla dilucidado, sin embargo existen algunas hipótesis que involucran a los metabolitos hidroxilados de la dapsona.

Coleman<sup>70</sup>, ha propuesto que este metabolito debido a su citotoxicidad pudiera actuar en la médula ósea debido a su acarreo en los eritrocitos, ahí podría adherirseles y dañar a los precursores de los neutrófilos. Una segunda hipótesis sugiere que la enzima mieloperoxidasa que existe dentro de los precursores de los neutrófilos en la médula ósea producen los metabolitos hidroxilados de manera local. Tal suposición resulta poco probable por los hallazgos que han demostrado la interferencia que provoca la dapsona en la función de la mieloperoxidasa, por lo que este mecanismo probablemente produciría poca toxicidad en la médula ósea.

La propuesta más plausible en cuanto a la explicación de este fenómeno es la que sugiere que la dapsona induce a la apoptosis en los precursores de los neutrófilos. La proteína G acoplada a segundos mensajeros son importantes en varios de los sistemas reguladores de los neutrófilos, por lo que quizás al inhibir las proteínas G, la dapsona podría bloquear de manera altamente específica los mecanismos de control celular en vez de actuar como

una toxina o producir una respuesta inmune mediada por haptenos, lo que explicaría la pronta recuperación de la médula ósea después de abandonar la administración del fármaco.

La incidencia de agranulocitosis en pacientes tratados con dapsona por dermatitis herpetiforme reportada por Hornsten y cols.<sup>71</sup>, ha sido estimada en pacientes tratados por dermatitis herpetiforme en 1 caso por 3,000 pacientes por año de exposición.

La mediana de la duración de la terapia antes del desarrollo de agranulocitosis es de 7 semanas. Con la discontinuación del fármaco la recuperación se logra en un lapso de 7 a 14 días. Los pacientes deben tener frecuentes conteos de células sanguíneas en sangre total durante los tres primeros meses de terapia y deben ser instruidos para abandonar el fármaco ante las primeras apariciones de lo que pudieran ser signos o síntomas de infección, ya que la mayoría de los pacientes desarrollan fiebre o faringitis (signos de sepsis) al desarrollarse la agranulocitosis.

#### **2.2.9.2 Neuropatía**

La dapsona ha sido asociada a diversos efectos neurológicos adversos. El más común aunque aún así raro, es la neuropatía periférica, reportada por primera vez por Saqueton y cols.<sup>72</sup>. Esta neuropatía involucra de manera primordial a los nervios distales motores, con una degeneración axonal que ha sido evidenciada por electrofisiología. Aunque un componente sensorial ha sido reportado en algunos casos, este siempre ha ido asociado a hallazgos motores<sup>73-75</sup>.

Usualmente los pacientes no tienen ningún otro signo de toxicidad a la dapsona (síndrome de las sulfonas, anemia severa, metahemoglobinemia). La dosis de dapsona asociada con el desarrollo de neuropatía se halla entre los 75 a los 600 mg/día, aunque Daneshmend<sup>76</sup>, señala que la mayoría de los casos se han reportado a partir de dosis mayores a los 300 mg/día. La mayoría de los pacientes se recuperan después de



abandonar el tratamiento con dapsona, aunque dicha recuperación puede ser lenta o incompleta.

Para pacientes en los cuales el abandono del tratamiento puede resultar peligroso, se recomienda la disminución de la dosis, un periodo de lavado o el cambio por sulfapiridina. Aunque el mecanismo por el cual la dapsona provoca los casos de neuropatía no está totalmente claro, se piensa que el fenotipo acetilador de los pacientes se halla relacionado<sup>76</sup>.

### **2.2.9.3. Otros efectos neurológicos**

Se ha reportado la atrofia permanente del nervio óptico en pacientes con una severa sobredosis de dapsona, que se piensa es causada de manera secundaria a la isquemia inducida por fragmentos de eritrocitos que se hallan en el abastecimiento de sangre a la retina<sup>77</sup>.

Leonard y cols.<sup>78</sup>, examinaron el flujo sanguíneo retinal en pacientes con dermatitis herpetiforme que tomaban dosis entre los 50 y 100 mg/día de dapsona y no encontraron anormalidad alguna, sin embargo Homeida y cols.<sup>77</sup>, reporta un caso en el que una sobredosis de dapsona provocó en un paciente el desarrollo de neuropatía motora y atrofia del nervio óptico. Después de 14 meses la neuropatía se había resuelto, pero la atrofia del nervio óptico y el daño visual persistieron.

Casos de psicosis aguda después del tratamiento con dapsona han sido reportados por Daneshmend<sup>79</sup> y Fine y cols.<sup>80</sup>. La mayoría de estos casos ha sido en pacientes con lepra y dicho cambio en el estado mental ha sido resuelto después de la discontinuación del fármaco.

También dolor de cabeza y nerviosismo han sido reportados en pacientes que ingieren dapsona. Esto se halla relacionado al posible hecho de que algunos pacientes son sensibles incluso a los cambios leves en los niveles de metahemoglobina<sup>68</sup>.

#### **2.2.9.4. Efectos gastrointestinales**

Una variedad de efectos gastrointestinales adversos han sido también asociados con la dapsona. Algunos de los pacientes a lo que se les administra experimenta un leve malestar estomacal, que puede ser reducido al tomar el medicamento junto con la comidas. En otros pacientes se ha reportado el desarrollo de hepatitis hepatocelular primaria así como hepatitis colestásica: ambos se ha reportado se resuelven con la discontinuación del fármaco de 10 a 14 días después<sup>81-82</sup>.

La presencia de otros efectos adversos raros asociados a la dapsona incluyen hipoalbuminemia severa, (como una reacción autoinmune secundaria a la albúmina al actuar la dapsona unida a la proteína como un hapteno) y pancreatitis<sup>83-84</sup>.

#### **2.2.9.5. Síndrome de hipersensibilidad a la dapsona**

Un evento adverso más severo ha sido asociado a la dapsona, el cual ha sido denominado "síndrome de la dapsona" o "síndrome de la sulfona". Esta es una enfermedad sistémica idiosincrásica independiente de la dosis en la que diversas reacciones al fármaco en el organismo pueden aparecer después de un tratamiento prolongado. Este síndrome aparece usualmente después de 4 semanas de terapia y ocurre en menos del 0.5 de los pacientes que son tratados<sup>85</sup>.

Se ha propuesto que el metabolito N-hidroxilado de la dapsona se halla involucrado en la patogénesis de este síndrome. Quizás actuando como un antígeno químico que provoca una reacción autoinmune. La vejez y un estado preexistente de enfermedad hepática se piensa son condiciones "protectoras", lo cual no ha sido validado experimentalmente.

Los pacientes suelen cursar con fiebre, una erupción cutánea generalizada, linfoadenopatía y hepatitis. La erupción cutánea puede variar desde una maculopapular hasta la necrólisis y la hepatitis muestra un patrón mixto hepatocelular-colestásico<sup>86</sup>.

Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan con la discontinuación del fármaco, se han reportado casos fatales. En algunos casos después de la reacción de hipersensibilidad se han descrito casos en los que se desarrolló hipotiroidismo.

#### **2.2.9.6. Erupciones cutáneas por sensibilidad al fármaco**

La dapsona ha sido asociada con una gran variedad de erupciones cutáneas, que van desde la típica presentación maculopapular por alergia a un fármaco hasta el eritema multiforme o la necrólisis tóxica epidermal<sup>85</sup>. Aunque los mecanismos de la hipersensibilidad cutánea son desconocidos Reilly y cols.<sup>87</sup>, recientemente implicó la hidroxilación local de dapsona en keratinocitos resultante en toxicidad local. La fotosensibilidad ha sido reportada en algunos pacientes frecuentemente como resultado del síndrome de la dapsona.

#### **2.2.9.7. Carcinogénesis**

Se ha sugerido que la dapsona es un débil carcinógeno. Estudios en animales han revelado un ligero incremento en la incidencia de malignidad en algunos animales tratados durante dos años con dosis altas. Una encuesta realizada en 1678 pacientes admitidos para su tratamiento por la confirmación histológica de lepra en el Centro Nacional de la Enfermedad de Hansen en Carville entre 1933 y 1977 indican que pese a los datos de carcinogenicidad en animales, el uso de sulfonas incluyendo la dapsona no tuvieron ningún efecto significativo en el riesgo de presentar algún tipo de cáncer en estos pacientes<sup>56,88</sup>.

#### **2.2.9.8. Embarazo y lactancia**

La seguridad de la dapsona durante el embarazo ha sido también de interés debido a que muchos de los pacientes tratados por lepra o desórdenes dermatológicos requieren tratamiento durante el estado de embarazo. Aunque no se ha probado la seguridad de la dapsona durante el embarazo, series recientes de pacientes con dermatosis lineal IgA y

pacientes con lepra sugieren que la dapsona puede ser utilizada con seguridad durante el embarazo<sup>89</sup>. Debe hacerse notar sin embargo que la dapsona es secretada en la leche materna y puede causar de manera rara casos de anemia hemolítica en infantes lactantes de madres que se hallan bajo tratamiento con la sulfona<sup>90</sup>.

#### **2.2.10. Interacciones farmacológicas de la dapsona.**

Las interacciones medicamentosas en pacientes tomando dapsona son raras.

El probenecid puede reducir la excreción renal de la dapsona aunque la significancia clínica de este hallazgo no ha sido establecida. Interacciones potencialmente significativas pueden ocurrir cuando los pacientes bajo tratamiento con dapsona toman otros fármacos que son oxidantes. El incremento del estrés oxidativo para el eritrocito puede empeorar la hemólisis normalmente observada con la dapsona. Tales fármacos incluyen otras sulfonamidas y antimaláricos como la hidrocloroquina<sup>45</sup>.

A continuación se enumeran varios fármacos con los que también se han reportado interacciones farmacológicas con la dapsona:

**AURANOFÍN** (Tratamiento para formas activas, progresivas o destructivas de artritis)

Efecto: Aumento de la depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto aditivo, por lo que se recomienda la administración con precaución y monitoreada.

**AUROTIOGLUCOSA** (Fármaco antiartrítico en primeros estadios)

Efecto: Aumento de la depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto aditivo, por lo que se recomienda su administración con precaución.

**DELAVIRDINA** (Inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de los nucleósidos)

Efecto: Aumento de la concentración plasmática de dapsona en presencia de delavirdina.

Mecanismo: Inhibición de la metabolización hepática, por lo que se recomienda evitar su administración conjunta.

**HIDROXIUREA** (Tratamiento de ciertos trastornos hematológicos como leucemia granulocítica crónica, policitemia vera y trombocitopenia esencial)

Efecto: Aumento del riesgo de la depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico provocado por la interacción de ambos fármacos.

**MELFALÁN** (Agente antineoplásico inespecífico)

Efecto: Aumento del riesgo de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico por interacción entre ambos fármacos.

**MITOMICINA** (Antineoplásico en cánceres de estómago, intestino y colon)

Efecto: Aumento del riesgo de depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico por interacción entre ambos fármacos.

**PLACLITAXEL** (Antineoplásico en cáncer ovárico o de mama)

Efecto: Aumento del riesgo de depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico por interacción entre ambos fármacos.

**RIFAMPICINA** (Antibiótico para lepra, tuberculosis, etc.)

Efecto: Reducción de la eficacia de la dapsona.

Mecanismo: Inducción de enzimas hepáticas y aumento del metabolismo de la dapsona.

Recomendación: Administrar con precaución y realizar el ajuste de la dosis de la dapsona de ser necesario.

**SULFISOXAZOL** (Antibiótico)

Efecto: Incremento del riesgo de leucopenia.

Mecanismo: Efecto aditivo, por lo que se recomienda la administración con suma precaución y el monitoreo terapéutico en el paciente.

**TEGAFUR** (Quimioterapia contra el cancer de intestino)

Efecto: Aumento del riesgo de supresión de médula ósea.

Mecanismo: Efecto aditivo por lo que se recomienda no administrar de manera conjunta.

**TENIPÓSIDO** (Terapia para la leucemia linfocítica infantil)

Aumento del riesgo de depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico, por lo que se sugiere administrarse con precaución.

**TOPOTECÁN** (Quimioterapia contra el cáncer de ovarios)

Aumento del riesgo de depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico, por lo que se sugiere su administración con precaución.

**TROFOSFAMIDA** (Antineoplásico alquilante, agente con actividad inmunomoduladora).

Efecto: Riesgo de aplasia medular.

Mecanismo: Efecto aditivo, por lo que se recomienda la reducción de la dosis de ambos fármacos en el uso consecutivo o recurrente.

**VINORELBINA** (Agente quimioterapéutico contra el cáncer de pulmón)

Efecto: Aumento del riesgo de la depresión de la médula ósea.

Mecanismo: Efecto sinérgico por lo que se recomienda su administración con precaución.

**ZALCITABINA** (Agente inhibidor de la transcriptasa reversa análogo de nucleósidos)

Efecto: Riesgo aumentado de neuropatía periférica.

Mecanismo: Efecto neurotóxico aditivo, por lo que se sugiere evitar la administración conjunta de ser posible, o monitorear estrechamente al paciente por evidencias de neuropatía periférica<sup>91</sup>.

## **2.3. Estudios Farmacocinéticos**

### **2.3.1. Definición de farmacocinética**

La farmacocinética es citada como la disciplina de la farmacología que está dedicada al estudio de procesos tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco así como la múltiple inter-relación entre los factores que afectan dichos procesos, como la absorción incompleta, la saturabilidad de transporte, la biotransformación o su capacidad de unión a tejido o proteínas<sup>92</sup>.

La farmacocinética es una relativamente reciente rama de la ciencia, la cual se ha desarrollado rápidamente en los últimos 30 años, gracias a la serie de descubrimientos analíticos que han permitido medir la concentración de los fármacos en matrices biológicas con métodos altamente selectivos y sensibles. La mayoría de los fármacos antiguos y prácticamente todos los nuevos han sido investigados exhaustivamente para determinar su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Esto ha producido una gran cantidad de datos, los cuales han caracterizado fármacos través de sus parámetros “huella digital”. La farmacocinética juega actualmente un papel determinante en el desarrollo de un fármaco desde los estudios básicos hasta los protocolos clínicos.

En el desarrollo de un nuevo fármaco, esfuerzos simultáneos en estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos han producido un alto grado de sinergia, la más útil, es la identificación de una ventana terapéutica, y cuándo puede esta ser alcanzada.

La linealidad-proporcionalidad de dosis, el efecto del género, el metabolismo y posibles polimorfismos, estudios en neonatos, niños, ancianos, pacientes enfermos e incluso de poblaciones, la biodisponibilidad absoluta o relativa, posibles interacciones y la posible existencia de un compartimiento en la distribución de un fármaco son otras importantes aplicaciones de los estudios farmacocinéticos. La mayor parte del desarrollo actual de la tecnología farmacéutica los cuales han producido sistemas de liberación controlada y la introducción al mercado de medicamentos genéricos nunca habría sido posible de no ser por la activa contribución de la farmacocinética.

El término "Farmacocinética" cubre el estudio de la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME) de entidades químicas, principalmente de sustancias medicinales y su comportamiento con relación al tiempo<sup>93</sup>.

### 2.3.2. Antecedentes históricos

El término Farmacocinética deriva del griego *phármakon* y *kineticos* y fue utilizado por primera vez en 1953 por el Friedrich A. Dost en "Der Blutspiegel" (Niveles sanguíneos).

Los estudios farmacocinéticos fueron inicialmente llevados a cabo para fármacos marcados radioactivamente, para la evaluación de sus concentraciones en fluidos a partir del conteo de la radioactividad total. Una aproximación pionera fue llevada a cabo en los años cincuentas por Okita, quien cultivó *Digitalis purpurea L.* en una cámara de acceso de aire controlado en presencia de  $^{14}\text{CO}_2$  y después extrajo y purificó la digitoxina marcada resultante, la cual fue administrada a perros y seres humanos. produciendo por lo tanto los primeros datos cinéticos de este fármaco.

Varios fármacos han sido investigados después de ser marcados radioactivamente pero solo pocos de ellos han producido datos válidos. La mayoría de los datos son de hecho depurados por el cuerpo por procesos de biotransformación. En estos casos una evaluación de la radioactividad total da información con la suma del compuesto original y de sus metabolitos, los cuales son pobres o nulamente específicos. Los datos obtenidos



de pocos fármacos depurados por infiltración renal son todavía válidos. Este es el caso de la digitoxina, la cual fue posteriormente investigada por Doherty en los años sesentas en animales y humanos usando la sustancia marcada con tritio. Los datos de Doherty son todavía válidos debido a que coinciden con avances en el campo de la analítica. En 1969 Smith desarrolló el método para cuantificar la digoxina en suero por radioinmunoensayo (RIA), permitiendo a gran número de estudios de biodisponibilidad ser llevados a cabo<sup>93</sup>.

Desde los años setentas, continuas mejoras han sido llevadas a cabo en el campo de la analítica. La cromatografía de gases (CG) se ha beneficiado con varios detectores específicos como los de captura de electrones (DCE), el analizador térmico de energía (ATE), el termoiónico específico (TE) y la fragmentografía de masas en la espectrometría de masas. Una nueva técnica, la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), se diseminó también rápidamente por el mundo y gracias a los detectores ultravioleta, electroquímico y fluorométrico y de espectroscopia de masas, ha probado su capacidad para resolver entre el 65 y el 70 % de los problemas analíticos planteados por la farmacocinética. Recientemente técnicas de análisis como la espectrometría de masas tandem (MS/MS) y la electroforesis capilar han cobrado mucha importancia<sup>92-93</sup>.

Un requisito para toda la investigación farmacocinética es la disponibilidad de un método analítico apropiado y confiable para medir las concentraciones del fármaco y/o el metabolito en distintos fluidos biológicos. Actualmente, grandes avances en la elucidación de las propiedades de un fármaco han sido logradas gracias a la medición de pequeñas cantidades con métodos analíticos más sensibles y selectivos. Una consecuencia de tales avances en el desarrollo de la investigación farmacocinética es el reconocimiento de la alta variabilidad en los diferentes procesos debida a factores genéticos, ambientales y patofisiológicos.

Durante las últimas tres décadas las nuevas tendencias analíticas han producido datos farmacocinéticos específicos para fármacos nuevos y antiguos. Por lo tanto la farmacocinética se ha convertido en una rama de la ciencia específica con sus propios investigadores especialistas, libros de texto, software, guías operativas y estadística

dedicada. Combinada con la farmacodinamia, la farmacocinética no es solo útil sino indispensable en el desarrollo de fármacos y sus procedimientos de administración. Algunos de los más recientes descubrimientos farmacéuticos se han alcanzado a partir de datos farmacocinéticos. Estos incluyen varios sistemas de liberación de fármacos, los cuales permiten a ciertos fármacos ser administrados una vez por día, en algunos casos dos veces por semana y a veces hasta solamente una vez por semana, mejorando el apego del paciente al tratamiento, controlando la concentración máxima y por lo tanto disminuyendo la posibilidad de aliviar los efectos adversos<sup>94</sup>.

### **2.3.3. Farmacocinética no clínica**

Los protocolos clínicos de fase I deben ser precedidos por pruebas de toxicidad aguda y subaguda y de mutagenicidad realizados en varias especies animales con la finalidad de verificar si el estudio de un fármaco en seres humanos es seguro.

En el pasado, los estudios de farmacocinética en animales incluían varias pruebas que eran requisitos en humanos, sin embargo hoy en día se trata de restringir los estudios en animales solamente para obtener datos toxicológicos, toxicocinéticos y de seguridad farmacológica, partir de los cuales se pueden hacer extrapolaciones a la farmacología clínica.

#### **2.3.3.1. Farmacocinética y toxicocinética en animales**

El hallazgo de un extenso intervalo de dosis puede ser logrado en estudios toxicocinéticos en animales, donde dosis altas son frecuentemente exploradas cuando se trabaja con fármacos activos en altas dosis. En tales situaciones es posible explorar la seguridad ante muy altas concentraciones del fármaco en plasma del fármaco original y de sus metabolitos. El fármaco original puede ser frecuentemente bien tolerado, mientras que sus metabolitos pueden poseer algunas propiedades toxicológicas. Este es el caso de algunos compuestos que son oxidados por el sistema enzimático del citocromo P450

convirtiéndolos en metabolitos químicamente reactivos tales como los derivados epóxidos y los N-hidroxilados<sup>95</sup>.

Cuando varias especies animales son investigadas, el patrón metabólico en animales puede ser completamente definido, lo cual facilita la extrapolación de tales datos a los seres humanos. Investigaciones toxicológicas a largo término deben ser llevadas a cabo en especies animales que asemejen de la manera más cercana las vías metabólicas en seres humanos y que además sean bien conocidas por estudios previos, como la rata, el ratón, el perro, monos y cerdos miniatura<sup>96</sup>.

### **2.3.3.2. Estudios ADME en animales**

En la mayoría de los casos estos estudios son llevados a cabo en animales con sustancia radiactivamente marcadas. La concentración en plasma y tejido, las rutas de excreción, el balance de cantidad administrada/cantidad excretada, transferencia transplacentaria y la cantidad metabolizada pueden ser determinadas por esta técnica.

La técnica auto-radiográfica asociada con las investigaciones ADME es particularmente útil ya que produce resultados de la distribución corporal y en órganos en los cuales el fármaco o sus metabolitos se pueden hallar concentrados<sup>95</sup>. Cuando se trata de molécula altamente metabolizadas a agua o CO<sub>2</sub>, los animales son colocados en cajas metabólicas selladas a un constante bajo flujo de O<sub>2</sub>, donde el CO<sub>2</sub> y el agua producidos metabólicamente son atrapados en trampas específicas para dichos metabolitos.

En los casos en que el ADME de un fármaco es estudiado en más de una especie, los datos de diferencia inter-especies se hallan disponibles y resultan de mayor importancia en la extrapolación a humanos<sup>93</sup>.

### **2.3.3.3. Escalamiento alométrico**

La extrapolación de los datos obtenidos en animales para evaluar parámetros farmacocinéticos en humanos es una importante herramienta en el desarrollo de fármacos. El escalamiento alométrico tiene varios componentes y muchas aproximaciones y técnicas han sido propuestas para optimizar la predicción de parámetros farmacocinéticos en humanos a partir de modelos animales.

La investigación y el proceso de desarrollo de nuevos fármacos y formulaciones involucran el estudio de compuestos potencialmente terapéuticos en pequeños animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, perros o monos. Por razones éticas, los estudios relevantes farmacológicos y toxicológicos de tales compuestos son llevados a cabo en animales antes de ser administrados en seres humanos.

Los datos obtenidos en animales pueden ser considerados de importancia en el proceso de desarrollo de fármacos, y la farmacocinética es un nexo vital con la predicción de parámetros farmacocinéticos en humanos. Tal extrapolación denominada “escalamiento Inter-especie”, puede ser útil en la facilitación de la transición de los regímenes de dosificación de animales a humanos y acelerar el proceso de evaluación del fármaco. El escalamiento Inter-especie está basado en la suposición de similitudes anatómicas, fisiológicas y bioquímicas entre las especies animales<sup>97-98</sup>.

#### **2.3.3.3.1. Modelos de escalamiento inter-especie**

El escalamiento Inter-especie puede ser llevado a cabo utilizando 2 tipos de modelos los cuales son:

- 1.- Modelos fisiológicamente basados
- 2.- Métodos alométricos empíricos

Los modelos fisiológicos proveen de una evaluación de la disposición del fármaco mecanísticamente basada. Estos modelos requieren el conocimiento del tamaño del órgano, el flujo sanguíneo del órgano, el coeficiente de partición entre la sangre y el órgano y la velocidad de las reacciones metabólicas. La unión a proteína plasmática, los parámetros cinéticos enzimáticos y los datos de depuración *in vivo* e *in vitro* también pueden ser incorporados a en un escalamiento Inter-especies fisiológicamente basado. Esta aproximación ha sido utilizada por muchos investigadores para predecir el comportamiento cinético de los fármacos<sup>99</sup>. Sin embargo los modelos fisiológicos han demostrado tener un uso limitado en el descubrimiento de fármacos y desarrollo de medicamentos ya que son costosos, matemáticamente complejos y además requieren de una alta inversión de tiempo.

Las similitudes anatómicas, fisiológicas y bioquímicas entre especies animales pueden ser generalizadas y expresadas matemáticamente por ecuaciones alométricas. Aunque esta aproximación alométrica es empírica, es menos complicada y más fácil de usar que los métodos fisiológicamente basados. La aproximación alométrica se halla basada en la función potencial, como el peso corporal (o área de superficie) de varias especies graficado contra el parámetro farmacocinético de interés en una escala logarítmica (log-log)<sup>100-101</sup>.

La extrapolación alométrica se halla afectada por el diseño experimental, las especies utilizadas, los errores analíticos y la variación de un laboratorio a otro en parámetros medidos y en el rango de masa corporal de las especies bajo estudio. Por lo que tales métodos deben ser llevados a cabo con precaución y con entendimiento de la capacidad y de las limitantes del escalamiento inter-especie<sup>99</sup>.

#### **2.3.3.4. Número de especies en el escalamiento alométrico**

El escalamiento Inter-especies para predecir parámetros farmacocinéticos en humanos es generalmente realizado con datos obtenidos de al menos 3 especies animales. Se ha propuesto que mientras mayor es el número de especies utilizado, mayor es la

oportunidad de hacer una predicción más precisa de los parámetros farmacocinéticos. Sin embargo por obvias razones, la utilización de más especies hace que el desarrollo del fármaco o medicamento requiera de una inversión económica y de tiempo mayor<sup>99</sup>.

#### **2.3.3.5. Unión a proteínas**

La unión del fármaco a las proteínas plasmáticas varía enormemente entre las especies animales. Lo cual tiene como resultado el que la distribución y la eliminación del fármaco pueda ser variable entre las diferentes especies. A través de los años varios intentos han sido realizados por diferentes investigadores para poder calcular la depuración del fármaco no unido a proteínas<sup>100</sup>.

#### **2.3.4. Estudios farmacocinéticos no clínicos previos de dapsona**

Durante la década de los setentas, se hicieron varios experimentos con la finalidad de dilucidar el comportamiento del perfil concentración-tiempo de la dapsona así como de su principal metabolito, la monoacetildapsona. Dichos experimentos fueron llevados a cabo en diversas especies animales para encontrar el modelo mamífero que tuviera el comportamiento más similar al del ser humano en cuanto a la absorción y al metabolismo del fármaco.

##### **2.3.4.1. Ratón**

Levy y cols.<sup>102</sup>, realizaron estudios acerca de la disposición de la dapsona en ratones de la cepa BALB/c y B6C3F1 a una dosis de 1 mg/kg de peso administrada por vía intraperitoneal, tales estudios tenían como finalidad conocer algunos parámetros farmacocinéticos básicos de la dapsona en estos roedores, medir su capacidad acetiladora y desacetiladora sobre la dapsona y la monoacetildapsona respectivamente y medir la unión del fármaco y su metabolito a las proteínas plasmáticas.

Tal experimento evidenció las numerosas diferencias existentes entre el hombre y el ratón con respecto a la disposición de la dapsona. La vida media de eliminación del fármaco en ambas cepas de ratón fue de entre 2 y 4 horas sin encontrar influencia alguna del género ni de la cepa a la que pertenecían, siendo tal valor aproximadamente un décimo de la vida media de eliminación que se reporta en seres humanos. Sin embargo el hecho de encontrar que en ambas especies la unión a proteínas del plasma sanguíneo es similar (de 80% aproximadamente), la disminución del parámetro de vida media en el modelo del roedor no pudo ser atribuido a tal fenómeno.

En cuanto al metabolismo del fármaco, se encontró que a diferencia de los seres humanos, los ratones de las cepas estudiadas no presentaron una acetilación significativa del fármaco por lo que fue imposible medir el parámetro de la vida media del metabolito, lo cual contrastaba con la actividad desacetiladora (de hasta 80%) encontrada tras la administración de la monoacetildapsona por vía intraperitoneal a una dosis de 1.2 mg/kg. Lo cual revela un comportamiento inverso al del ser humano quien tiene una alta capacidad acetiladora y una baja de desacetilación. Tales resultados demostraron que la disposición de la dapsona en ratón es sumamente diferente a la del ser humano, por lo que muchas de las variables terapéuticas de importancia clínica no podrían ser extrapoladas a partir del modelo de estudio en ratón<sup>102</sup>.

#### **2.3.4.2. Perro**

Con la finalidad de hacer más simple el estudio farmacocinético de la disposición de la dapsona, Pieters y cols.<sup>103</sup>, realizaron estudios en perro (mongrel), ya que dicho modelo animal había demostrado con anterioridad la ausencia de los productos de acetilación polimórfica por citocromo P450 que se presentaban en otros modelos experimentales (humano, conejo, etc) para fármacos como la isoniazida y ciertas sulfonamidas. La ausencia de tales metabolitos se consideró simplificaría la interpretación de la farmacocinética del fármaco principal en el ser humano y de manera prospectiva, permitiría la realización de ciertos modelos experimentales (estudios de depuración renal,

excreción biliar, etc) con mayor facilidad en comparación con especies de mamíferos pequeños.

La dosis estudiada fue de 1 mg/kg de peso y fue administrada por vía intravenosa en un vehículo de solución salina y polietilenglicol 200 en una proporción de 1:1, la vida media promedio obtenida en este estudio fue de 11.7 horas. Como lo esperaban demostraron que el perro no tiene la capacidad de acetilar el fármaco y además encontraron una baja capacidad desacetiladora al administrar monoacetildapsona a una dosis de 1.2 mg/kg por la misma vía (i.v) al calcular una vida media de 6.5 horas para la monoacetildapsona, la cual es significativamente menor a la de la dapsona. En cuanto a la unión del fármaco y del metabolito a las proteínas plasmáticas, se encontraron porcentajes de unión de 71 y 84% para la dapsona y la monoacetildapsona respectivamente, tales observaciones fueron confirmadas tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>103</sup>.

A finales de los años ochenta, Pieters y Zuidema<sup>4</sup>, obtuvieron la biodisponibilidad absoluta de una dosis de 100 mg de dapsona administrada por vía oral en forma de tableta de la dapsona en perros y humanos comparada contra 100 mg administrados por vía intravenosa por medio de una infusión en solución salina fisiológica y etanol. En este experimento se demostró una biodisponibilidad oral casi completa con valores de área bajo la curva de entre los 56.1 y los 99.2 mg\*h/l en perros y de entre 24.0 y 75.4 mg\*h/l en los voluntarios humanos. La vida media de eliminación en perros estuvo en un rango de 5.8 a 10.2 horas (consistente con el estudio en perros mongrel de 1975 por Peters y cols.) y de 15.6 a 30.4 horas en los seres humanos<sup>4</sup>.

#### **2.3.4.3. Ratas**

Fue en 1975 que Gordon y cols.<sup>104</sup>, llevaron a cabo estudios en ratas de las cepas Lewis y Buffalo, tratando de obtener los mismos parámetros que en los estudios previos realizados en otras especies por el mismo grupo de investigadores.



La dapsona fue administrada por vía intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg y 5 mg/kg de peso en una solución con un vehículo de solución salina (0.9 %) y polietilenglicol 200 en un proporción 1:1.

No hubo una diferencia significativa en el valor de vida media calculado entre las especies, la cual se encontró entre las 5 y las 6.8 horas. También se reportó que en ambas cepas, las hembras tenían una mayor capacidad de acetilar la dapsona que los machos, ya que al medir el porcentaje de dapsona acetilada a monoacetildapsona, se hallaron valores de entre 43 y 62% en las hembras contra valores de entre 28 y 31% en los machos.

En cuanto a los estudios de unión a proteínas de plasma, se halló que en las ratas que recibieron la dosis de 5 mg/kg de dapsona y 5.8 mg/kg de monoacetildapsona, se alcanzaron valores de unión del 72 y 91% respectivamente, observación *in vivo* que fue posteriormente corroborada en *in vitro*. En comparación con los datos obtenidos previamente en otros modelos experimentales, Gordon, consideró que el modelo en rata para observar la absorción, distribución y metabolismo, resultaba de utilidad para la predicción de algunos parámetros clínicos en seres humanos<sup>104</sup>.

Helton y cols.<sup>105</sup>, obtuvieron la biodisponibilidad absoluta y relativa en ratas Sprague-Dawley macho de 4 formulaciones de dapsona, una solución oral y tres formulaciones para su administración por vía dérmica, dicho experimento tenía como finalidad la caracterización del perfil concentración-tiempo de nuevas formulaciones propuestas para el tratamiento de desórdenes dermatológicos. Los resultados del análisis farmacocinético no compartamental de los datos obtenidos en este experimento se hallan resumidos en la tabla 2.

**Tabla 2.** Comparativo de los parámetros farmacocinéticos no-compartamentales para ratas administradas con una dosis única intravenosa en bolo, una dosis única oral o una dosis única por vía dérmica de dapsona<sup>105</sup>.

Vía de administración	Dosis DDS (mg/kg)	AUC <sub>0-24 h</sub> (ng*h/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng*h/ml)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	t <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	% Biodisponibilidad
Intravenosa <sup>a</sup>	12	37,741	38,323	10,474		4.27	
Oral	12	29,296	29,947	4,890	1	4.38	78.1
Dérmica (1% en 10% de DGME)	12	25.9	62.2	1.62	6	28.4	0.16
Dérmica (1% en 25de DGME)	12	77.7	94.9	5.56	6	8.42	0.25
Dérmica (5 en 25de DGME)	60	260.8	1,507	12.8	8	77.8	0.79

<sup>a</sup> CL = 313 ml/h/kg y V<sub>d</sub> = 1,582 ml/h/kg para una dosis intravenosa en bolo

### 2.3.4.5. Otras especies

Estudios han demostrado que los conejos acetilan la dapsona de manera polimórfica, tal como lo hace el hombre, desacetilan la monoacetildapsona en una pequeña proporción y presenta una alta unión a proteínas tanto del fármaco como del metabolito monoacetilado, sin embargo a diferencia del hombre, exhiben tiempos de vida media demasiado cortos de 1 y 2 horas para la dapsona y la monoacetildapsona respectivamente<sup>106</sup>.

Limitados estudios han sido realizados en dos especies de primates no-humanos, mono *rhesus* y mono araña. En el mono rhesus se halló una alta capacidad acetiladora de la dapsona y una pobre desacetilación de la monoacetildapsona, mientras que el perfil inverso se presentaba en el mono araña. Los valores de vida media para la dapsona y la monoacetildapsona fueron de 2 y 4 horas respectivamente en el mono *rhesus*, mientras que en el mono araña se encontró que el valor de vida media para la dapsona y su metabolito monoacetilado era de 7 horas para ambos, en este estudio no se realizó ninguna medición de la unión del fármaco a proteínas plasmáticas.

## 2.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

### 2.4.1. Generalidades

La cromatografía de líquidos comprende todas las técnicas cromatográficas en las que la fase móvil es un líquido. Dentro de ella se hallan desde las más primitivas de cromatografía en papel, en capa fina o en columna abierta, hasta los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

La naturaleza tan diversa de las fases estacionarias y móviles que se pueden emplear en CLAR lleva consigo una gran versatilidad en los mecanismos de separación. Esta versatilidad se ve incrementada por la posibilidad de provocar en el interior de la columna equilibrios secundarios de tipo ácido-base, de formación de pares iónicos, de reparto micelar o de formación de complejos<sup>107</sup>.

La cromatografía de líquidos de alta resolución utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas consiguiendo así separaciones de una gran resolución. Un sistema de CLAR generalmente consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un integrador para el control del sistema y la visualización de los resultados. Actualmente la mayoría de los sistemas tienen además un horno para controlar la temperatura de la columna<sup>108</sup>.

Las fases estacionarias más simples desde un punto de vista conceptual son las basadas en sílice con funcionalidad alquilo nombradas generalmente por la longitud de la cadena alquílica, que se obtienen uniendo mediante un enlace covalente un n-alquilsilano a la superficie de una partícula de sílice.

La eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas de la fase estacionaria

oscila entre las 3 y 10 micrómetros. Al disminuir el tamaño de las partículas se reduce la altura del plato incluso a velocidades de flujo altas<sup>109</sup>.

#### **2.4.2. Columnas**

El equipo de CLAR utilizar generalmente columna de acero o plástico de una longitud de 5 a 30 centímetros y un diámetro interior de 1 a 5 mm. Las columnas son caras y se degradan con facilidad por el polvo o por las partículas de las muestras o del disolvente. Por eso, es recomendable proteger la entrada con una columna corta, la precolumna, que contiene la misma fase estacionaria que la columna analítica. Las partículas finas y solutos que se adsorben con fuerza quedan retenidos en la precolumna, que hay que reemplazar periódicamente<sup>107-109</sup>.

#### **2.4.3. Tipos de relleno**

Pueden dividirse en tres grandes grupos:

##### **A) Fases monoméricas**

Se preparan mediante la reacción de un n-alquildimetil-clorosilano y los grupos silanoles de la superficie de la sílice, dando lugar a una unión covalente a través de un grupo siloxano (Si-O-Si), el resto alquílico "R" suele tener 1, 2, 4, 8 o 18 átomos de carbono, lo que origina fases estacionarias con diferente longitud de cadena hidrocarbonada.

##### **B) Fases oligoméricas**

Si la superficie de la superficie de la sílice está saturada con agua y se emplea un n-alquiltriclorosilano como reactivo, éste reacciona simultáneamente con los grupos silanoles de la sílice y con el agua presente en el medio originando una reacción de entrecruzamiento del silano y la formación de un n-alquilpolímero, que queda unido a la superficie originando un recubrimiento de espesos equivalente a varias monocapas del n-

alquil-derivado. La formación de tal polímero tiene dos consecuencias: la densidad superficial en estas fases es bastante mayor que en las fases monoméricas; y debido al entrecruzamiento del silano, el ordenamiento es también mayor que en las monoméricas.

### **C) Fases poliméricas**

Están constituidas por polímeros sintéticos de los que el más empleado es el copolímero estireno-divinilbenceno. Debido a que en este caso toda la partícula enteramente constituida por polímero, estos rellenos presentan generalmente mayor retención que las fases monoméricas y las oligoméricas y, probablemente, un mayor grado de orden que las anteriormente descritas<sup>107-109</sup>.

#### **2.4.4. Elución**

La fase móvil es generalmente agua con un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc). Con el fin de optimizar la selectividad de la separación pueden emplearse mezclas ternarias o cuaternarias de estos solventes.

Se denomina "serie eluotrópica" a la ordenación de los disolventes de acuerdo con su capacidad relativa para desplazar solutos de un determinado adsorbente. La fuerza eluyente ( $\epsilon^0$ ) es una medida de la energía de adsorción del disolvente, supuesto el valor cero para el sistema pentano/silice pura. Cuanto más polar es el disolvente, mayor es la fuerza eluyente respecto a la sílice en cromatografía de adsorción. Cuanto mayor es la fuerza eluyente del disolvente, tanto más rápidamente se fluirán los solutos de la columna.

La denominación de fase normal o reversa hace alusión a la polaridad relativa de las fases móvil y estacionaria. La cromatografía de adsorción sobre sílice pura es un ejemplo de cromatografía de fase normal, la cual se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar, siendo generalmente el analito de interés una molécula polar, por lo que un disolvente más polar en la fase móvil, tiene un fuerza eluyente mayor.

La cromatografía de fase reversa, que es la más utilizada en la actualidad, se caracteriza por que la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y el disolvente es más polar, siendo el analito de interés generalmente una molécula no polar, por lo tanto, un disolvente menos polar, tiene mayor fuerza eluyente. Se estima que el cincuenta por ciento de las separaciones que se llevan a cabo en cromatografía de líquidos emplean este modo. Este hecho se debe a la comercialización de rellenos específicos para esta modalidad que son estables, reproducibles, de pequeño tamaño de partícula, y que permiten alcanzar una elevada velocidad de transferencia de materia, lo que da lugar a columnas de alta eficacia<sup>107-108</sup>.

#### **2.4.4.1. Tipos de elución**

##### **A) Elución isocrática**

En la elución isocrática, la fuerza eluyente de la fase móvil permanece constante, ya que ni la proporción de disolventes en la fase móvil, ni la velocidad de flujo se modifican durante la separación. Se emplea generalmente cuando los componentes de la muestra tienen factores de retención semejantes.

##### **B) Elución en gradiente**

En las separaciones en gradiente se hace variar el poder de elución de la fase móvil a lo largo del análisis cambiando la composición de la fase móvil que entra en la columna, de acuerdo con un programa preestablecido. La elución en gradiente se emplea en la separación de mezclas complejas, formadas por solutos de naturaleza muy distinta y que poseen un amplio intervalo de factores de retención.

Uno de los criterios que se utilizan para clasificar los gradientes es el número de disolventes que se usan para modificar la fuerza eluyente de la fase móvil. Si son dos los disolventes, uno fuerte y otro débil, el gradiente se denomina binario. A veces se emplean gradientes compuestos por tres (ternario), e incluso cuatro (cuaternario) disolventes

distintos. Sin embargo, el comportamiento de una separación en la que intervienen un elevado número de componentes en la fase móvil es difícil de racionalizar, por lo que la puesta a punto de separaciones de este tipo se lleva a cabo de forma empírica<sup>108</sup>.

#### **2.4.5. Solventes para CLAR**

En CLAR se necesitan solventes de alta pureza para evitar que se degraden por impurezas las columnas, que son también caras y para minimizar el fondo de las señales del detector debido los contaminantes. El solvente debe ser filtrado previamente a su utilización para impedir el paso de partículas micrométricas; y de ser posible, es recomendable el hacer pasar tanto las muestras como los solventes por una precolumna con la misma fase estacionaria de la columna analítica para evitar la degradación y saturación de ésta. Aún cuando se use una precolumna, se recomienda lavar la columna analítica periódicamente para prolongar su vida. Los solventes utilizados deben ser también purgados previamente, burbujeando helio a través de ellos, aplicando vacío o mediante su desgasificación por sonicación para eliminar el aire disuelto. Las burbujas de aire crean dificultades en el sistema de bombeo además de crear señales “fantasma” en algunos tipos detectores.

#### **2.4.6. Inyección**

##### **2.4.6.1. Bombas y válvulas de inyección**

La misión del sistema de bombeo es proporcionar a la columna un flujo de fase móvil controlado, reproducible y constante. Además, las bombas empleadas en CLAR deben cumplir las siguientes condiciones: estar construidas con un material inerte a la fase móvil, poder trabajar a presiones elevadas y suministrar flujos adecuados al diámetro de la columna empleada y libre de pulsaciones para no disminuir la sensibilidad de la detección. Las bombas pueden clasificarse en neumáticas y eléctricas, dependiendo de si el origen de la fuerza motriz es un gas comprimido o un motor eléctrico. Las más empleadas en CLAR son las eléctricas y, dentro de ellas, las alternativas o recíprocas.

La reducción de de las variaciones de flujo se ha abordado de diferentes modos. Las fluctuaciones del flujo disminuyen con el empleo de bombas con múltiples cabezas. El caso más común es utilizar bombas de doble pistón en las que el desplazamiento de estos está desfasado 180°, de tal manera que mientras un pistón está enviando líquido a la columna, la cámara del otro se está llenando. De esta manera se reducen considerablemente las pulsaciones de la bomba, aunque no se anulan totalmente. Los flujos que debe proporcionar el sistema de bombeo dependen del tipo de columna con el que se trabaje. Las bombas más usuales, empleadas con columnas analíticas, suelen permitir el trabajo en varios  $\mu\text{l}/\text{min}$  y decenas de  $\text{ml}/\text{min}$ <sup>108</sup>.

#### **2.4.6.2. Sistemas de inyección**

El procedimiento empleado para introducir la muestra en la columna tiene una gran importancia. Tanto el volumen inyectado como la anchura de la zona en que se introduce la muestra deben de ser reproducibles. El sistema de inyección debe de ser capaz de introducir la muestra en la columna en una zona lo más estrecha posible ya que esta anchura es un factor determinante de la que van a tener los picos a su paso por el detector. Además, el inyector debe de ser capaz de ser de fácil manejo y capaz de trabajar a presiones elevadas sin producir fugas<sup>108</sup>.

Dentro de los sistemas de inyección hay que distinguir las válvulas de inyección y los inyectores automáticos.

##### **2.4.6.2.1. Válvulas de inyección**

El sistema de introducción de muestras más generalizado es la válvula de inyección, generalmente de seis vías. En la figura 4, se encuentra representado el esquema de funcionamiento de una válvula de seis vías con loop externo. Dos de las vías, las correspondientes a las posiciones 1 y 4 se encuentran conectadas entre sí por el loop. En la fase de carga, con ayuda de una jeringa se introduce la muestra en el loop a presión ambiente mientras la fase móvil pasa por la columna. Para realizar la inyección se gira el



rotor de la válvula de modo que, impulsada por la fase móvil, la muestra contenida en la espira pasa al interior de la columna. Estas válvulas son muy reproducibles (Coeficiente de variación de aprox 0.5 %) y permiten trabajar a presiones elevadas. Su desventaja respecto a las de tipo jeringa es su mayor precio<sup>107-108</sup>.

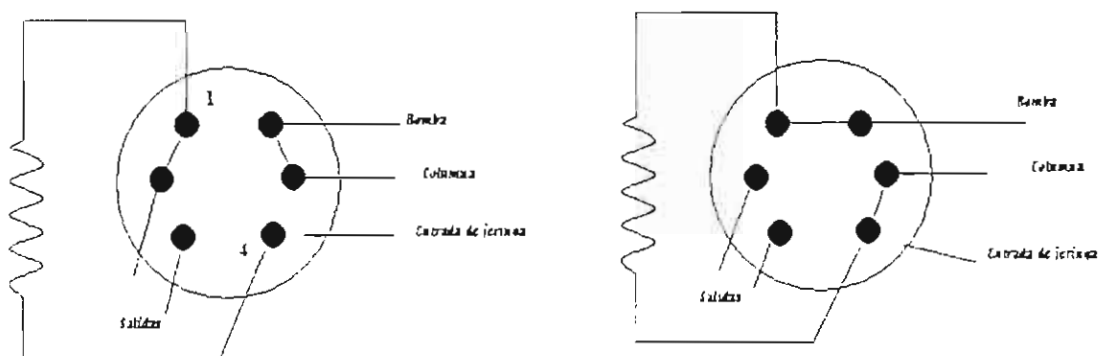


Figura 4. Esquema de funcionamiento de una válvula de seis vías con loop externo

#### 2.4.6.2.2. Inyectores automáticos

El precio es aún más elevado para los inyectores automáticos, estando justificado su uso para análisis de rutina con elevado número de muestras o en sistemas automatizados de optimización de procesos. La mayoría de estos inyectores están basados en el empleo de una válvula de inyección controlada por un sistema robótico. Además de la elevada repetibilidad y comodidad de uso, estos sistemas permiten la adición automática de reactivos en la muestra y el control de temperatura de inyección.

#### 2.4.7. Detectores

En la elección del detector hay que tener en cuenta las características que afectan a la respuesta obtenida, como son el ruido, la deriva, la zona lineal, la selectividad y la sensibilidad y las que afectan a la eficacia de la separación, como son el volumen de celda y la electrónica. Los sistemas de detección más empleados en CLAR son los de absorbancia ultravioleta, fluorescencia, índice de refracción y electroquímicos.

#### **2.4.7.1 Detector de absorbancia ultravioleta-visible**

Son los detectores más utilizados en CLAR, se utilizan para cuantificar analitos que cuentan con dobles enlaces en su estructura. En este tipo de detectores, la luz emitida por una lámpara pasa por un monocromador o un filtro para seleccionar una longitud de onda y llega a la celda del detector por la que está pasando la muestra eluída de la columna; la intensidad de luz transmitida se mide con una fotocelda.

Los sistemas más simples de detección ultravioleta utilizan un intenso haz de emisión a 254 nm de una lámpara de mercurio. Los instrumentos más versátiles tienen lámparas de deuterio, xenón o volframio, y un monocromador, con el que se puede elegir la longitud de onda óptima, de ultravioleta o visible, para detectar los analitos estudiados<sup>107</sup>.

Un sistema de arreglo de diodos registra todo el espectro de cualquier soluto que pasa por el detector. Los detectores de gran calidad tienen intervalos de escala completa desde 0.0005, a 3 unidades de absorbancia. En la escala más sensible, una absorbancia 0.0005, daría una señal del 100 %, con un nivel de ruido del 1 % de fondo de escala. Los detectores de ultravioleta están indicados para elución de gradiente, y para disolventes que no absorben a la longitud de onda de trabajo.

#### **2.4.7.2 Detectores de fluorescencia**

Los detectores de fluorescencia excitan el analito con un láser, y miden la fluorescencia que se origina. Estos detectores son muy sensibles, pero responden solo a los analitos que presentan fluorescencia. Para aumentar la utilidad de los detectores de fluorescencia, se pueden enlazar covalentemente al analito, grupos fluorescentes o electroactivos. Este proceso de derivatización se puede llevar a cabo en la muestra antes de hacer la cromatografía, o añadiendo los reactivos al eluato entre la columna y el detector (derivatización postcolumna).

Los detectores de fluorescencia más sencillos emplean una fuente de luz y un sistema de filtros, uno para la excitación y otro para la emisión. Por el contrario, los espectrofotómetros fluorescentes permiten elegir la longitud de onda de selección y de emisión, así como obtener los espectros de excitación y de emisión<sup>109</sup>.

### **2.4.7.3. Detector electroquímico**

Un detector electroquímico responde a analitos que pueden oxidarse y reducirse, como fenoles, aminas aromáticas, peróxidos, mercaptanos, cetonas, aldehídos, nitrilos conjugados, compuestos halogenados o nitroaromáticos.

Los detectores electroquímicos responden a sustancias que son oxidables o reducibles, midiéndose la corriente entre los electrodos en función del potencial eléctrico aplicado. Generalmente se aplica un voltaje constante, por lo que se habla de detectores amperométricos. La celda de medida de estos detectores consta de un electrodo de trabajo, uno auxiliar y uno de referencia. Alojados en una celda de pequeño volumen. Los electrodos pueden ir montados paralelos al canal por donde pasa el eluyente de la columna o, como en el caso de las celdas "wall-jet", de tal forma que el eluyente choque directamente con el electrodo. El electrodo de trabajo, que es sobre el que se realiza la oxidación o la reducción, se fabrica de diferentes materiales, como platino, oro, mercurio o pasta de carbón. Este último ha sido muy utilizado debido a su bajo precio y a su baja corriente residual, pero es soluble en algunos disolventes y está sujeto a cambios en su superficie, por lo que ha sido sustituido por los de carbón vítreo<sup>107-109</sup>.

## **2.5. Validación de un método analítico**

La existencia de métodos analíticos selectivos y sensibles para la evaluación cuantitativa de fármacos y de sus metabolitos es crítica para la conducción exitosa de estudios farmacológicos preclínicos, biofarmacéuticos y/o clínicos.

La validación de un método bioanalítico incluye todos los procedimientos para demostrar que un método en particular utilizado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, como sangre, plasma, suero u orina, es confiable y reproducible para el uso para el cual fue diseñado. Los parámetros fundamentales para la validación de un método analítico incluyen la evaluación de su exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y su estabilidad<sup>110</sup>.

La validación de un método analítico involucra la documentación a través de pruebas específicas de laboratorio, que demuestran que las características del montaje del método son adecuadas y confiables para las aplicaciones analíticas deseadas. La aceptabilidad de los datos analíticos corresponde directamente al criterio utilizado para la validación del método<sup>111-112</sup>.

### **2.5.1. Tipos de validación**

Los diferentes tipos y niveles de validación, son caracterizados de la siguiente manera:

#### **A) Validación completa**

- Una validación completa es importante cuando se desarrolla e implementa un método bioanalítico por primera vez.
- Una validación completa es importante cuando se estudia una nueva entidad química farmacológica.
- Una validación completa del ensayo revisado es importante si son añadidos metabolitos a un ensayo existente para su cuantificación.

## **B) Validación parcial**

Las validaciones parciales son modificaciones de métodos bioanalíticos ya validados. La validación parcial puede ir desde un pequeño intra-ensayo para determinar su exactitud y precisión hasta una validación casi completa. Los cambios típicos en un método bioanalíticos que caen en esta categoría incluyen (sin estar limitados solamente a estos):

- Transferencia de un método bioanalítico entre laboratorios y analistas.
- Cambios en la metodología analítica (ej., cambio de detector).
- Cambios de matriz biológica dentro de la misma especie (ej., plasma humano a orina humana).
- Cambio en los procedimientos para el procesamiento de muestras.
- Cambio de especies en la misma matriz (ej., plasma de rata a plasma de ratón).
- Cambios relevantes en el intervalo de concentración.
- Cambios en los instrumentos de medición y/o su plataforma de software.
- En caso de contar con volúmenes de muestra limitados (ej., estudios pediátricos).
- Trabajos en matrices raras.
- Demostración de la selectividad de un analito en la presencia de medicamentación concomitante.
- Demostración de un analito en presencia de metabolitos específicos<sup>110-111</sup>.

### **2.5.2. Etapas de una validación**

El proceso por el cual un método bioanalítico específico es desarrollado, validado y utilizado en el análisis rutinario de muestras, puede ser dividido en:

#### **2.5.2.1. Preparación del estándar de referencia**

El análisis de fármacos y de sus metabolitos en una matriz biológica es llevado a cabo utilizando muestras a las cuales se añade el estándar de calibración (referencia) y muestras de control de calidad. Por lo que un estándar de la sustancia de referencia de

identidad y pureza conocida debe ser utilizado para la preparación de las soluciones de concentración conocida.

Existen tres tipos de estándares de referencia que son usualmente utilizados:

- A) Estándares de referencia certificados
- B) Estándares de referencia provistos comercialmente obtenidos de una fuente comercial de reputación.
- C) Otros materiales de pureza documentada, pueden ser sintetizados por un laboratorio analítico u otro establecimiento no comercial.

La fuente, el número de lote, la fecha de expiración, los certificados de análisis cuando se hallen disponibles y/o la evidencia interna o externamente generada de su identidad y pureza deben ser suministrados para cada estándar de referencia<sup>110-111</sup>.

#### **2.5.2.2. Desarrollo del método analítico**

La fase de desarrollo de un método y de su establecimiento define el ensayo químico. Los parámetros fundamentales para la validación de un método bioanalítico son exactitud, precisión, selectividad y estabilidad. Las mediciones para cada analito en la matriz biológica deben ser validadas. Además la estabilidad de muestras añadidas con el analito debe de ser determinada.

El desarrollo y establecimiento típico de un método incluye la determinación de los siguientes parámetros:

##### **A) Selectividad**

Se define como la habilidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. Sustancias que son potenciales

interferencias en una matriz biológica incluyen: componentes endógenos de la matriz biológica, metabolitos, productos de descomposición, medicación concomitante y otros xenobióticos exógenos. Si se intentan cuantificar más de un analito, cada analito debe ser evaluado con la finalidad de asegurar que no existe interferencia alguna.

### **B) Exactitud**

La exactitud de un método analítico describe la cercanía estadística de los valores obtenidos por el método en una prueba con el valor verdadero de la concentración del analito. La exactitud es determinada por la réplica de análisis de muestras que contienen cantidades conocidas del analito.

### **C) Precisión**

La precisión de un método analítico describe la cercanía de las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a múltiples alícuotas de un volumen homogéneo de matriz biológica. La precisión puede ser evaluada con pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad se refiere a la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones realizadas bajo las mismas condiciones.

La reproducibilidad (intralaboratorio) se refiere a la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

## **D) Recuperación**

Se denomina recuperación de un ensayo a la respuesta obtenida por una cantidad de analito añadido y extraído de la matriz biológica, comparada con la respuesta del detector obtenida a partir de la concentración nominal del estándar puro. La recuperación del analito no necesita ser de 100 %, pero la recuperación de un analito debe ser consistente, preciso y reproducible en tres niveles de concentración (bajo, medio y alto).

## **E) Curva de calibración**

Una curva estándar de calibración es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. Una curva de calibración debe ser generada para cada analito en la muestra. Un suficiente número de estándares debe ser utilizado para definir adecuadamente la relación entre las respuestas y las concentraciones. La curva de calibración debe ser preparada en la misma matriz biológica de las muestras a analizar mediante la adición del analito en concentraciones conocidas a la matriz. El número de estándares utilizados en la construcción de la curva debe estar en función del rango de valores analíticos anticipados y de la naturaleza de la relación analito-respuesta, mientras que las concentraciones de los estándares deben ser escogidas de acuerdo al intervalo de concentraciones que se espera encontrar en un determinado estudio<sup>6,111-113</sup>.

Cada curva de calibración debe consistir de una muestra blanco (matriz biológica procesada libre de analito) y de acuerdo a la Norma oficial mexicana 177-SSA1998 debe contar con a menos 5 concentraciones distintas cada una sin incluir la muestra blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del intervalo de trabajo escogido<sup>6</sup>.

El modelo más simple que describa matemáticamente la relación concentración-respuesta debe ser utilizado, siendo necesario que dicha relación sea continua y reproducible a lo largo del rango de trabajo.



El límite inferior de cuantificación se define como el estándar más bajo en la curva de calibración que debe ser aceptado como el límite de cuantificación, siempre y cuando su respuesta sea identificable, discreta y reproducible con una precisión de al menos del 20 % de coeficiente de variación y una exactitud de entre el 80 y el 120 % de desviación absoluta con respecto a su valor nominal.

Adicionalmente debe determinarse el límite de detección del método, el cual se refiere a la concentración a la cual la señal del analito en la matriz biológica, puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés sin cumplir con requisitos de precisión y exactitud.

#### **F) Estabilidad**

La estabilidad de un fármaco en un fluido biológico es una función de las condiciones de almacenaje, las propiedades químicas del fármaco, la matriz biológica y el sistema de contención. La estabilidad de un analito en cierta matriz y en un sistema de contención determinado es solo relevante para esa matriz y ese sistema de contención y por ningún motivo debe extrapolarse a otras matrices y sistemas de contención.

Los procedimientos de estabilidad deben evaluar la estabilidad de los analitos durante la colección de la muestra y su manipulación, posterior a un almacenaje a largo (bajas temperaturas) y corto término (temperatura ambiente) y posterior a su procesamiento analítico y a ciclos de congelación-descongelación. Las condiciones empleadas en los experimentos deben reflejar situaciones similares a las de manipulación, análisis y almacenaje de actual uso y el procedimiento debe también incluir una evaluación del analito en solución stock<sup>6,110-113</sup>.

#### **2.5.2.3. Aplicación del método validado al análisis rutinario de fármacos**

El análisis de todas las muestras del analito en una matriz biológica determinada, debe ser completado en el periodo de tiempo para el cual se hallan disponibles los datos de

estabilidad. En general, las muestras biológicas pueden ser analizadas con una determinación única sin análisis por duplicado, si el método tiene una variabilidad aceptable los cual se define por los datos de la validación.

Una vez que el método analítico ha sido establecido para un uso rutinario, su exactitud y precisión deben ser monitoreadas regularmente para asegurar que el método es llevado a cabo satisfactoriamente<sup>111-113</sup>.

### III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a las necesidades planteadas por el descubrimiento de nuevas indicaciones terapéuticas para la dapsona, se han desarrollado formas farmacéuticas novedosas (solución oral, suspensión oral e inyectable parenteral) de las cuales es importante estudiar sus parámetros farmacocinéticos de manera preclínica. Es por ésta razón que el estudio propuesto plantea las siguientes cuestiones:

- 1.- ¿Cuál es el perfil concentración-tiempo en plasma de la dapsona administrada en su forma de inyectable por vía intravenosa y en sus formas orales de solución y suspensión en ratas Wistar macho adultas?
- 2.- ¿Cuáles son los principales parámetros farmacocinéticos de las formulaciones propuestas y cuál es la biodisponibilidad relativa y absoluta de las formulaciones orales?.

## IV.- HIPÓTESIS

- Las formulaciones farmacéuticas orales propuestas de solución y suspensión tendrán una biodisponibilidad absoluta similar o superior a lo reportado en el antecedente directo de Helton y cols., en su estudio realizado en el año 2000, de 80 % de biodisponibilidad promedio estimada<sup>105</sup>.
- Existen diferencias en los parámetros farmacocinéticos de concentración máxima ( $C_{max}$ ) y tiempo máximo de absorción ( $t_{max}$ ) de la dapsona administrada por vía oral, debidas a la formulación farmacéutica (suspensión o solución).

## V.- OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- Determinar los parámetros farmacocinéticos de 4 nuevas formas farmacéuticas, solución oral, suspensión oral y solución parenteral inyectable (formulaciones A y B) de dapsona en ratas Wistar macho adultas.

### 5.2. Objetivos específicos

- Implementar y validar un método analítico para la determinación de dapsona en plasma sanguíneo por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de acuerdo a la norma oficial mexicana 177-SSA1-1998<sup>6</sup>.
- Caracterizar el perfil concentración–tiempo de cada una de las formulaciones propuestas después de su administración en ratas Wistar macho adultas.
- Obtener los principales parámetros farmacocinéticos de cada una de las formulaciones propuestas y calcular la biodisponibilidad relativa y absoluta de las formas farmacéuticas orales (solución y suspensión), mediante el modelaje matemático no compartamental.

## **VI.- MÉTODOS**

### **6.1. Validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.**

#### **6.1.1. Descripción del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.**

El método utilizado para la determinación de dapsona en las muestras de plasma sanguíneo fue el desarrollado por Zuidema y cols.<sup>5</sup>. Para realizar el procesamiento de cada muestra se sigue el siguiente procedimiento:

A) Se toman 100  $\mu$ l de plasma (muestra o curva), se desproteinizan con 10  $\mu$ l de ácido perclórico y se agitan por 30 segundos.

B) Se agregan 10  $\mu$ l de una solución saturada de carbonato de potasio y se agita la mezcla por 30 segundos nuevamente.

C) Se agregan 80  $\mu$ l de fase móvil (16% ACN y 84 % Ac. Acético al 1.5 % p/v) ajustada a un pH de 4.5 y se agita la mezcla por 30 segundos.

D) La muestra se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 minutos.

E) Se retira el sobrenadante obtenido, se filtra con membrana millipore y se inyectan al cromatógrafo 50  $\mu$ l. La corrida analítica se realiza a 2.0 ml/min a una longitud de onda de 275 nm con una sensibilidad de 0.02.

### 6.1.2. Reactivos y equipos

#### Reactivos

- Acetonitrilo, Mallinckrodt ChromAR (100%)
- Ácido acético glacial, Merck (96 %)
- Dapsona, Sigma (99.97 %)
- Hidróxido de sodio, Técnica Química (97 %)
- Ácido perclórico, J.T. Baker (60-62%)
- Carbonato de potasio, Merck (99%)
- Agua desionizada
- Plasma sanguíneo

#### Equipo

- Detector UV-Vis Perkin-Elmer mod. LC-95
- Columna C<sub>18</sub> Alltech, Lichrosorb de 25 cm por 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 micras
- Integrador Chrom-jet, Thermo Separation Products
- Bomba isocrática para cromatografía de líquidos Perkin-Elmer mod. 250
- Potenciómetro Metrohm Herisau E532
- Balanza analítica, Sartorius mod. BP11025
- Sonicator, Branson mod. 2210
- Centrifuga, Beckman mod. J-21C

### 6.1.3. Pruebas de validación

La validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma sanguíneo por cromatografía de líquidos de alta resolución se llevó a cabo de acuerdo a la norma oficial mexicana número 177-SSA1-1998 <sup>6</sup>, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y los requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

Se llevó a cabo la validación una vez establecidas las condiciones analíticas y se realizaron las pruebas que se describen a continuación:

### **A) Selección del intervalo de trabajo**

Se estableció el intervalo en función de las concentraciones plasmáticas de dapsona esperadas. Se eligieron siete concentraciones (0.130, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0  $\mu\text{g/ml}$ ) distintas cada una sin incluir las muestras conteniendo puntos intermedios en común e incluyendo el límite de cuantificación y la concentración máxima del rango.

### **B) Linealidad y precisión del sistema**

Para evaluar la linealidad y precisión del sistema, se prepararon de manera independiente, tres curvas de calibración de dapsona en fase móvil en el rango de 0.130 a 8  $\mu\text{g/ml}$ .

Por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados se determinó la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de regresión (r). Se considera que la respuesta del detector a las concentraciones del compuesto en el rango de trabajo es lineal si el coeficiente de regresión (r) es mayor o igual a 0.99.

Para evaluar la precisión del sistema, se emplearon los datos de linealidad, para los cuales el coeficiente de variación del factor de respuesta debe ser igual o menor al 15 %.

### **C) Recuperación absoluta**

Se analizaron por triplicado tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (0.3, 1.5 y 7.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente) de dapsona en plasma sanguíneo, dentro del rango de trabajo escogido, y se compararon los resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones preparadas en fase móvil y se obtuvo porcentaje de estas razones. De acuerdo a la norma oficial mexicana, la recuperación no debe ser necesariamente del 100 %, pero si debe ser reproducible en cada uno de los niveles.

#### **D) Linealidad del método analítico**

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon de manera independiente, tres curvas de calibración de dapsona en fase móvil, en el rango de 0.130 a 8  $\mu\text{g/ml}$ , y por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados se determinó la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de regresión (r), considerando que la respuesta del detector a las concentraciones del compuesto en el rango de trabajo es lineal si el coeficiente de regresión ( r ) es mayor o igual a 0.99.

#### **E) Límite de cuantificación del método analítico**

Se analizó por decuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. De acuerdo a la norma oficial mexicana<sup>6</sup>, se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del 20% del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

#### **F) Límite de detección del método analítico**

Se determinó matemáticamente la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

#### **G) Precisión del método analítico**

##### **G.1.- Repetibilidad**

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (0.3, 1.5 y 7.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente) de dapsona en plasma sanguíneo. Estas concentraciones fueron diferentes a las de la curva de calibración, pero se incluyen en el rango de trabajo. El coeficiente de variación debe ser igual o menor que el 15% de acuerdo a los parámetros establecidos por la norma oficial mexicana.



## **G.2.- Reproducibilidad intralaboratorio**

Se analizaron por duplicado durante tres días, tres concentraciones conocidas: baja, media y alta (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml respectivamente) de dapsona en plasma sanguíneo. Estas concentraciones fueron diferentes a las de la curva de calibración, pero incluidas en el rango de trabajo. De acuerdo a lo establecido por la norma oficial mexicana<sup>6</sup> el coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

## **H) Exactitud del método analítico**

Se calculó valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos obtenidos en la pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, los cuales de acuerdo a la norma oficial mexicana<sup>6</sup>, deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

## **I) Estabilidad del analito**

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Para ello se evaluó la respuesta de la concentración de la dapsona en el plasma sanguíneo, en muestras preparadas por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml respectivamente), considerando las siguientes pruebas:

### **I.1.- Condiciones de almacenamiento**

Se evaluó la estabilidad de la dapsona en el plasma sanguíneo en las diferentes condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis. Las condiciones de almacenamiento evaluadas en esta prueba fueron: 24 horas a temperatura ambiente, 10 días a -20°C, 30 días a -70 °C y 24 horas a 8°C tras su procesamiento para análisis.

## **I.2.- Ciclos de congelación-descongelación**

Se evaluó la estabilidad la dapsona al congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida (0.3, 1.5 y 7.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente) en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación.

Para considerar que el compuesto de interés es estable en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad que establece la norma oficial mexicana<sup>6</sup>.

## **6.2. Estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar macho adultas.**

Además de los reactivos y el equipo necesario para el procesamiento y análisis de las muestras de plasma obtenidas mencionado en el apartado 6.1.2., se requirieron:

- Éter etílico (J.T. Baker), heparina sódica y solución salina fisiológica (Pisa Farmacéutica Mexicana S.A. de C.V.)
- Cánula PE 10 de diámetro interno de 0.28 mm y un diámetro externo de 0.61 mm (marca Clay Adams, Parsippany, NJ, USA).
- Cánula PE-50 de un diámetro interno de 0.58 mm y un diámetro externo de 0.96 mm (marca Clay Adams, Parsippany, NJ, USA).
- Material quirúrgico.
- Cepos
- Suturas de nylon 4-0, catgut 3-0 (Atramat, Internacional Farmacéutica S.A. de C.V.) y seda negra 2-0 (Matsed, Matcur, S.A. de C.V.).
- Micrófuga Beckman mod. 11.
- Formulaciones farmacéuticas (solución oral, suspensión e inyectables intravenosos A y B).

### **6.2.1. Descripción del estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar macho adultas**

#### **A) Animales**

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho de 200-250 g de peso. El alimento fue retirado 15 horas antes del inicio de cada experimento y hasta 16 horas después de la toma de la primera muestra de sangre, pero se permitió a los animales la libre ingesta de agua.

#### **B) Formulaciones farmacéuticas**

La dapsona para las formulaciones utilizadas durante el estudio, fue generosamente donada por el laboratorio Representaciones Mex-América, S. A. de C. V. y las 4 formulaciones utilizadas fueron desarrolladas la Facultad de Estudios Superiores, campus Cuautitlán.

Tanto la solución oral, como la formulación A de la solución intravenosa, están preparadas con etanol, propilenglicol, alcohol bencílico y agua. La formulación B de la solución intravenosa, además de los componentes antes mencionados, contenía Tween 80.

La forma farmacéutica de suspensión para su administración oral, fue preparada con carboximetilcelulosa, sacarosa, etanol y agua.

#### **C) Manipulación quirúrgica**

##### **C.1.- Grupos administrados con solución oral y suspensión**

Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico, para implantar quirúrgicamente un catéter de polietileno fabricado con una combinación de cánula PE 10 de diámetro interno de

0.28 mm y un diámetro externo de 0.61 mm y de cánula PE-50 de un diámetro interno de 0.58 mm y un diámetro externo de 0.96 mm, en la arteria caudal para la recolección de las muestras sanguíneas en las cuales se determinó la concentración de dapsona por cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo al método modificado de Zuidema y cols.<sup>5</sup>. Tanto la solución oral como la suspensión, fueron administradas a cada rata mediante una cánula por vía oral

### **C.2.- Grupos administrados con solución parenteral**

En las ratas a las que se administró la solución intravenosa, además de implantar el catéter en la arteria caudal para la toma de muestras, se implantó 24 horas antes del experimento, un catéter para la administración de la solución parenteral en la vena femoral lo suficientemente largo para hacerlo pasar por debajo de la piel dorsal y sacarlo por un pequeño orificio en la piel hecho a la altura de la nuca del animal para evitar que pudiera morderlo o arrancarlo.

### **D) Diseño del estudio**

Se formaron 4 grupos aleatorios (uno por cada forma farmacéutica) de 12 ratas Wistar macho cada uno. En todos los casos la dosis administrada fue de 12.5 mg/kg de peso. Se tomaron muestras sanguíneas de 300 µl para obtener tras su separación a 4,000 rpm durante 10 minutos en la microcentrífuga aproximadamente entre 150 y 175 µl de plasma, los cuales fueron procesados de acuerdo al método cromatográfico utilizado para la determinación de la concentración en plasma del fármaco en estudio. Las muestras de sangre fueron tomadas a las 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 16 y 24 horas después de la administración del fármaco. Las muestras de plasma sanguíneo fueron separadas inmediatamente y congeladas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

## E) Análisis farmacocinético y estadístico

Se hizo el análisis no compartimental de los datos obtenidos experimentalmente con el software WINNONLIN v.2.0, obteniendo los parámetros farmacocinéticos de concentración máxima ( $C_{max}$ ), tiempo de absorción máxima ( $t_{1/2}$ ), constante de eliminación ( $\lambda_z$ ), volumen de distribución aparente ( $V_d$ ), depuración ( $Cl$ ), área bajo la curva del tiempo cero a las 24 horas ( $ABC_{0-24}$ ), área bajo la curva del tiempo cero a tiempo infinito ( $ABC_{0-\infty}$ ).

La biodisponibilidad absoluta fue calculada mediante la fórmula:

$$F = \left( \frac{ABC_{0-\infty}^{ORAL}}{ABC_{0-\infty}^{IV}} \right) \times 100$$

y la biodisponibilidad relativa de las formulaciones orales fue calculada mediante la fórmula:

$$F = \left( \frac{ABC_{0-\infty}^{SUSPENSION}}{ABC_{0-\infty}^{SOLUCION}} \right) \times 100$$

La comparación estadística de los parámetros de absorción, se realizó con el software S.P.S.S. v.13.0.

## F) Condiciones del análisis cromatográfico de las muestras

Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de las muestras de plasma obtenidas durante el estudio, son las mencionadas en el apartado 5.1.1. (Columna analítica Alltech, Lichrosorb de 250 mm de largo, 4.6 mm de diámetro interno y partículas de 5 micras, fase móvil con 16 % de acetonitrilo y 84 % de ácido acético al 1.5% p/v y pH de 4.5, velocidad de flujo de 2.0 ml/min, longitud de onda de detección UV de 275 nm y una sensibilidad del detector de 0.02).

## VII.- RESULTADOS

### 7.1. Validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.

#### 7.1.1. Linealidad del sistema

Se obtuvo un coeficiente de correlación de superior a 0.99 (Tabla 3, figura 5.) en el rango de trabajo de 0.130 a 8.0 µg/ml y un coeficiente de variación inferior al 15 % entre las repeticiones de cada uno de los niveles de concentración de la curva de calibración. Un cromatograma típico del analito en fase móvil se muestra en la figura 6.

Tabla 3. Linealidad del sistema.

CONCENTRACIÓN NOMINAL DE DSS (µg/ml)	ÁREAS BAJO LA CURVA			DESV. EST.	C.V. (%)
0.130	39,882	42,179	35,378	3,459.67	8.84
0.25	72,469	77,321	74,140	2,464.85	3.30
0.50	140,308	145,065	147,752	3,769.66	2.61
1.00	258,821	282,574	309,048	25,125.78	8.86
2.00	586,320	603,249	630,060	22,055.26	3.63
4.00	1,180,269	1,241,265	1,213,526	30,539.57	2.54
8.00	2,425,573	2,534,194	2,462,213	55,260.41	2.23
<b>b =</b>	<b>-11,419.62</b>				
<b>m =</b>	<b>309,223.72</b>				
<b>r =</b>	<b>0.9996</b>				

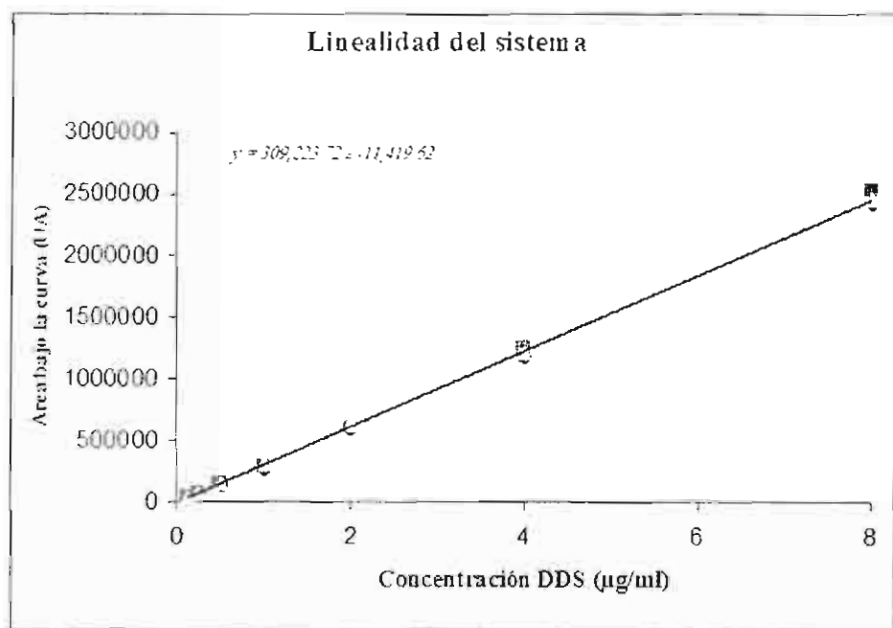


Figura 5. Linealidad del sistema



Figura 6. Cromatograma típico del analito en fase móvil, Tiempo de retención=  $5.24 \pm 0.16$  min (% CV=0.32 para n=10 inyecciones).

### 7.1.2. Linealidad del método

Los parámetros de regresión lineal de la curva de calibración preparada por triplicado en la matriz biológica (figura 7.) se hallan en la tabla 4, donde se puede observar un coeficiente de regresión superior a 0.99. Además el coeficiente de variación de las repeticiones de cada uno de los niveles de concentración de la curva no excede el 15 % como lo establece la norma oficial mexicana. El cromatograma típico del analito en matriz biológica se muestra en la figura 8.

Tabla 4. Linealidad del método analítico.

CONCENTRACIÓN NOMINAL DDS ( $\mu\text{g/ml}$ )	ÁREA BAJO LA CURVA			PROMEDIO	DESV. EST.	C.V. (%)
0.130	14,618	16,103	14,062	14,927.67	1,055.15	7.07
0.25	24,878	25,112	28,999	26,329.67	2,314.67	8.79
0.5	50,964	48,753	46,853	48,856.67	2,057.46	4.21
1.00	107,480	99,848	127,173	111,500.33	14,099.16	12.64
2.00	195,341	195,952	193,693	194,995.33	1,168.50	0.60
4.00	395,561	396,779	387,297	393,212.33	5,158.90	1.31
8.00	798,423	829,751	772,300	800,158.00	28,764.77	3.59
<b>b =</b>	<b>1611.48</b>					
<b>m =</b>	<b>99414.33</b>					
<b>r =</b>	<b>0.9991</b>					



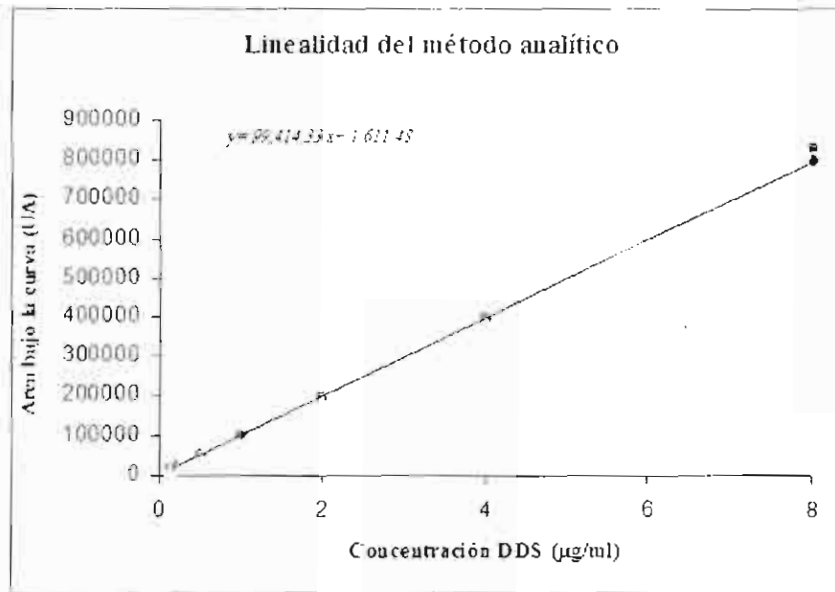


Figura 7. Linealidad del método analítico



Figura 8. Cromatograma típico del analito en matriz biológica, Tiempo de retención =  $5.26 \pm 0.026$  min (% CV=0.50 para n=10 inyecciones).

### 7.1.3. Recuperación absoluta

En la evaluación de la recuperación absoluta del método analítico se obtuvieron porcentajes de recobro de 76.62, 82.22 y 76.63 para los niveles de concentración de 0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml respectivamente (Tabla 5). La prueba estadística de análisis de varianza realizada con el software S.P.S.S. v13.0 para comparar la media de los tres niveles de concentración a una significancia de 0.05 indica con un valor de calculado de p de 0.533 (Tabla 6), por lo que se asume que no existe diferencia entre los porcentajes de recobro de ninguno de los niveles de concentración evaluados. Las soluciones en fase móvil, se prepararon a la mitad de la concentración de las muestras preparadas en plasma, ya que después de su procesamiento analítico, las muestras en matriz biológica duplican su volumen, ya que por cada 100 µl de plasma se agregan 10 µl de ácido perclórico, 10 µl de solución de carbonato de potasio saturada y 80 µl de fase móvil (ver apartado 6.1.1.).

Tabla 5. Resultados de la prueba de recuperación absoluta.

CONCENTRACIÓN EN FASE (µg/ml)	ÁREA BAJO LA CURVA	CONCENTRACIÓN EN PLASMA	ÁREA BAJO LA CURVA
0.15	47,534	0.3	36,049
	47,545		33,985
	42,294		35,224
PROMEDIO ± D.E.	45,791 ± 2,472.76		35,086 ± 848.26
PORCENTAJE DE RECOBRO	76.62		
0.75	199,102	1.5	179,562
	204,730		169,217
	205,789		152,437
PROMEDIO ± D.E.	203,207 ± 2,934.69		167,072 ± 11,177.12
PORCENTAJE DE RECOBRO	82.22		
3.5	902,570	7.0	737,358
	969,443		752,041
	987,496		701,698
PROMEDIO ± D.E.	953,169.67 ± 36,530.56		730,365.67 ± 21,138.81
PORCENTAJE DE RECOBRO	76.63		

Tabla 6. Resultados de la prueba de ANOVA para la prueba de porcentaje de recobro.

ANOVA					
Porcentaje de recobro					
	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado de las medias	F	Sig.
Entre grupos	60.370	2	30.185	700	533
Dentro de los grupos	258.702	6	43.117		
Total	319.072	8			

#### 7.1.4. Límite de cuantificación

La norma oficial mexicana, no define la manera de determinar el límite de detección del método, solo verifica si el límite inferior del rango de trabajo escogido, es un correcto límite de cuantificación, en cuanto a parámetros de precisión y exactitud. La repetición por decuplicado del nivel más bajo de concentración de la curva de calibración (0.130 µg/ml), dio como resultado un coeficiente de variación de 7.16%. De acuerdo a la definición matemática que permite calcular el límite de cuantificación como diez veces la desviación estándar del límite inferior de la curva de calibración, se obtuvo un límite de cuantificación de 0.0969 µg/ml (Tabla 7).

Tabla 7. Límites de cuantificación y detección.

RÉPLICA	CONCENTRACIÓN (µg/ml)
1	0.1208
2	0.1269
3	0.1451
4	0.1463
5	0.1431
6	0.1435
7	0.1247
8	0.1264
9	0.1406
10	0.1357
<b>PROMEDIO</b>	<b>0.1353</b>
<b>DESV. EST.</b>	<b><math>9.69 \times 10^{-03}</math></b>
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN (3σ)</b>	<b>0.0291</b>
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (10σ)</b>	<b>0.0969</b>
<b>COEFICIENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>7.16</b>

## 7.1.5. Precisión del método

### 7.1.5.1. Repetibilidad

Se obtuvieron en la prueba de repetibilidad, coeficientes de variación inferiores al 15 % establecido como límite por la norma oficial mexicana (4.31, 8.06 y 2.73 % para los niveles de concentración de 0.3, 1.5 y 7.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente). Tabla 8.

Tabla 8. Repetibilidad del método analítico

CONCENTRACIÓN NOMINAL ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.3	1.5	7.0
RÉPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ( $\mu\text{g/ml}$ )		
1	0.3064	1.4695	7.0203
2	0.3281	1.4301	7.2063
3	0.2911	1.6218	7.4358
4	0.3134	1.4796	7.0461
5	0.3077	1.7265	7.4172
PROMEDIO	<i>0.3093</i>	<i>1.5455</i>	<i>7.2251</i>
DESV. EST.	<i>0.0133</i>	<i>0.1245</i>	<i>0.1972</i>
C.V. (%)	<i>4.31</i>	<i>8.06</i>	<i>2.73</i>

### 7.1.5.2. Reproducibilidad

Coefficientes de 6.47, 6.60 y 4.38% para los niveles de 0.3, 1.5 y 7.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente como se muestra en la tabla 9, fueron obtenidos de la medición por triplicado de cada nivel durante tres días diferentes. Tales coeficientes no rebasan el límite establecido por la norma oficial mexicana.

Tabla 9. Reproducibilidad intralaboratorio del método analítico.

CONCENTRACIÓN NOMINAL ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.3	1.5	7.0
DIA-REPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ( $\mu\text{g/ml}$ )		
1-1	0.3548	1.4434	7.4542
1-2	0.3024	1.4542	7.6780
1-3	0.3577	1.5772	7.3447
2-1	0.3191	1.7604	7.3620
2-2	0.2984	1.6565	7.5095
2-3	0.3108	1.4879	7.0039
3-1	0.3337	1.5340	6.6242
3-2	0.3243	1.6236	7.2144
3-3	0.3343	1.6177	7.0509
<b>PROMEDIO</b>	<b>0.3262</b>	<b>1.5728</b>	<b>7.2491</b>
<b>DESV. EST.</b>	<b>0.0211</b>	<b>0.1039</b>	<b>0.3176</b>
<b>C.V.(%)</b>	<b>6.47</b>	<b>6.60</b>	<b>4.38</b>

### 7.1.6. Exactitud del método analítico

El porcentaje de desviación absoluta resultante de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, fue inferior a 9% como se resume en la tabla 10, cumpliendo con los parámetros establecidos por la norma oficial mexicana (15% como máximo).

Tabla 10. Exactitud del método analítico

<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>0.3</b>	<b>1.5</b>	<b>7.0</b>
	<b>CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>		
<b>PROMEDIO REPETIBILIDAD</b>	0.3093	1.5455	7.2251
<b>PROMEDIO REPRODUCIBILIDAD</b>	0.3262	1.5728	7.2491
<b>% DESVIACIÓN ABSOLUTA REPETIBILIDAD</b>	<i>3.10</i>	<i>3.03</i>	<i>3.22</i>
<b>% DESVIACIÓN ABSOLUTA REPRODUCIBILIDAD</b>	<i>8.73</i>	<i>4.85</i>	<i>3.56</i>

### 7.1.7. Estabilidad del analito

#### 7.1.7.1. Prueba de estabilidad a Temperatura ambiente por 24 horas

La prueba de estabilidad en triplicados de muestras conservadas por 24 horas a temperatura ambiente, presentó coeficientes de variación de 8.67, 4.49 y 2.18 para los niveles de concentración de 0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml respectivamente contra muestras por triplicado preparadas y procesadas el mismo día de su análisis (Tabla 11). Tales coeficientes se encuentran por debajo del límite del 15 % establecido por la norma oficial mexicana al igual que los porcentajes de desviación absoluta obtenidos para cada nivel de concentración evaluada.

Tabla 11. Estabilidad de muestra a temperatura ambiente.

CONCENTRACIÓN NOMINAL (µg/ml)	0.3	1.5	7.0
CONDICIONES DE ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (µg/ml)		
MISMO DÍA DE PREPARACIÓN	0.3548	1.4434	7.4554
	0.3024	1.4542	7.6780
	0.3577	1.5772	7.3447
24 HRS DESPUÉS DE PREPARACIÓN A T. AMBIENTE	0.3431	1.4503	7.5650
	0.2898	1.4612	7.7913
	0.3459	1.5863	7.4524
PROMEDIO	0.3323	1.4954	7.5478
DESV. EST.	0.0288	0.0671	0.1646
C.V. (%)	8.67	4.49	2.18
% DESV. ABS	10.76	0.30	7.83

CONCENTRACIÓN NOMINAL (µg/ml)	CONDICIONES DE ANÁLISIS		
	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (µg/ml)		
	0.3	1.5	7.0
TIEMPO 0 (MISMO DÍA DE SU PREPARACION)	0.3171	1.4779	6.9198
	0.3119	1.4474	6.8870
	0.2815	1.3934	6.8877
10 DÍAS DESPUÉS A -70°C	0.3509	1.4626	7.0038
	0.3572	1.6108	6.8056
	0.3534	1.4470	7.6268
	0.3517	1.4338	6.8845
20 DÍAS DESPUÉS A -70°C	0.3496	1.4919	6.7311
	0.3343	1.4090	6.7822
	0.3061	1.6223	7.4569
	0.3459	1.6605	7.6137
30 DÍAS DESPUÉS A -70°C	0.3208	1.6039	7.3326
PROMEDIO	0.3317	1.5050	7.0776
DESV. EST.	0.0240	0.0929	0.3329
C.V. (%)	7.23	6.18	4.70
% DESV. ABS	10.56	0.33	1.11

Tabla 12. Estabilidad de la muestra a -70°C.

7.1.7.2. Prueba de estabilidad a -70°C por 30 días

La prueba de estabilidad a -70°C durante 30 días con lecturas de las muestras en intervalos de 10 días, permite observar coeficientes inferiores al 7% en todos los niveles de concentración analizados (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml) al ser comparado contra muestras preparadas y analizadas el mismo día (Tabla 12). De igual manera, el porcentaje de desviación absoluta en ninguno de los niveles rebasa el 15% establecido por la norma oficial mexicana. La tendencia de la media de los tres niveles de concentración evaluados se muestra en la figura 9.



### 7.1.7.2. Prueba de estabilidad a -70°C por 30 días

La prueba de estabilidad a -70°C durante 30 días con lecturas de las muestras en intervalos de 10 días, permite observar coeficientes inferiores al 7 % en todos los niveles de concentración analizados (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml) al ser comparado contra muestras preparadas y analizadas el mismo día (Tabla 12). De igual manera, el porcentaje de desviación absoluta en ninguno de los niveles rebasa el 15 % establecido por la norma oficial mexicana. La tendencia de la media de los tres niveles de concentración evaluados se muestra en la figura 9.

Tabla 12. Estabilidad de la muestra a -70 °C.

CONCENTRACIÓN NOMINAL (µg/ml)	0.3	1.5	7.0
CONDICIONES DE ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (µg/ml)		
TIEMPO 0 (MISMO DÍA DE SU PREPARACIÓN)	0.3171	1.4779	6.9198
	0.3119	1.4474	6.8870
	0.2815	1.3934	6.8877
10 DÍAS DESPUÉS A -70°C	0.3509	1.4626	7.0038
	0.3572	1.6108	6.8056
	0.3534	1.4470	7.6268
20 DÍAS DESPUÉS A -70°C	0.3517	1.4338	6.8845
	0.3496	1.4919	6.7311
	0.3343	1.4090	6.7822
30 DÍAS DESPUÉS A -70°C	0.3061	1.6223	7.4569
	0.3459	1.6605	7.6137
	0.3208	1.6039	7.3326
PROMEDIO	0.3317	1.5050	7.0776
DESV. EST.	0.0240	0.0929	0.3329
C.V. (%)	7.23	6.18	4.70
% DESV. ABS	10.56	0.33	1.11

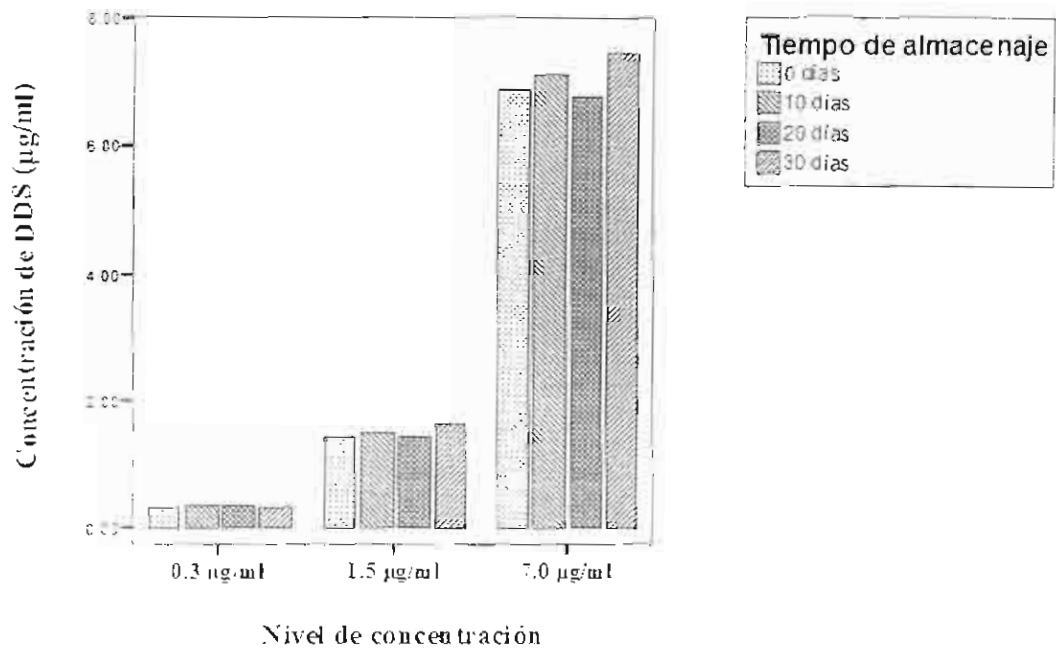


Figura 9. Tendencia de la concentración media de los tres niveles evaluados en la prueba de estabilidad de almacenaje a -70°C durante 30 días.

### 7.1.7.3. Prueba de estabilidad de la muestra 24 horas después de su procesamiento a 8 °C

Los coeficientes de variación para los niveles de concentración evaluados (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml) en la prueba de estabilidad a 8 °C de muestras procesadas 24 horas antes, al igual que los porcentajes de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración como se muestra en la tabla 13, fueron menores al 15 % que establece la norma oficial mexicana al ser comparadas contra muestras procesadas y analizadas el mismo día.

Tabla 13. Estabilidad de la muestra a 8°C 24 horas después de su procesamiento.

CONCENTRACIÓN NOMINAL (µg/ml)	0.3	1.5	7.0
CONDICIONES DE ANÁLISIS	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (µg/ml)		
MISMO DÍA DE SU PREPARACIÓN	0.3337	1.5340	6.6242
	0.3243	1.6236	7.2144
	0.3343	1.6177	7.0509
24 HORAS DESPUÉS DE SU PROCESAMIENTO	0.2785	1.2643	5.7959
	0.2938	1.1335	5.9326
	0.2925	1.3891	5.9817
PROMEDIO	<i>0.3095</i>	<i>1.4270</i>	<i>6.4333</i>
DESV. EST.	<i>0.0241</i>	<i>0.2003</i>	<i>0.6146</i>
C.V. (%)	<i>7.80</i>	<i>14.033</i>	<i>9.5541</i>
% DESV. ABS	<i>3.16</i>	<i>4.87</i>	<i>8.10</i>

#### 7.1.7.4. Prueba de ciclos de congelación-descongelación a -20°C

Ni los coeficientes de variación ni los porcentajes de desviación absoluta obtenidos para los tres niveles de concentración evaluados (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml) al analizar muestras por duplicado durante 5 ciclos de 48 horas de congelación descongelación y compararlas contra un duplicado de cada nivel de concentración preparado y analizado el mismo día rebasaron el 15 % establecido como límite por la norma oficial mexicana como se puede ver en la tabla 14. La tendencia en la concentración del analito durante esta prueba puede observarse en la figura 10.

Tabla 14. Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación descongelación.

CONCENTRACIÓN NOMINAL (µg/ml)	0.3	1.5	7.0
CONDICIONES	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (µg/ml)		
TIEMPO 0	0.3027 0.3662	1.5083 1.5935	7.1363 6.9189
1 <sup>er</sup> CICLO DE 48 HRS	0.2997 0.3625	1.5400 1.6870	8.1475 7.7731
2 <sup>o</sup> CICLO DE 48 HRS	0.3338 0.3390	1.6185 1.4662	7.6583 7.5768
3 <sup>er</sup> CICLO DE 48 HRS	0.2891 0.3125	1.6154 1.4934	7.1546 6.8234
5 <sup>o</sup> CICLO DE 48 HRS	0.3339 0.3132	1.3520 1.3581	6.4773 6.6705
10 <sup>o</sup> CICLO DE 48 HRS	0.3164 0.3293	1.3968 1.3633	6.3666 6.4061
PROMEDIO	0.3249	1.4993	7.0924
DESV. EST.	0.0239	0.1149	0.5873
C.V. (%)	7.35	7.67	8.28
% DESV. ABS	8.30	0.05	1.32

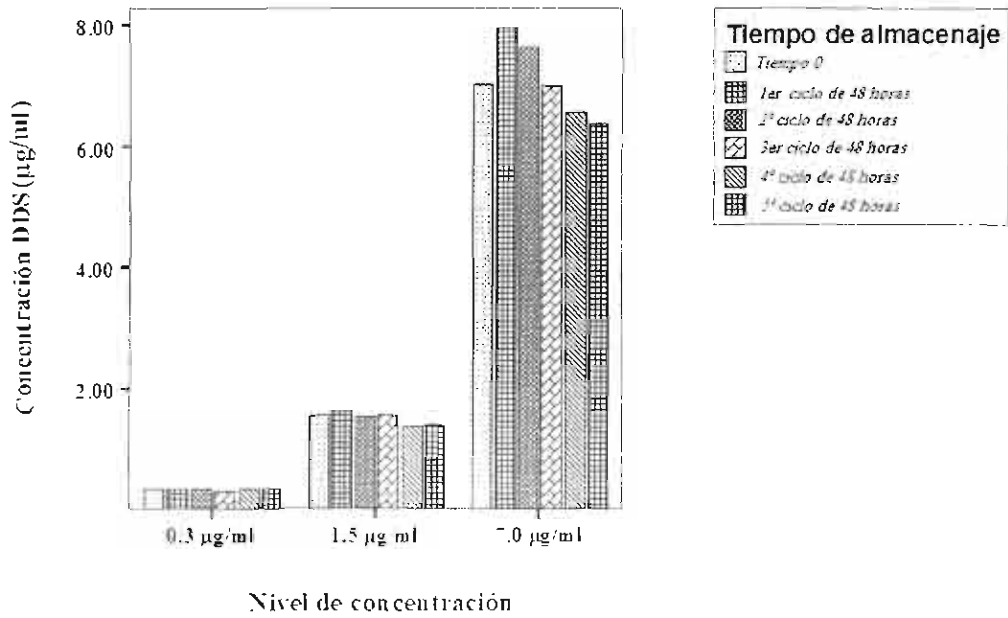


Figura 10. Tendencia de la media de los tres niveles de concentración evaluados en la prueba de congelación-descongelación

## 7.2. Estudio farmacocinético del perfil concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar macho adultas

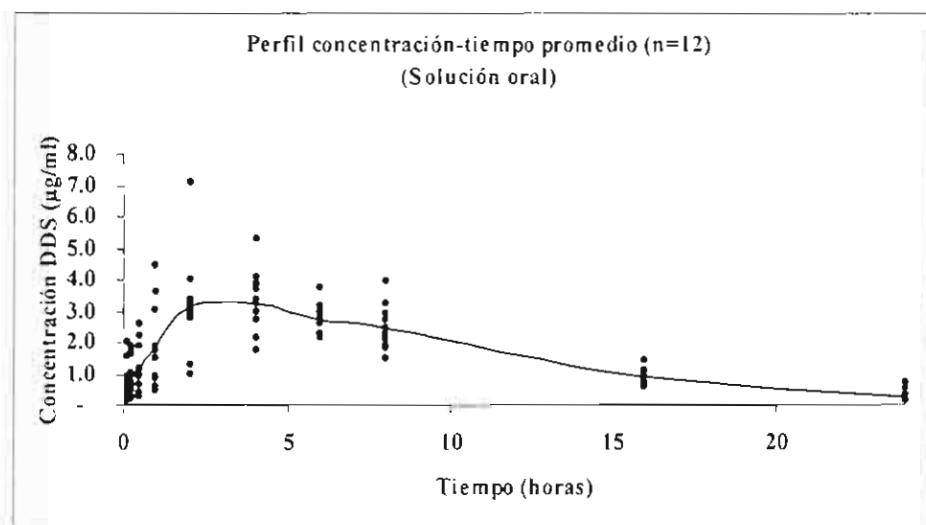
### 7.2.1 Perfil concentración-tiempo de la forma farmacéutica de solución oral

En la tabla 15 se resumen los datos promedio de los perfiles concentración-tiempo obtenidos de las 12 ratas Wistar macho a las que se les administró la solución oral. El perfil concentración-tiempo promedio obtenido experimentalmente se halla ilustrado en la figura 11.

Tabla 15. Datos del perfil concentración-tiempo promedio de la forma farmacéutica del grupo al cual se le administró la solución oral de dapsona.

Tiempo (horas)	Concentración promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Error estándar	Intervalo de confianza Lím. inf.- Lím. sup. ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.1	0.79	0.721	0.217	0.3090-1.2782
0.25	0.91	0.591	0.178	0.5159-1.3096
0.5	1.15	0.748	0.226	0.6515-1.6558
1.0	1.87	1.293	0.390	1.0039-2.7416
2.0	3.14	1.586	0.478	2.0760-4.2076
4.0	3.26	1.042	0.314	2.5561-3.9567
6.0	2.73	0.512	0.154	2.3895-3.0778
8.0	2.45	0.719	0.217	1.9703-2.9369
16.0	0.91	0.229	0.069	0.7599-1.0674
24.0	0.29	0.171	0.051	0.1751-0.4049

A)



B)

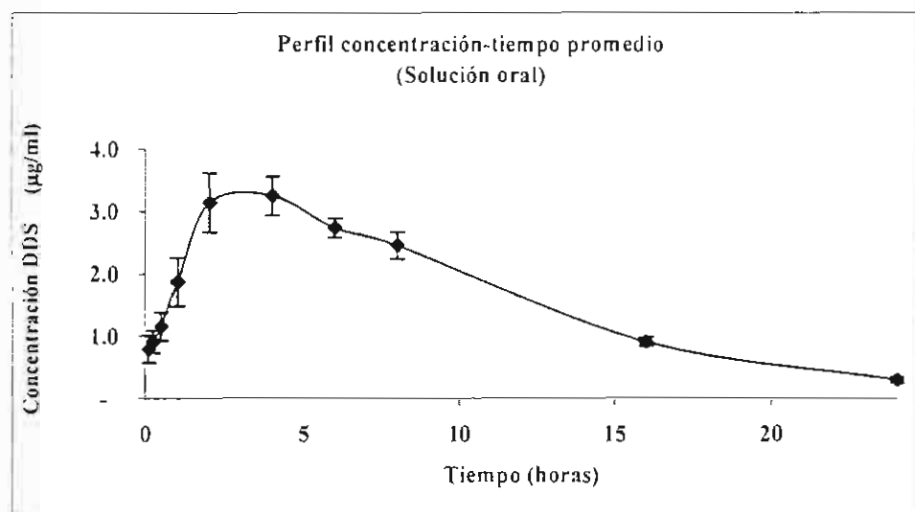


Figura 11. Perfil concentración-tiempo promedio de la solución oral de dapsona. La figura 11-A, muestra la dispersión experimental de los datos de los perfiles individuales obtenidos. La figura 11-B, muestra las medias de cada punto de muestreo  $\pm$  el error estándar de la media con su respectivo ajuste.

### 7.2.2. Perfil concentración-tiempo de la forma farmacéutica de suspensión

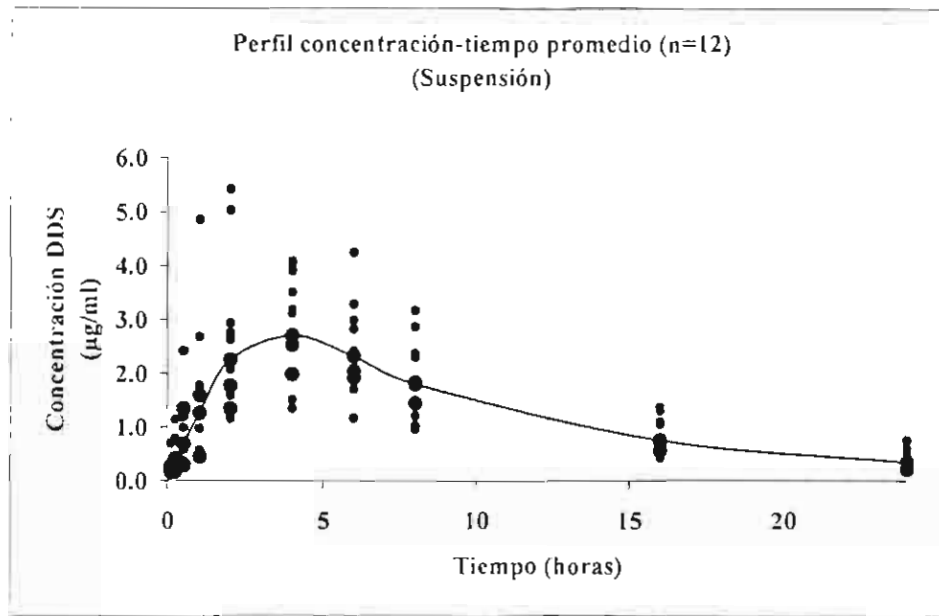
Los datos promedio obtenidos de las 12 ratas del grupo experimental al cual se le administró la forma farmacéutica de suspensión, se hallan en la tabla 16. El perfil concentración-tiempo promedio obtenido experimentalmente, se halla ilustrado en la figura 12.

Tabla 16. Datos del perfil concentración-tiempo promedio del grupo al cual se le administró la forma farmacéutica de suspensión de dapsona.

Tiempo (horas)	Concentración promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Error estándar	Intervalo de confianza Lím. inf.- Lím. sup. ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.1	0.22	0.067	0.020	0.1510-0.3654
0.25	0.39	0.320	0.097	0.2110-0.6126
0.5	0.68	0.743	0.224	0.3431-1.2387
1.0	1.26	1.517	0.458	0.5191-2.3191
2.0	2.25	1.297	0.391	1.5609-3.5246
4.0	2.70	1.046	0.315	2.1461-3.5212
6.0	2.31	1.093	0.329	1.7009-2.9628
8.0	1.80	0.861	0.260	1.3961-2.4111
16.0	0.75	0.293	0.088	0.6245-1.0537
24.0	0.34	0.149	0.045	0.2466-0.4916



A)



B)

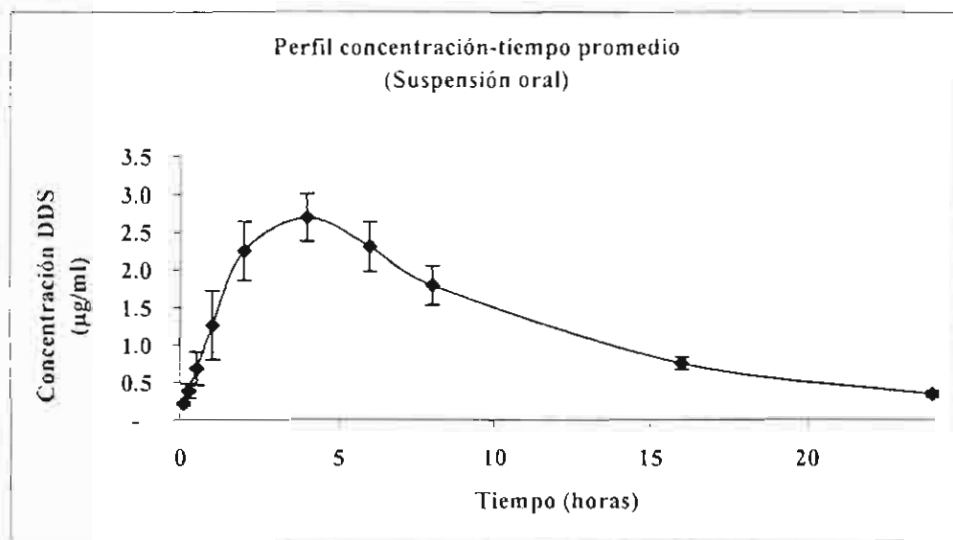


Figura 12. Perfil concentración-tiempo promedio de la forma farmacéutica de suspensión de dapsona. La figura 12-A, muestra la dispersión experimental de los datos de los perfiles individuales obtenidos. La figura 12-B, muestra las medias de cada punto de muestreo  $\pm$  el error estándar de la media con su respectivo ajuste.

### 7.2.3. Perfil concentración-tiempo de la forma farmacéutica de solución intravenosa

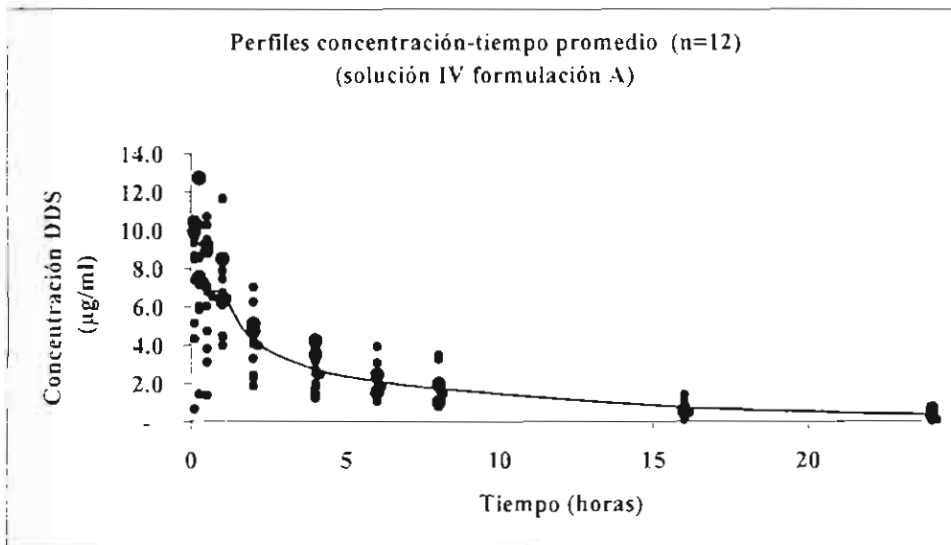
#### 7.2.3.1. Formulación A

Las concentraciones promedio del perfil obtenido para el grupo experimental de ratas Wistar macho al cual se administró la formulación A de la forma farmacéutica de solución intravenosa, se hallan resumidos en la tabla 17. El perfil concentración-tiempo promedio obtenido experimentalmente, se halla ilustrado en la figura 13.

Tabla 17. Datos del perfil concentración-tiempo promedio del grupo al cual se administró la forma farmacéutica de la solución intravenosa (formulación A) de dapsona.

Tiempo (horas)	Concentración promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Error estándar	Intervalo de confianza Lím. inf.- Lím. sup. ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.1	7.39	3.094	0.933	5.3123-9.4696
0.25	7.57	3.026	0.912	5.5368-9.6032
0.5	6.81	3.188	0.961	4.6661-8.9502
1.0	6.70	2.190	0.660	5.2304-8.1732
2.0	4.23	1.639	0.494	3.1277-5.3305
4.0	2.75	1.134	0.342	1.9835-3.5074
6.0	2.12	0.846	0.255	1.5509-2.6873
8.0	1.72	0.938	0.283	1.0942-2.3549
16.0	0.74	0.396	0.119	0.4766-1.0089
24.0	0.35	0.177	0.053	0.2261-0.4648

A)



B)

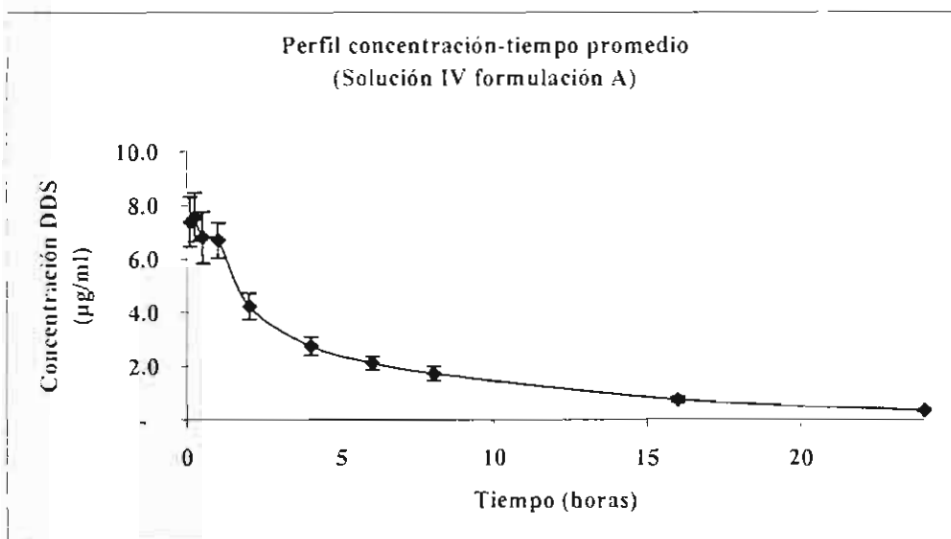


Figura 13. Perfil concentración-tiempo promedio de la forma farmacéutica de solución intravenosa (formulación A) de dapsona. La figura 13-A, muestra la dispersión experimental de los datos de los perfiles individuales obtenidos. La figura 13-B, muestra las medias de cada punto de muestreo  $\pm$  el error estándar de la media con su respectivo ajuste.

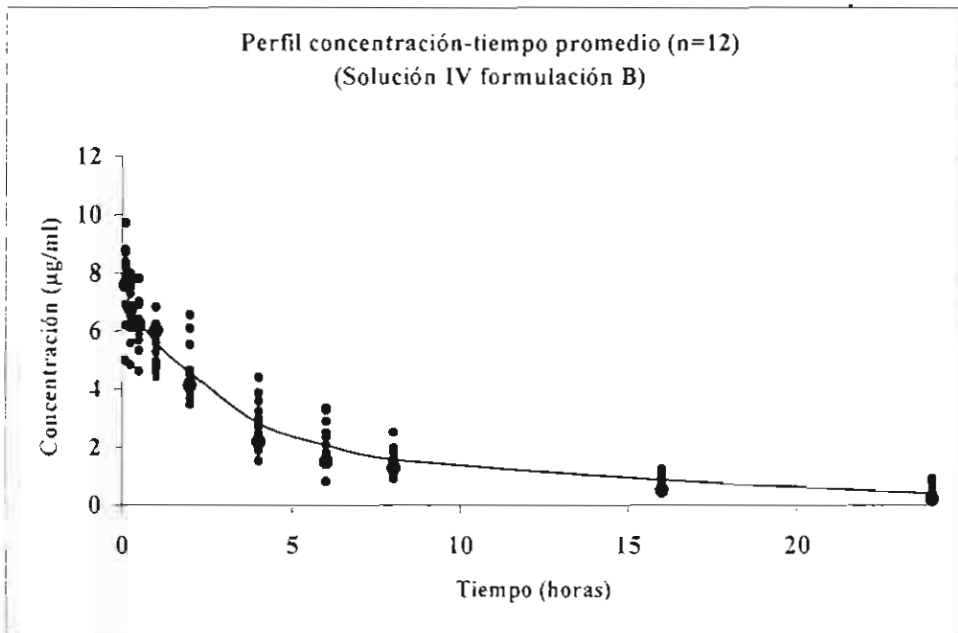
### 7.2.3.2. Formulación B

Se administró a uno de los grupos experimentales una segunda formulación de solución intravenosa (formulación B), cuyos datos obtenidos experimentalmente se muestran en la tabla 18. El perfil concentración-tiempo promedio obtenido experimentalmente, se halla ilustrado en la figura 14.

**Tabla 18.** Datos del perfil concentración-tiempo promedio del grupo al cual se administró la forma farmacéutica de la solución intravenosa (formulación B) de dapsona.

Tiempo (horas)	Concentración promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Desviación estándar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Error estándar	Intervalo de confianza Lím. inf.- Lím. sup. ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.1	7.73	1.257	0.363	6.8623-8.6318
0.25	6.82	0.991	0.286	6.1217-7.5184
0.5	6.38	0.959	0.277	5.7236-7.0725
1.0	5.58	0.737	0.213	5.0256-6.0461
2.0	4.56	0.979	0.283	3.9197-5.2860
4.0	2.81	0.850	0.245	2.2825-3.4479
6.0	2.07	0.794	0.229	1.5726-2.6626
8.0	1.57	0.442	0.128	1.2973-1.9053
16.0	0.87	0.323	0.093	0.6539-1.0882
24.0	0.40	0.260	0.075	0.2378-0.5946

A)



B)

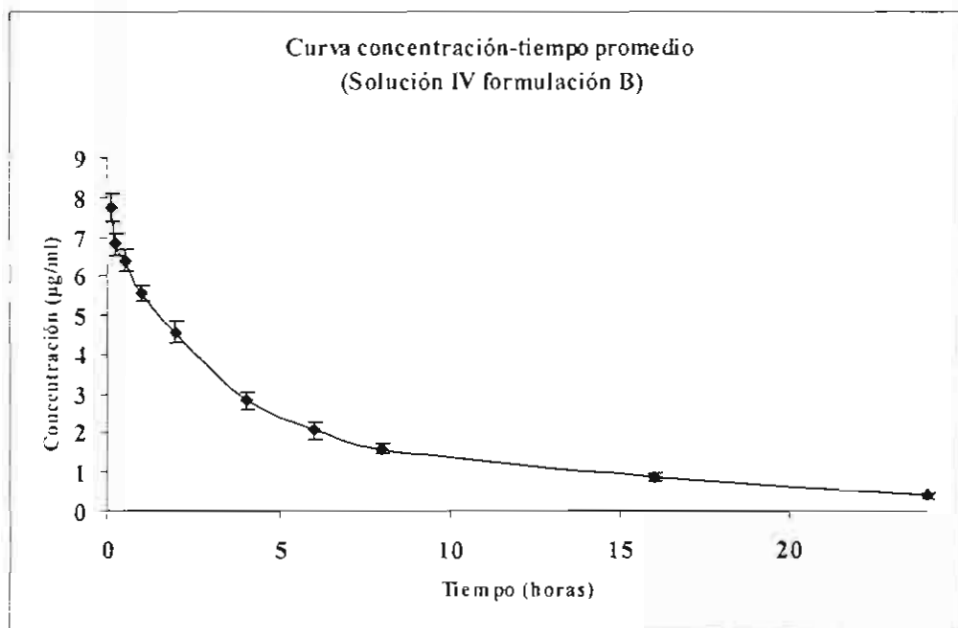


Figura 14. Perfil concentración-tiempo promedio de la forma farmacéutica de solución intravenosa (formulación B) de dapsona. La figura 14-A, muestra la dispersión experimental de los datos de los perfiles individuales obtenidos. La figura 14-B, muestra las medias de cada punto de muestreo = el error estándar de la media con su respectivo ajuste.

#### 7.2.4. Obtención de parámetros farmacocinéticos

Los principales parámetros farmacocinéticos resultantes mediante el análisis no compartimental de los datos experimentales obtenidos para cada uno de los grupos experimentales con el paquete de software WINONLIN v. 2.0 se encuentran resumidos en la tabla 19.

Tabla 19. Principales parámetros farmacocinéticos obtenidos de las formas farmacéuticas estudiadas.

Forma farmacéutica	$t_{max}$ (horas)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lambda z ( $\text{ml} \cdot \text{kg/h}$ )	$t_{1/2}$ (horas)	Vd (l)	Cl (l/h)
Solución oral	3.90	3.90	0.1375	5.27	0.5003	0.0663
Suspensión oral	4.00	3.30	0.1033	7.08	0.7891	0.0762
Inyectable IV (formulación A)	0.0341	9.27	0.1089	7.12	0.6568	0.0606
Inyectable IV (formulación B)	0.1000	7.73	0.1207	5.74	2.3220	0.2803

La biodisponibilidad de las formas farmacéuticas orales obtenida a partir de los datos del área bajo la curva hasta las 24 horas y el área bajo la curva a tiempo infinito con respecto a las soluciones intravenosas A y B se muestran en las tablas 20 y 21 respectivamente.

Tabla 20. Datos de biodisponibilidad oral absoluta de las formulaciones orales con respecto a la formulación A de la solución intravenosa.

Vía de administración	Dosis de DDS ( $\text{mg/kg}$ )	$AUC_{0-24}$ ( $\text{mg} \cdot \text{h/l}$ )	$AUC_{0-\infty}$ ( $\text{mg} \cdot \text{h/l}$ )	% Biodisponibilidad absoluta
Oral (solución)	12.5	39.54	41.98	87.57
Oral (suspensión)	12.5	33.32	37.29	77.79
Intravenosa (formulación A)	12.5	42.43	46.02	-

Tabla 21. Datos de biodisponibilidad oral absoluta de las formulaciones orales con respecto a la formulación B de la solución intravenosa.

Vía de administración	Dosis de DDS (mg/kg)	AUC <sub>0-24</sub> (mg*h/l)	AUC <sub>0-72</sub> (mg*h/l)	% Biodisponibilidad absoluta
Oral (solución)	12.5	39.54	41.98	92.81
Oral (suspensión)	12.5	33.32	37.29	82.44
Intravenosa (formulación B)	12.5	41.92	45.23	-

Para establecer si existe una diferencia significativa en los parámetros de absorción de concentración máxima ( $C_{max}$ ) y tiempo ( $t_{max}$ ) máximo de absorción en los grupos a los cuales se administraron las formulaciones orales (solución y suspensión), se realizó una prueba estadística de U de Mann-Whitney a un 0.05 de confianza con el software SPSS v13.0 para comparar la media de los parámetros de los parámetros mencionados, obteniéndose para el parámetro de concentración máxima una p calculada de 0.533 y 0.782 para el tiempo de absorción máxima (Tablas 22 y 23).

Tabla 22. Resultados de la prueba de Mann-Whitney a 0.05 de confianza para la comparación de la media de la concentración máxima obtenida en los grupos administrados con las formulaciones orales.

	Concentración máxima
Mann-Whitney U	51.000
Z	-.624
Asymp. Sig. (2-tailed)	.533
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.562

**Tabla 23.** Resultados de la prueba de Mann-Whitney a 0.05 de confianza para la comparación de la media del tiempo máximo de absorción obtenido en los grupos administrados con las formulaciones orales.

**Prueba estadística de Mann-Whitney**

	Tiempo máximo
Mann-Whitney U	56.500
Z	-.277
Asymp. Sig. (2-tailed)	.782
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.797

De igual forma para verificar si existe una diferencia significativa en el parámetro de absorción de concentración máxima ( $C_{max}$ ) en los grupos a los cuales se administraron las formulaciones A y B de la solución intravenosa, se realizó una prueba estadística de U de Mann-Whitney a un 0.05 de confianza para comparar la media del parámetro mencionado, obteniéndose una p calculada de 0.782 (Tabla 24).

**Tabla 24.** Resultados de la prueba de Mann-Whitney a 0.05 de confianza para la comparación de la media de la concentración máxima obtenida en los grupos administrados con las formulaciones A y B de la solución intravenosa.

**Prueba estadística de Mann-Whitney**

	Concentración máxima
Mann-Whitney U	48.000
Z	-1.108
Asymp. Sig. (2-tailed)	.268
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.288



## VIII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1. Validación del método analítico para la determinación de dapsona en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución

#### A) Linealidad del sistema y del método

El coeficiente de regresión obtenido, superior a 0.99 en el rango de trabajo escogido (0.130 a 8.0  $\mu\text{g/ml}$ ) indica que la respuesta del detector a las concentraciones de nuestro analito en la fase móvil (sistema) y en la matriz biológica cumple con el ajuste al modelo matemático de una línea recta, es decir que en el rango de concentraciones elegido como el de calibración, la respuesta del detector ultravioleta a la señal de la dapsona es lineal en los tres órdenes de magnitud que incluye la curva de calibración elegida para la validación del método. No existe un efecto observable de la matriz biológica sobre la linealidad de la señal obtenida en cada nivel de concentración. La variabilidad entre las medidas realizadas por triplicado de cada nivel de la curva de calibración medida como coeficiente de variación es en cada uno de los puntos inferior al 15% por ciento, observándose un aumento significativo en el nivel de 1  $\mu\text{g/ml}$  en las curvas preparadas tanto en la fase móvil como en la matriz biológica, tal aumento en el coeficiente de variación probablemente se deba al uso necesario de micropipetas diferentes para preparar los siete niveles de calibración de nuestro rango de trabajo.

#### B) Recuperación absoluta

La norma oficial mexicana<sup>6</sup> no establece un límite en el porcentaje de recobro del analito extraído de la matriz orgánica, sin embargo señala que debe ser constante en tres niveles de concentración diferentes de los puntos de la curva de calibración. En la prueba realizada se obtuvieron porcentajes de recobro de 76.62, 82.22 y 76.63% para los niveles de concentración de 0.3, 1.5 y 7.0  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

La prueba de análisis de varianza de una vía realizada a las medias de los porcentajes de recobro de los tres niveles de concentración evaluadas dio un valor de p calculado de

0.533 a una significancia de 0.05, por lo que se demuestra que las medias de los tres niveles de concentración no difieren entre sí de manera estadísticamente significativa.

### **C) Límite de cuantificación**

La norma oficial mexicana<sup>6</sup>, no especifica ningún método para la determinación del límite de cuantificación del método, tan solo requiere la verificación de la precisión y exactitud del nivel más bajo de concentración de la curva de calibración, estableciendo un coeficiente de variación y una desviación absoluta del 20%. De la medición por decuplicado del punto más bajo de la curva (0.130 µg/ml) se obtuvo un coeficiente de variación inferior al 8%, por lo que de acuerdo a la norma el nivel más bajo de la curva de calibración es adecuado para realizar una cuantificación que cumpla con criterios de precisión y exactitud en dicho nivel. Debido a la ausencia de ruido cuantificable, se estimó el límite de detección como la multiplicación de tres veces la desviación estándar de la medición por decuplicado del nivel más bajo de concentración, obteniendo un valor de 0.0291 µg/ml, el cuál es mucho menor a los 0.130 µg/ml elegidos como el punto más bajo del rango de trabajo.

### **D) Precisión del método**

#### **D.1) Repetibilidad y reproducibilidad**

La evaluación de la precisión del método medida como pruebas de repetibilidad y reproducibilidad a tres niveles de concentración, bajo, medio y alto, diferentes de la curva de calibración, pero incluidos en el rango de trabajo (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml), indica que la medición por quintuplicado de los niveles escogidos sin ninguna variación en las condiciones de trabajo tiene una dispersión aceptable al ser medida como coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración al ser inferior al 15% (8%) establecido como límite por la norma oficial mexicana<sup>6</sup>.

En cuanto a la dispersión de las medidas repetidas realizadas variando una condición de trabajo (el día en que se hicieron las mediciones), no se observa un aumento significativo

en el coeficiente variación, permaneciendo inferior al 7% en cada uno de los niveles de concentración evaluados.

Dado que el método analítico empleado no rebasa el coeficiente de variación del 15 % por ciento en ninguno de los niveles evaluados en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad podemos afirmar que cumple con los criterios de precisión necesarios para la determinación de nuestro analito de interés en la matriz biológica de plasma sanguíneo, incluso al realizar la variación de ciertas condiciones en el método como el día en que se realizan las mediciones.

### **E) Exactitud del método analítico**

Al evaluar la desviación del valor medido experimentalmente comparado al nominal en los tres niveles de concentración bajo, medio y alto, elegidos dentro de la curva de calibración (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml), hallamos que el porcentaje de desviación absoluta calculado por la fórmula:

$$\%DA = \frac{VN - VE}{VN} * 100$$

donde el porcentaje de desviación absoluta (%DA), está dado por la diferencia entre el valor nominal (VN) y el valor experimental obtenido por las mediciones (VE), dividido entre el valor nominal y multiplicado por 100 para expresarlo como porcentaje, es menor en cada uno de los niveles evaluados al 15% (3-9% aprox.) establecido como límite por la norma oficial mexicana<sup>6</sup>, por lo que podemos afirmar sustentándonos en los porcentajes de desviación absoluta obtenidos en nuestras pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, que el método analítico permite mediciones que cumplen con los criterios de exactitud requeridos para la determinación de dapsona en muestras de plasma sanguíneo.

## **F) Estabilidad del analito**

Las diferentes pruebas de estabilidad fueron realizadas con la finalidad de recrear las diferentes condiciones de temperatura y almacenaje a las cuales la muestra de plasma sanguíneo con nuestro analito de interés, puede estar expuesta.

### **F.1) Prueba de estabilidad a Temperatura ambiente por 24 horas**

La prueba de estabilidad del analito a temperatura ambiente por 24 horas, nos permite evaluar si el analito en la muestra conserva sus propiedades fisicoquímicas para ser sometido a su procesamiento y medición después de un "olvido" simulado. Dado que los coeficientes de variación y los porcentajes de desviación absoluta obtenidos en cada uno de los diferentes niveles de concentración evaluados (0.3, 1.5 y 7.0 µg/ml) son inferiores al 15% establecido para cada uno de los parámetros por la norma oficial mexicana, podemos afirmar que en el posible caso de un olvido de la muestra a temperatura ambiente por el periodo máximo de un día, podremos realizar el procesamiento y la medición de la muestra conservando los parámetros requeridos de precisión y exactitud con nuestro método analítico.

### **F.2) Prueba de estabilidad a -70°C por 30 días**

La simulación del requerimiento de análisis o re-análisis de la muestra posterior a un periodo sustancialmente mayor de tiempo, donde se evaluó la estabilidad del analito a -70°C durante un periodo de treinta días (3 ciclos de 10 días cada uno), nos permite observar que no existe evidencia de degradación del analito en la matriz biológica durante el periodo de un mes. Las mediciones realizadas durante este periodo cumplen con la norma oficial mexicana al no rebasar el 15% de coeficiente de variación, ni el 15% de desviación absoluta, por lo que se puede afirmar que después de un mes de almacenaje a -70°C, las muestras pueden ser procesadas y analizadas cumpliendo con los criterios necesarios de precisión y exactitud que exige la normatividad oficial a nuestro método analítico.

### **F.3) Prueba de estabilidad de la muestra 24 horas después de su procesamiento a 8°C**

La prueba de estabilidad del analito en una muestra procesada y posteriormente conservada a 8°C durante el periodo de un día, se hizo con la finalidad de simular la posible necesidad de la postergación del análisis de una muestra tras su procesamiento (por ej. problemas técnicos con el equipo, falta de energía eléctrica, etc). En esta prueba se obtuvieron coeficientes de variación dentro de los límites permitidos por la norma oficial mexicana en cada uno de los niveles de concentración evaluados, lo que nos permite afirmar que el analito en la muestra procesada conserva sus propiedades fisicoquímicas, permitiendo que su análisis con el método analítico implementado, cumpla con los criterios de precisión y exactitud requeridos normativamente hasta 24 horas después ser almacenado a 8°C.

### **F.4) Prueba de ciclos de congelación-descongelación a -20°C**

La necesidad de re-análisis de muestras se simula en la prueba de estabilidad de nuestra muestra a ciclos de congelación-descongelación para la que se establecieron ciclos de 48 horas (horas) y almacenamiento a -20°C. Tal simulación, nos permite apreciar que a los 10 días la muestra puede ser congelada a -20°C y descongelada a temperatura ambiente para procesarse y analizarse en caso de que así se requiera, sin rebasar los criterios establecidos por la norma oficial mexicana de 15% para el coeficiente de variación y 15% por ciento de desviación absoluta en la evaluación de la precisión y exactitud respectivamente del método analítico.

## 8.2 Estudio farmacocinético de los perfiles concentración-tiempo de dapsona en ratas Wistar macho adultas

### 8.2.1. Solución y suspensión orales

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir del análisis no compartimental de los series de datos para cada una de las formulaciones farmacéuticas indican que no existe una diferencia significativa entre las formulaciones de administración oral, ya que su tiempo de absorción máxima es prácticamente de 4 horas para ambas, teniendo además una concentración máxima similar también de entre 3.30 y 3.90  $\mu\text{g/ml}$ .

La constante de eliminación del fármaco ( $\lambda_z$ ) es ligeramente menor en la forma farmacéutica de la suspensión, lo cual explica el que los valores de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), volumen de distribución (Vd) y depuración (Cl), sean superiores en el caso de esta formulación sobre de los valores obtenidos a partir de la solución oral. Es decir, en el caso de la suspensión oral, la rata elimina el 50% de la cantidad de fármaco remanente tras su administración en dos horas más del que elimina el 50% del fármaco remanente administrado en forma de solución.

El volumen de distribución es también mayor en el caso de la forma farmacéutica de suspensión, indicando que el fármaco se halla distribuido en el organismo de la rata en un volumen aparente mayor por casi 300 ml al volumen de distribución calculado para la solución oral.

De manera congruente con los valores de la constante de eliminación obtenidos experimentalmente (0.1  $\text{ml}\cdot\text{kg/h}$  para la suspensión y casi 0.14  $\text{ml}\cdot\text{kg/h}$  para la solución), se puede observar que en caso de la solución oral, se depuran de fármaco 0.04 litros de sangre más por cada hora tras la administración del fármaco comparado con la depuración que se presenta en el caso de la forma farmacéutica de la suspensión.

La prueba estadística de Mann-Whitney realizada a un 95% de confianza para estimar si existe una diferencia significativa en los parámetros de concentración máxima y tiempo de absorción máxima entre las dos formas farmacéuticas indica con valores calculados

significancia de 0.533 para la concentración máxima y 0.782 para el tiempo de absorción máxima (ambos mayores al 0.05) que no existe una diferencia estadística significativa entre la media de los valores de la concentración máxima y el tiempo de absorción máxima de los grupos que recibieron la solución o la suspensión oralmente.

El intervalo terapéutico de la dapsona en las nuevas indicaciones propuestas, es el mismo que para su utilización en la terapéutica contra *Micobacterium leprae*, (concentraciones máximas en estado estacionario entre 0.5 y 4.0  $\mu\text{g/ml}$ ). Las concentraciones terapéuticas encontradas para ambas formulaciones orales en este estudio, se hallan dentro de este rango (3.30 y 3.90  $\mu\text{g/ml}$  para la solución oral y la suspensión respectivamente)<sup>45</sup>.

### 8.2.2. Formulaciones A y B de la solución intravenosa

En cuanto a los parámetros obtenidos experimentalmente para las dos formas farmacéuticas intravenosas, podemos observar que aunque por definición, el tiempo máximo de absorción de una formulación intravenosa es de 0 horas, ya que no existe la absorción del principio activo al ser depositado directamente en el tejido vascular, podemos observar gráficamente que existen en las formulaciones evaluadas valores de 0.0341 y 0.1 horas para las formulaciones A y B respectivamente, mientras que un comportamiento inverso se registra en cuanto a los valores de concentración máxima, ya que la formulación A alcanza una concentración mayor de 9.27  $\mu\text{g/ml}$  contra 7.73  $\mu\text{g/ml}$  de la formulación B.

La formulación B muestra una constante de eliminación superior (0.12  $\mu\text{g/ml}$ ) a la de la formulación A (0.11  $\mu\text{g/ml}$ ), incidiendo directamente en el comportamiento de los parámetros de tiempo de vida media de eliminación y depuración, siendo superiores en la formulación con menor constante de eliminación (formulación A) por poco más de una hora en el caso de la vida media de eliminación y 0.2 l/h más en el caso del parámetro de depuración.

La prueba estadística de Mann-Whitney a un 95 % de confianza para verificar si existe algún efecto de la formulación entre las soluciones intravenosas sobre la concentración máxima de fármaco obtenida en los perfiles concentración-tiempo, tuvo un valor

calculado de significancia de 0.268, que al ser mayor a 0.05, podemos afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la concentración máxima mostrada por los 2 grupos que recibieron las formulaciones intravenosas.

Es necesario hacer notar que la formulación B, produjo en todas las unidades experimentales a las que se les administró dicha formulación, hemólisis en diferentes grados tendiente a disminuir tras su administración conforme al paso de las horas, desapareciendo casi totalmente a las 8 horas de muestreo. Este efecto adverso puede explicar la notable variación en el volumen de distribución aparente de la formulación B, el cual es mayor casi cuatro veces al que presenta la formulación A de la solución intravenosa, esto quizás a la modificación sobre la unión del fármaco a proteínas del fármaco, debida a la lisis de los eritrocitos<sup>114</sup>.

### **8.2.3. Biodisponibilidad de las formulaciones orales**

En cuanto a los parámetros de biodisponibilidad absoluta de las formas farmacéuticas de administración oral, se observaron valores de 87.57 y 77.79% para la solución oral y la suspensión con respecto a la formulación A de la solución intravenosa desarrollada. Mientras que para la formulación B de la solución intravenosa, la solución oral y la suspensión tuvieron valores de 92.81 y 82.44% respectivamente. Los valores de biodisponibilidad absoluta de la solución oral con respecto a las dos formulaciones intravenosas, superan el 78.1% reportado por Helton y cols.<sup>105</sup>, en su estudio realizado en el año 2000, por casi 10 puntos porcentuales, lo cual pudiera deberse a las variaciones entre las especies de ratas utilizadas y a las diferencias en la composición de las formulaciones desarrolladas. Los altos valores de biodisponibilidad absoluta permiten observar que las formulaciones orales desarrolladas, permiten una absorción casi completa del principio activo, sin embargo, los valores de tiempo de absorción máxima, son superiores al tiempo reportado previamente por Helton para una solución oral (aproximadamente de 1 hora en ratas Sprague-Dawley)<sup>104</sup>.

El valor de biodisponibilidad relativa para la forma farmacéutica de suspensión con respecto a la solución oral, es de 88.83%, lo cual indica que en el caso de la suspensión



desarrollada, se absorbe 11.17 % menos del principio activo que en el caso de la administración de la misma dosis en forma de solución por la vía oral. Esta diferencia en la absorción del principio activo presentada por la forma farmacéutica de suspensión, indica que probablemente para alcanzar una absorción equiparable a la de la solución oral, tendría que administrarse la suspensión a una dosis 10% mayor para evitar una concentración máxima sub-terapéutica.

La comprobación de una alta biodisponibilidad absoluta de las forma de administración orales (entre 80 y 90%), indica la posibilidad de una administración intravenosa segura para alcanzar las concentraciones terapéuticas de inmediato, sin tener que realizar un ajuste drástico en la dosis del fármaco al administrarlo por la vía intravenosa.

La concentraciones máximas obtenidas para las formulaciones intravenosas A y B (9.27 y 7.73  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente), son prácticamente iguales a la reportada por Helton y cols.<sup>105</sup> (10.47  $\mu\text{g/ml}$ ). Aunque no existen datos previos de una administración en bolo de dapsona en seres humanos, se ha reportado que para una infusión con la mitad de la dosis terapéutica utilizada contra *Micobacterium leprae*, se obtiene un pico de concentración máxima de entre 3 y 4  $\mu\text{g/ml}$ <sup>4</sup>, por lo que los datos obtenidos en nuestro experimento y la aproximación obtenida en el comportamiento farmacocinético de la formulación A, la cuál aparentemente fue administrada sin efectos adversos, nos permite sugerir el estudio de dicha forma farmacéutica en voluntarios sanos y posteriormente en pacientes con la modificación adecuada de la dosis.

## IX.- CONCLUSIONES

- El método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución implementado para la determinación de dapsona en la matriz biológica de plasma sanguíneo cumple con los parámetros establecidos por la norma oficial mexicana 177-SSA1-1998<sup>6</sup>, de linealidad, precisión, exactitud en el rango de 0.130 a 8.0 µg/ml.
- El método analítico implementado para la determinación de dapsona por cromatografía de líquidos de alta resolución, tiene un porcentaje de recobro superior al 78.65% y no es dependiente de la concentración, ya que es reproducible en los tres niveles de concentración, bajo, medio y alto evaluados.
- La dapsona es estable en la matriz biológica de plasma sanguíneo, permitiendo su cuantificación de acuerdo a los criterios de precisión y exactitud establecidos por la norma oficial mexicana 177-SSA1-1998 a las siguientes condiciones de almacenamiento: 24 horas a temperatura ambiente, 10 días a -20°C, 30 días a -70 °C y 24 horas a 8°C tras su procesamiento para análisis.
- No existe una diferencia significativa entre los parámetros de absorción de concentración máxima y tiempo máximo de absorción en los grupos experimentales a los que se les administraron formas farmacéuticas orales (solución y suspensión).
- Las formulaciones orales propuestas permiten que una alta fracción de la dosis administrada por vía oral, sea absorbida al torrente sanguíneo, lo cual queda establecido por su biodisponibilidad absoluta de entre el 77 y el 92 %.

- No existe una diferencia significativa en la concentración máxima alcanzada, entre los grupos experimentales que recibieron las formulaciones intravenosas (A o B).
  
- La formulación B de la solución intravenosa, la cual contiene el detergente y agente emulsificador Tween 80, provoca hemólisis visible tras su administración, por lo que no es recomendable su utilización a nivel clínico.
  
- Los parámetros farmacocinéticos de la formulación A, y su administración sin efectos adversos aparentes (hemólisis), sugieren su estudio en voluntarios sanos y posteriormente en pacientes para las indicaciones terapéuticas de accidente cerebrovascular y epilepsia refractaria.

## X.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Zuidema J, Hilbers-Modderman E.S.M., Merkus F.W.H.M., "Clinical Pharmacokinetics of dapsone. Clinical Pharmacokinetics", 1986;11: 299-315.
- 2) Ríos Castañeda L. C., Altagracia Martínez M., Nader Kawachi J., Kravzov Jinich J., "Uso de la dapsona y algunos de sus derivados como neuroprotector". Pat. Méx. en trámite PR/E/2003/029001, 2003.
- 3) Kravzov Jinich J., Altagracia Martínez M., Ríos Castañeda C., Cahero Limón G., "Uso de la dapsona y algunos de sus derivados como antiepilépticos", Pat. Méx. No. 207928 , 2002.
- 4) Pieters F. A. J. M., Zuidema J., "The absolute oral bioavailability of dapsone in dogs and humans"., International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutic Toxicology. 1987; 25: 396-400.
- 5) Zuidema J, Modderman E.S.M., Merkus F.W.H.M. Huikeshoven H., "Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of dapsone and monoacetyldapsone in biological fluids". Journal of Chromatography, 1980;182: 130-135.
- 6) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSAI-1998, "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben de sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas". Diario Oficial de la Federación, 1998.
- 7) Adams R. P., Maurice V., Harper A. H., 2000, Capítulo 33, "Enfermedades cerebrovasculares". En: Manual de principios de neurología, Ed. Mc Graw- Hill interamericana, México.
- 8) Uribe Carlos S., 1997, Capítulo 22, "Enfermedad cerebro vascular oclusiva". En: Neurología 5ª edición, Uribe C., Arana A., Lorenzana P., Corporación para investigaciones biológicas, Medellín, Colombia.
- 9) Bentley P., Sharma P., "Pharmacological treatment of ischemic stroke", Pharmacology and Therapeutics, 2005;108 (3):334-352.
- 10) Brust J. C. M., 1984. Cerebral infarction. En L. P. Rowland (ed.) Merritt's Textbook of Neurology, 7ª edición, Philadelphia: Lea & Febiger, págs. 162-168.
- 11) Warlow C., Sudlow C., Dennis M., Wardlaw J., Sandercock P., "Stroke", The Lancet, 2003; (362): 1211-1224.

- 12) Bogousslavsky J., Aarli J., Kimura J., "Stroke: time for a global campaign?" *Cerebrovascular Diseases*, 2003; 16(2): 111-113.
- 13) Warlow C. P., "Epidemiology of stroke". *Stroke*, 352(3):SIII 1-4, 1998.
- 14) Lewandowski C., Barsan W., "Treatment of acute ischemic stroke", *Annals of Emergency Medicine*, 2001; 37(2): 202-216.
- 15) Ellekjaer E. F., Wyller T. B., Sverre J. M., Holmen J., "Lifestyle factors and risk of cerebral infarction". *Stroke*, 1992; 23(6): 829-834.
- 16) Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el 2002. *Salud Pública de México*, 2004; 46(2): 169-185.
- 17) Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el 2003. *Salud Pública de Mexico*, 2005; 47(2): 171-187.
- 18) Sokoloff L., Clarke D., 1998, "Circulation and energy metabolism of the brain". En: Siegel G., Agranoff B., Albers R. W., Fisher S., Uhler M., (eds), *Basic Neurochemistry*, 6ª edición. Lippincott, Williams & Wilkins, págs. 637-670.
- 19) Paulson O.B., Strandgaard S., Edvinsson L., "Cerebral autoregulation". *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 1990; 2(2):161-192.
- 20) Sette G., 1997, "Pathophysiology of ischemic stroke", En: Castillo J., Dávalos A., Toni D. (eds). *Management of acute ischemic stroke*, 1ª edición, Springer-Verlag Ibérica, págs. 198-206.
- 21) Wahlgreen N. G., 1997, "Neuroprotection in acute cerebral ischaemia", En: Castillo J., Dávalos A., Toni D. (eds)., *Management of acute ischemic stroke*, 1ª edición, Springer-Verlag Ibérica, págs. 207-225.
- 22) Lekker R. R., Shohami E., *Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities*. *Brain Research Reviews*, 2002; 39: 55-73.
- 23) Castillo J., "Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral". *Revista de Neuropsiquiatría*, 2001; 64: 354-381.

- 24) Siesjö B. K., Agardh C. D., Bengtsson F., "Free radicals and brain damage", *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 1989; 1(3):165-211.
- 25) Love S., "Apoptosis and brain ischaemia". *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2003; 27(2): 267-282.
- 26) Choi D. W., "Ischemia-induced neuronal apoptosis". *Current Opinion in Neurobiology*, 1996; 6(5):667-672.
- 27) Hill M., Hachinski V., "Stroke treatment: time is brain". *The Lancet*, 1998;(352): SM 10-14.
- 28) Roine R., Lindsberg., Kaste M. 1997. "Thrombolysis in acute ischemic stroke", En: Castillo J., Dávalos A., Toni D. (eds)., *Management of acute ischemic stroke*, 1ª edición, Springer-Verlag Ibérica, págs. 226-239.
- 29) Astrup J., Siesjö B., Symon L. "Thresholds in Cerebral Ischemia – The Ischemic Penumbra ", *Stroke*, 1981; 12(6): 723-725.
- 30) Green A. R., Cross A. J., Snape M. F., De Souza R. J., "The immediate consequences of middle cerebral artery occlusion on GABA synthesis in mouse cortex and cerebellum". *Neuroscience Letters*, 1992; 138(1): 141-144.
- 31) Green R., "Clomethiazole (Zendra) in Acute Ischemic Stroke: Basic Pharmacology and Biochemistry and Clinical Efficacy ". *Pharmacology & Therapeutics*, 1998; 80(2): 123-147 .
- 32) Leach M. , Swan J., Eisenthal D., Dopson M., Nobbs M., " BW619C89, a glutamate release inhibitor, protects against focal cerebral ischemic damage". *Stroke*, 1994; 25(1): 225-226.
- 33) Rekling J. C., "Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation". *Neuroscience Letters*, 2003; 335(3): 167-170.
- 34) Mohr J., Orgogozo J., Harrisn M. J., Wahlgreen N., Gelmers J., Martínez-Vila E., Dycka J., Tetenborn D., "Meta-analysis of oral Nimodipine trials in acute ischemic stroke". *Cerebrovascular Diseases*, 1994; 4: 197-203.

- 35) Franke C., Palm R., Dalby M., Schoonderwaldt H., Hantson L., Eriksson B., Lang-Jenssen L., Smakman J., "Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and the Netherlands". *Acta Neurologica Scandinavica*, 1996 ; 93(1): 56-60.
- 36) Diener H. C., Cortens M., Ford G., Grotta J., Hacke W., Kaste M., Koudstaal P.J., Wessel T., "Lubeluzole in acute ischemic stroke treatment: A double-blind study with an 8-hour inclusion window comparing a 10-mg daily dose of lubeluzole with placebo". *Stroke*, 2000; 31(11): 2543-2551.
- 37) Haley E. C., Jr, Kassell N. F., Alves W. M., Weir B. K., Hansen C. A., "Phase II trial of tirilazad in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A report of the Cooperative Aneurysm Study". *Journal of Neurosurgery*. 1995; 82(5): 786-790.
- 38) Yamaguchi T., Sano K., Takakura K., Saito I., Shinohara Y., Asano T., Yasuhara H., "Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group". *Stroke*, 1998; 29(1): 12-17.
- 39) Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators. "Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial". *Neurology*, 2001; 23; 57(8): 1428-1434.
- 40) Linnik M. D., Zobrist R, H., Hatfield M.D., " Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats". *Stroke*, 1993; 24(12): 2002-2009.
- 41) Florey: Analytical profiles of drug sustancies, Vol. 5, Academic Press, New York, 1976, págs 87-114.
- 42) Index Merck, 11ª edición, Susan Baudauri, Dir. Ed, 1984, pág 444.
- 43) Wolf R., Tüzün B., Tüzün Y., "Dapsone: Unapproved uses or indications", *Clinics in Dermatology*, 2000; 18(1): 37-53.
- 44) Wolf R., Matz H., Orion E., Tuzun Y., "Dapsone". "Dermatology Online Journal", 2002; 8(1): 2, página Web: <http://dermatology.cdlib.org/DOJvol8num1/reviews/dapsone/wolf.html>
- 45) Zuidema J., Hilbers-Modderman E.S.M., Merkus F.W.H.M. "Clinical Pharmacokinetics of dapsone", *Clinical Pharmacokinetics*, 1986;11:299-315.

- 46) Mandell Gerald L., Petri William A., 1996, "Fármacos antimicrobianos: usados en la quimioterapia de la tuberculosis, la enfermedad causada por el complejo de Mycobacterium avium y la lepra" En : Limbird L., et al (eds). Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. McGraw Hill. México.
- 47) Booth S., Moody C., Dahl M., Herron M., Nelson R., "Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function". Journal of Investigation in Dermatology, 1992; 98(2): 135-40.
- 48) Bozeman P. M., Learn D. B., Thomas E. L., "Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone", Biochemical Pharmacology, 44(3):553-563.
- 49) Podzamczar D., Salazar A., Jimenez J., Consiglio E., Santin M., Casanova A., Rufi .G, Gudiol F.. "Intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole compared with dapsone-pyrimethamine for the simultaneous primary prophylaxis of Pneumocystis pneumonia and toxoplasmosis in patients infected with HIV". Annals of Internal Medicine, 1995; 15; 122(10): 755-61.
- 50) A controlled trial of dapsone versus pyrimethamine-sulfadoxine for primary prophylaxis of Pneumocystis carinii pneumonia and toxoplasmosis in patients with AIDS. Biomedical Pharmacotherapy, 1997; 51(10): 439-445.
- 51) Hamada K., Hiyoshi T., Kobayashi S., Ishida S., Yagi K., Seino M., "Anticonvulsive effect of dapsone (4,4'-diaminodiphenyl sulfone) on amygdala-kindled seizures in rats and cats ". Epilepsy Research, 1991; 10 (2-3): 93-102.
- 52) Altagracia M., Monroy-Noyola A., Osorio-Rico L., Kravzov J., Alvarado-Calvillo R., Manjarrez-Marmolejo and Ríos C., "Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats " Neuroscience Letters, 1994; 1768(1): 52-54.
- 53) López-Naranjo F., Castañeda-López C., Rojas-Oviedo I., Altagracia-Martínez M., Krazov-Jinich J. , Manjarrez-Marmolejo J., Alvarado-Calvillo R., "Anticonvulsant activity of dapsone analogs: Electrophysiologic evaluation", Archives of Medical Research, 2003; 34(4): 269-272 .
- 54) Ríos C., Nader-Kawachi J. , Rodriguez-Payán A. , Nava- Ruiz C., "Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats", Brain Research, 2004; 999(2): 212-215.



- 55) Rodriguez E, Mendez-Armenta M, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Barroso-Moguel R, Rodriguez F, Rios C, Santamaria A. "Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum", *Toxicology*, 1999;139(1-2):111-118.
- 56) Martindale; The Extra Pharmacopeia, The Pharmaceutical Press, London, 1989, págs. 558-560.
- 57) Sago J., Russell P.H. III., "Dapsone", *Dermatologic Therapy* , 2002; 15: 340-351.
- 58) Tingle M. D., Mahmud R., Maggs J. L., Pirmohamed M., Park B. K., "Comparison of the metabolism and toxicity of dapsone in rat, mouse and man", *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1997; 283(2): 817-823.
- 59) Jollow D.J., Bradshaw T. P.,McMillan D. C., "Dapsone induced hemolytic anemia", *Drug Metabolism Reviews*, 1995, 27 (1-2): 107-124.
- 60) Hjelm M., DeVerdier C.H., "Biochemical effects of of aromatic amines-I Methaemoglobinemia, haemolysis and Heinz-body formation induced by 4,4'-diaminodiphenylsulphone", *Biochemical Pharmacology*, 1965, 14(7): 1119-1124.
- 61) Cucinell M. J., Israili Z. H. Dayton P.G. "Microsomal N-oxidation of dapsone as cause of methemoglobin formation in red cells", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1972; 21: 322-331.
- 62) Coleman M.D., "Dapsone toxicity: some current perspectives". *General Pharmacology: The Vascular System*, 1995; 26 (7): 1461-1467.
- 63) Motulsky A. G., Yoshida A., Stamatoyannopoulos G., "Variants of of glucose-6-phosphate dehydrogenase". *Annals of New York academy of Sciences*, 1971; 179 (6): 636-643.
- 64) Eichelbaum M., Evert B., "Influence of pharmacogenetics on drug disposition and response", *Clinical and experimental Pharmacology and Physiology*. 1996; 23(10-11): 983-985.
- 65) Gill H. J., Tingle M. D., Park B. K., "N-hydroxylation of dapsona by multiple enzymes of cytochrome P450: implications for inhibition of haemotoxicity", *British Journal of Clinical Pharmacology*., 1995; 40 (6): 531-538.

- 66) Coleman M. D., "Dapsone: modes of action, toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance"., *British Journal of Dermatology*, 1993 , 129(5): 507-513.
- 67) Prussick R., Ali M. A., Rosenthal D., Guyatt G., "The protective effect of vitamin E on hemolysis associated with dapsone treatment in patients with dermatitis herpetiforme". *Archives of Dermatology*. 1992; 128(2): 210-203.
- 68) Coleman M.D., Rhodes L.E., Scott A.K., Verbov J.L., Friedmann P.S., Breckenridge A.M., Park B.K., "The use of cimetidine to reduce dapsone-dependent methaemoglobinaemia in dermatitis herpetiformis patients". *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1992; 34(3): 244-249.
- 69) Dawson A. H. y Whyte I. M., "Management of dapsone poisoning dapsone complicated with methemoglobinemia"., *Medical Toxicology and Adverse Drug Experience*, 1989; 4(5): 387-392.
- 70) Coleman M. D., "Dapsone-mediated agranulocytosis: risks, possible mechanisms and prevention". *Toxicology*, 2001, 162 (1): 53-60.
- 71) Hornsten P., Keisu M., Wiholm B.E., "The incidence of agranulocytosis during treatment of dermatitis herpetiformis with dapsone as reported in Sweden, 1972 through 1988". *Archives of Dermatology*., 1990; 126(7): 919-922.
- 72) Saqueton A. C., Lorincz A. L., Vick N. A., Hamer R.D., "Dapsone and Peripheral Motor Neuropathy"., *Archives of Dermatology*, 1969; 100(2): 214-217.
- 73) Waldinger T. P., Siegle R. J., Weber W., Voorhees J. J.," Dapsone-induced peripheral neuropathy. Case report and review"., *Archives of Dermatology*, 1984, 120(3): 356-359.
- 74) Koller W. C., Gehlmann L. K., Malkinson F. D., Davis F. A., "Dapsone-induced peripheral neuropathy"., *Archives of Neurology*, 197; 34(10): 644-646.
- 75) Gutmann L., Martin J. D., Welton W.," Dapsone motor neuropathy--an axonal disease"., *Neurology*., 1976: 26(Tomo 6): 514-516
- 76) Daneshmend T. K., "The neurotoxicity of dapsone"., *Adverse drug reactions and acute poisoning reviews*, 1984; 3(1): 43-58.

- 77) Homeida M., Babikr A., Daneshmend T. K., "Dapsone-induced optic atrophy and motor neuropathy", *British Medical Journal*, 1980; 1; 281(6249): 1180.
- 78) Leonard J. N., Tucker W. F., Fry L., Marsh R. J., Ford S., "Dapsone and the retina", *The Lancet*, 1982, 20; 1(8269): 453.
- 79) Daneshmend T., "Idiosyncratic dapsone induced manic depression", *British Medical Journal*, 1989; 299(6694): 324.
- 80) Fine J. D., Katz S. I., Donahue M. J., Hendricks A. A., "Psychiatric reaction to dapsone and sulfapyridine", *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1983; 9(2): 274-275.
- 81) Millikan L. E., Harrell E. R., "Drug reactions to the sulfones", *Archives of Dermatology*. 1970; 102(2): 220-224.
- 82) Johnson D., Cattau E. Jr, Kuritsky J., Zimmerman H., "Liver involvement in the sulfone syndrome". *Archives of Internal Medicine*., 1986; 146(5): 875-877.
- 83) Corp C. C., Ghisham F. K., "The sulfone syndrome complicated by pancreatitis and pleural effusion in an adolescent receiving dapsone for treatment of acne vulgaris", *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 1998; 26(1): 103-105.
- 84) Kingham J. , Swain P., Swarbrick E. T., Walker J. G., Dawson A.M., "Dapsone and severe hypoalbuminaemia. A report of two cases". *Lancet*. 1979; 2(8144): 662-664.
- 85) Prussick R., Shear N. H., "Dapsone hypersensitivity syndrome". *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996; 35(2 Pt 2): 346-349.
- 86) Lawrence W. A., Olsen H. W., Nickles D. J., "Dapsone hepatitis", *Archives of Internal Medicine*. 1987; 147(1): 175.
- 87) Reilly T. P., Bellevue F. H. 3rd, Woster P. M., Svensson C. K., "Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone". *Biochemical Pharmacology*, 1998; 55(6): 803-810
- 88) Peters J. H., "Carcinogenic activity of dapsone", *International Journal of Leprosy*, 1976; 44: 383-384.

- 89) Kahn G., "Dapsone is safe during pregnancy"., *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985; 13(5 Pt 1): 838-839.
- 90) Sanders S. W., Zone J. J., Foltz R. L., Tolman K. G., Rollins D.E., "Hemolytic anemia induced by dapson transmitted through breast milk". *Annals of Internal Medicine*, 1982; 96(4): 465-466.
- 91) Lépori LuisRaúl ,*Interacciones Medicamentosas.* , Editoriales BbD ,1ª edición,2003 , pag. 201.
- 92) Pérez-Urizar J., Granados-Soto V., Flores-Murrieta F. J. , Castañeda-Hernández G., "Pharmacokinetic-Pharmacodynamic modelling :Why?", *Archives of Medical Research*, 2000; 31: 539-545.
- 93) Marzo A., "Clinical pharmacokinetic registration file for NDA and ANDA procedures"., *Pharmacological Research*, 1997; 36(6): 425-450.
- 94) Aarons L. En: Gabrielsson J., Weiner D. (eds). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis*, 2ª edición, 1997, Suecia, Swedish Pharmaceutical Press., Prefacio.
- 95) Balant L. P., Roseboom A., Gundert-Remy U. , "Pharmacokinetic criteria for drug research and development", *Advances in Drug Research*,1990; 19: 1-138.
- 96) Davies D. S., "An introduction to metabolic and kinetic aspects of toxicological studies", *Xenobiotica*, 1988; 18 Suppl 1:3-1:7
- 97) Mordenti J., "Man versus beast: pharmacokinetics scaling in mammals". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1986; 75(11): 1028-1040.
- 98) Dedrick R. L., "Animal scale-up". *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1973; 1(5): 435-436.
- 99) Mahmood I.,Balian J. D., "The pharmacokinetic principles behind scaling from preclinical results to phase I protocols"., *Clinical Pharmacokinetics*, 1999; 36 (1): 1-11.
- 100) Boxenbaum H., "Interspecies pharmacokinetics scaling and the evolutionary-comparative paradigm". *Drug Metabolism Reviews*, 1984; 15(5): 1071-1121.
- 101) Boxenbaum H., "Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics". *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1982; 10(2): 201-227.

- 102) Levy L., Biggs J. T., Gordon G. R., y Peters J. H., "Disposition of the antileprosy drug, dapsone, in the mouse". Proceedings of the society for experimental biology and medicine., 1972; 140: 937-943.
- 103) Peters J. H., Gordon G. R., Biggs J. T., Levy L., "The disposition of dapsone and monoacetyldapsone in the dog"., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1975; 148: 251-255.
- 104) Gordon G. R., Peters J. H., Ghoul D. C., Murray J. F., Levy L. y Biggs J. T., "Dapsone disposition in rats"., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1975; 150: 485-492.
- 105) Helton D., Osborne D., Pierson S., Buonarati M., Bethem R., "Pharmacokinetic profiles in rats after intravenous, oral, or dermal administration of dapsone". 2000; 28(8):925-929.
- 106) Gordon G. R., Shafizadeh A. G., Peters J. H. "Polymorphic acetylation of drugs in rabbits". Xenobiotica, 1973; 3(3): 133-50.
- 107) Dong M. W., "Modern HPLC for practicing scientists", Ed. Wiley interscience, primera edición. Estados Unidos de América.
- 108) Harris D.C., 2001, Capítulo 25. "Cromatografía de líquidos de alta eficacia", En: Análisis Químico Cuantitativo. 2ª edición Editorial Reverté.
- 109) Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., 2001, Capítulo 28. "Cromatografía de líquidos de alta eficacia", En: Principios de análisis instrumental. 5ª Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana.
- 110) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), 2001, "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation", págs. 1-20.
- 111) Shah V., Midha K., Findlay J. W., Hill H., Hulse J., McGilveray I., McKay G., Miller K., Patnaik R., Powell M., Tonelli A., Viswanathan C., Yacobi A., "Bioanalytical method validation- A revisit with a decade of progress", Pharmaceutical Research, 2000; 17(2): 1551-1557.
- 112) ACS Committee on environmental improvement, Subcommittee on environmental analytical chemistry., "Guidelines for data quality evaluation in environmental chemistry", Analytical Chemistry, 1980; 52: 2242-2249.

113) Karnes H. T., Shiu G., Shah V. P., "Validation of bioanalytical methods", *Pharmaceutical Research*, 1991; 8(4): 421-426.

114) Riley Robert W., Levy L., "Characteristics of the binding of dapsone and monoacetyldapsone by serum albumin" (37200). *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 1973; 142: 1168-1170.