

68
25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**"MONITOREO DE LOS NIVELES PLASMA-
TICOS QUE SE ALCANZAN DESPUES DE
LA ADMINISTRACION EN CONEJOS, DE
DOS FORMULACIONES EN CAPSULA
CONTENIENDO EL ANTICONVULSIVO
ACIDO VALPROICO."**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A N :
GLADIS PERAZA CABRERA
MONICA VARGAS LASCARI

Directores de Tesis: M.V.Z. José Gabriel Ruiz Cervantes
M. en C. Edilberto Pérez Montoya
Q. Marco Antonio Chávez Soto

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEX.

1990



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	v
Resumen	vii
Generalidades	1
Introducción	7
Justificación	26
Objetivos	27
Parte experimental:	
Material	28
Métodos	30
Resultados	37
Análisis de resultados	55
Conclusiones	56
Bibliografía	59

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABC	Area debajo de la curva de concentración
ACHC	Acido ciclohexancarboxílico
APG	Acido 2-n-propilglutámico
AV	Acido Valproico
B-OXIDACION	Beta oxidación
C máx.	Concentración máxima
CO ₂	Dióxido de Carbono
DE-50	Dosis efectiva media
DH-SAS	Deshidrogenasa del Semialdehído succínico
GABA	Acido gamma aminobutírico
GC	Cromatografía de gases
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
NZB	Nueva Zelanda Blanco
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
T-GABA	Aminotransferasa del ácido gamma amino--- butírico

T máx	Tiempo máximo en que se alcanza la concentración máxima
T 1/2	Tiempo de vida media biológica
ug	microgramos
U.I.	Unidades Internacionales
ul	Microlitros
VMg	Valproato de Magnesio
VNa	Valproato de Sodio
W-OXIDACION	Omega oxidación
2 EN-AV	Acido 2-n-pentanoico
3C-AV	Acido 2-n-propil-3-cetopentanoico
4-OH-AV	Acido 2-n-propil-4-hidroxipentanoico
5-OH-AV	Acido 2-n-propil-5-hidroxipentanoico

RESUMEN

Se ha considerado que la Epilepsia es una enfermedad cuyos orígenes y mecanismos son aún interrogantes, y por ende, no existe un tratamiento totalmente efectivo para su cura; únicamente se ha logrado un control de las convulsiones mediante el empleo de fármacos anticonvulsivantes, como el caso del Acido valproico.

El Acido valproico (AV) es un anticonvulsivo que se emplea ampliamente en la terapia humana en nuestro país, y que por poseer características de amplio espectro en crisis convulsivas, principalmente epilépticas, se puede utilizar en lugar de otros fármacos empleados en la terapéutica veterinaria de pequeñas especies.

Considerando que la medición periódica de la concentración plasmática del fármaco es un índice apropiado en la evaluación de la terapia y un medio para lograr un control de la efectividad de éste, se cuantificaron los niveles plasmáticos de AV en conejos, para conocer el tiempo en que se alcanza el nivel plasmático máximo ó pico mediante la técnica de Cromatografía de gases.

Tomando como modelo experimental 8 conejos Nueva--
Zelanda Blanco, hembras, adultas, aparentemente sanas,--
se les administró las formulaciones A y B en cápsulas de
dos diferentes fabricantes, conteniendo 250 mg. de AV--
después de un ayuno de 12 h.

Se tomaron muestras de sangre a intervalos determi--
nados de tiempo y se obtuvo el plasma, que se procesó me--
diante el "método de extracción de AV en plasma" el cual
se describe, para la cuantificación de la concentración--
del fármaco en este fluido biológico por Cromatografía -
de gases.

Con los datos de concentración máxima, tiempo máxi--
mo y área bajo la curva., se observó que la formulación--
A resultó más biodisponible y que el conejo no resultó--
un modelo experimental apropiado para esta prueba, por--
tener una fisiología digestiva lenta, y por lo tanto, no
compatible con medicamentos de vida media corta, como en
el caso del AV.

GENERALIDADES

Dentro de la investigación y la docencia de todas las áreas de las Ciencias Biomédicas, es común e invaluable la participación de diferentes especies animales denominadas ANIMALES DE LABORATORIO, que es toda especie animal susceptible de ser sometida a la experimentación con el propósito de obtener información, sin importar raza, sexo, tamaño, edad, etc.

Debido a su importancia, es esencial el cuidado óptimo de los animales, no solamente para asegurar su bienestar, sino para la obtención de resultados confiables en los experimentos comprendidos. Por lo tanto, es necesario conocer la responsabilidad ética y científica que implica trabajar con este tipo de animales, y por ende, el compromiso que significa el suministrarles las condiciones adecuadas de alojamiento, así como conocer las características más importantes acerca de su desarrollo fisiológico, su comportamiento, necesidades nutricionales, capacidad reproductiva y su utilidad práctica. (1)

Los animales de laboratorio han sido extensamente utilizados como sujetos básicos en la investigación cien

tífica en diversas áreas, tales como, desarrollo de nuevos fármacos, efectos bacteriológicos, toxicología, cultivos tisulares, micología, inmunología, oftalmología, oncología, biología reproductiva, biofarmacia, etc.

Otro renglón importante es el empleo del conejo en las pruebas de pirógenos diseñadas para verificar que un fármaco, al ser administrado por vía parenteral al humano no provoque elevación de la temperatura corporal.

Es por ésto que una de las especies domésticas más-- utilizadas como animales de laboratorio es el conejo y -- por lo tanto, la producción de éstos animales para investigación tiene una gran demanda. (2)

A continuación, se hará una breve descripción del-- conejo y sus características anatomofisiológicas.

El conejo es un mamífero del orden Lagomorpha y de la familia Leporidae. Su nombre proviene del Latín "cuniculus" que significa literalmente "trabajo en minas".

Las razas más utilizadas para la investigación son: Nueva Zelanda Blanco(NZB) Chinchilla y California.(3)

VALORES HEMATICOS

Volumen total de sangre:	60 ml/ kg. de peso
Tiempo de coagulación:	150 seg. en promedio
Vida eritrocítica:	45 a 60 días
Tasa de sedimentación eritrocítica:	2 mm/ hora
pH sanguíneo:	7.35
Hematocrito:	41.5%
Plaquetas:	170-1120 mil/mm ³
Hemoglobina:	13.6%
Leucocitos: 9000/mm ³	Neutrófilos: 45-55%
	Eosinófilos: 2%
	Basófilos: 5%
	Linfocitos: 38.8%
	Monocitos: 8.11%

(4)

CONSTANTES FISIOLÓGICAS

Frecuencia respiratoria:	38 a 60 resp./ min
Frecuencia cardíaca:	123 a 304 ciclos/min
Temperatura corporal:	39.5°C

(4)

VIAS DE SANGRADO

Vena marginal de la oreja y punción cardíaca. Es importante señalar que para realizar la punción cardíaca se debe anestesiar previamente al animal, para evitar un sufrimiento innecesario y no desgarrar el miocardio. Se usarán anestésicos por inhalación o por vía parenteral .

VIAS DE ADMINISTRACION DE FARMACOS

Vía subcutánea: Debajo de la piel de la espalda.

Aguja calibre 22.

Vía intramuscular: Músculos de los miembros pélvicos. Aguja calibre 22 y 25.

Vía intraperitoneal: Parte posterior del abdomen en dirección paramedial-izquierda. Del lado derecho es inadecuado por el riesgo de puncionar el ciego. Aguja calibre 22 y 25.

Vía endovenosa: A través de la vena marginal de la oreja; no confundir con la arteria auricular que se encuentra en la parte media de la oreja.

Agujas calibre 22 y 25.

Vía oral: En el alimento o agua de bebida o porsondeo esofágico mediante una jeringa-

sin aguja que se introduce en el espacio-interdentario. (3)

FISIOLOGIA DIGESTIVA

El conejo es un hervíboro no rumiante, que tiene un sistema digestivo monogástrico con un buen desarrollo funcional del ciego e intestino delgado. Son habitualmente-- ávidos ingestores de sus propias heces: producen dos tipos ; una forma blanda en la noche y una forma compacta-- durante el día. (4)

El proceso de la digestión en el conejo es como sigue: el alimento consumido se digiere parcialmente en el intestino delgado, y llega al ciego donde permanece unas 12 h. Las bacterias del ciego digieren este alimento produciendo vitaminas y aminoácidos. En el ciego la masa alimenticia es transformada en bolitas húmedas y blandas.

El alimento pasa rápidamente a través del intestino grueso y es tomado directamente del ano por la boca del animal, iniciando su segunda digestión. Mientras tanto el nuevo alimento ha completado su digestión estomacal y pasa a través del intestino delgado.

El nuevo alimento llega al ciego e inicia su digestión bacteriana. El alimento que ha sido reingerido, se somete a una nueva digestión estomacal.

Después de su segunda digestión la masa alimenticia pasa por el intestino delgado, donde son absorbidos más nutrientes. Luego cruza sin entrar al ciego y pasa lentamente por el intestino grueso para transformarse en las bolitas secas que son excretadas. (5)

I N T R O D U C C I O N

Un medicamento que se administra a un paciente no es el principio activo como tal, sino una forma farmacéutica. La diferencia estriba en que el medicamento puede presentar problemas en su solubilidad, inestabilidad física, química y enzimática. La presencia de excipientes produce diferencias en la cantidad y velocidad con que el medicamento alcanza la circulación general. Estos factores farmacéuticos, sumados a los factores farmacodinámicos dan como resultado que el inicio, intensidad y duración de la respuesta terapéutica se vea modificada. (6)

Por ello, y para establecer una terapia más racional es de gran utilidad determinar los niveles plasmáticos de las diferentes formulaciones de un medicamento. (7)

La Biodisponibilidad de un fármaco puede definirse como una medida de velocidad de la cantidad de una droga terapéuticamente activa que alcanza la circulación sistémica o sitio de acción y la velocidad con la que esta ocurre (8).

La biodisponibilidad puede evaluarse con la concentración del medicamento en líquidos corporales como sangre,

plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebro espinal, líquido sinovial, saliva y lágrimas; o al medir la magnitud de la respuesta farmacológica o terapéutica producida en el paciente.

En el caso de todos los fármacos y drogas, medir la concentración sanguínea en momentos predeterminados después de una sola dosis, es el método más fácil y, en general, el más cuantitativo. (9)

El análisis cualitativo de la curva de concentración plasma-tiempo permite estimar la biodisponibilidad, que suele incluir tres parámetros: la concentración plasmática máxima (o "pico"), el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración, y el área que queda debajo de la curva de concentración plasmática-tiempo. La concentración plasmática del medicamento aumenta con el ritmo e intensidad de absorción; el máximo se alcanza cuando el ritmo de eliminación de la droga equivale al ritmo de absorción.

El área debajo de la curva de concentración (ABC) es el dato de medición más importante de biodisponibilidad. Diversas sustancias pueden considerarse bioequivalentes si sus curvas de concentración prácticamente pue-

den superponerse: dos productos que tienen ABC similares, pero de formas diferentes para la curva de valor plasma-- tiempo, son equivalentes en la magnitud de su biodisponi-- bilidad, pero son absorbidos con ritmos diferentes. (9)

A continuación se hará una breve descripción de la epilepsia en caninos, dado que el presente trabajo está enfocado al tratamiento de la misma.

EPILEPSIA EN CANINOS

La epilepsia en los perros es una enfermedad funcio-- nal del cerebro, caracterizada por convulsiones tónico-cló-- nicas periódicas recurrentes, generalmente de breve dura-- ción, y aparentemente similar a la epilepsia en el hombre. La epilepsia "idiopática" se ha descrito en muchas espe-- cies, pero se ve con mayor frecuencia en el perro. En los Cocker Spaniel se ha observado una alta incidencia. Las -- convulsiones pueden comenzar en el primer año de la vida, pero con mayor frecuencia comienzan en el segundo año. El ataque típico dura de uno a dos minutos y consiste en un aspecto de mirada fija, caída sobre un lado y movimientos de las extremidades como de carrera. Después de una con-- vulsión, el animal puede volver rápidamente a su estado - normal o actuar durante unos minutos como obnubilado e in-- coordinado.

Como se desconoce la causa, el tratamiento se debe encaminar a aliviar los signos clínicos. Los medicamentos usados comunmente son la primidona, el fenobarbital y la difenilhidantofina. Estos pueden administrarse solos o en combinación. (10,11,12)

A C I D O V A L P R O I C O

El Acido Valproico (AV) fue sintetizado por Burton en 1881 (13) y su síntesis descrita por primera vez en la literatura por Oberreit en 1896 (14), Meunier y col. en 1963 (15) describieron su propiedad anticonvulsivante y en 1964 apareció el primer reporte clínico descrito por Carraz y col. (16)

En Europa se utiliza la sal de Sodio (VNa) desde 1967, y en U.S.A. se aceptó como anticonvulsivante por la Food Drug Administration (FDA) en 1978. En México y Argentina se usa la sal de Magnesio (VMg) con el nombre de ATEMPERATOR^R.

En 1980 aparecieron en el mercado nacional formulaciones conteniendo el AV como tal, tanto en cápsula como en jarabe. Actualmente existen formulaciones con el nombre de DEPAKENE^R y VALPROSID^R. (7)

Propiedades fisicoquímicas: El AV (ácido 2-propilvalérico, ácido 2-propilpentanoico, ácido di-n-propilacético) es un ácido carboxílico con propiedades similares a las de los ácidos grasos endógenos. Difiere estructuralmente de los anticonvulsivantes convencionales en que es un compuesto muy simple que carece de Nitrógeno y de un anillo en su molécula. (17)

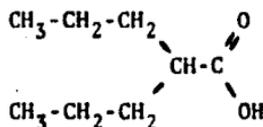


Fig.1. Estructura química del AV

El AV tiene un peso molecular de 144, una pKa de 4.95; es un líquido ligeramente viscoso, soluble en solventes orgánicos y poco soluble en agua y en ácido clorhídrico 0.1N. (18)

Propiedades farmacológicas: Se ha encontrado que el AV presenta actividad anticonvulsivante en una variedad de epilepsias clínicas y en modelos experimentales de epilepsias, por lo cual se le considera un anticonvulsivante de espectro amplio. (19)

Prey y Löscher (20) compararon la actividad del AV con los fármacos de primera elección utilizados en las crisis del pequeño mal (trimetadiona, etosuccimida). La dosis efectiva media (DE 50) del AV resultó ser menor a la de otros medicamentos.

Kupferberg (21) comparó la actividad anticonvulsivante del AV, fenobarbital, etosuccimida y trimetadiona, resultando ser el AV efectivo a dosis menores de su dosis tóxica media. Lockard y Levy (22) evaluaron la actividad anticonvulsivante del AV, utilizando un mono con gel de albúmina aplicada al cerebro expuesto como modelo. Después de la administración constante de una infusión de AV los datos indicaron una disminución significativa en la frecuencia de las crisis durante los primeros dos días. Las frecuencias de las crisis retornan a los niveles del control dos semanas después de suspender la administración. Estos autores en estudios posteriores (23) utilizando el mismo modelo, investigaron la eficacia del AV comparada a la etosuccimida bajo un régimen de dosificación y a variaciones relacionadas con períodos de luz y oscuridad, observaron que es necesario mantener una concentración de 50-150 ug/ml para disminuir las crisis y las fluctuaciones en el estado estacionario variaron un 36%. Los niveles plasmáticos tienden a aumentar en la fase de oscuridad.

El AV también es muy efectivo contra las crisis amigdaloides inducidas por condicionamiento previo en algunas especies. Leviel y Naquet (24) utilizando este modelo experimental en gato, administraron dosis diarias de 50 mg/kg intraperitonealmente, las cuales fueron suficientes para bloquear la secuencia progresiva de una convulsión generalizada producida mediante estimulaciones repetidas de la amígdala. Sin embargo, persistió una actividad focal post-descarga durante todo el tratamiento cuando se establece el fenómeno de acondicionamiento previo. Se necesitan dosis de 75-150 mg/kg para proteger al animal contra las convulsiones tónico-clónicas.

Aplicaciones terapéuticas: En 1964 Carraz y col. (16) describieron la primera prueba clínica de AV; estudios posteriores demostraron que el AV es efectivo en ausencias y en crisis mioclónicas de epilepsia generalizada y su eficacia es comparable a la del clonazepán (25). Ha sido utilizado en las crisis convulsivas febriles en infantes y adolescentes (26) y en el Status epilepticus por administración rectal (27). Es útil también para crisis tónico-clónicas en epilepsia generalizada y para todas las variedades de epilepsia parcial (28). En algunos casos disminuye e inhibe la respuesta fotoconvulsiva después de alcanzar la concentración máxima (29). Ha sido utilizado como medica--

ción única en el tratamiento de varios tipos de epilepsia (30); sin embargo, en general, se usa con la administración concomitante de otros anticonvulsivos (31,32).

Mecanismo de acción

Papel del ácido gamma aminobutírico (GABA) en el Sistema Nervioso Central (SNC).

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es considerado como el mayor transmisor inhibitorio del SNC en los mamíferos (33). Desde su identificación en extractos de cerebro de diferentes especies (34,35), se han realizado estudios para tratar de relacionar al GABA con los estados convulsivos. Se ha demostrado que la administración del GABA (36) protege a gatos contra crisis inducidas químicamente. Por otro lado, la administración periférica del GABA y sus análogos (2-pirrolidona), resultan en actividad anticonvulsivante en ratón (37,38), aunque los primeros estudios apoyan la idea de que los niveles de GABA cerebral no se relacionan directamente con la aparición o inhibición de las convulsiones (39), la evidencia del papel del GABA ha sido derivada de los estudios del efecto de los inhibidores de la aminotransferasa del ácido gamma aminobutírico (T-GABA) enzima responsable del catabolismo del GABA (40).

Efecto del AV en la actividad de la T-GABA.

La principal evidencia que existe sobre la acción anticonvulsivante del AV es que se debe a un aumento en los niveles cerebrales del GABA. Godin y col. (41) fueron los primeros en establecer que después de la administración intraperitoneal de Valproato de Sodio (VNa) a ratas, el contenido del GABA total se incrementa en aproximadamente un 45%, sin cambios en los niveles de los aminoácidos glicina, ácido aspártico y ácido glutámico.

Ciesleski y col. (42) utilizando una cepa de ratones susceptibles a crisis audiogénicas observaron un aumento de GABA cerebral en un 67%, este incremento resultó paralelo a la fijación de AV y a la actividad de la T-GABA en diferentes áreas del cerebro.

Efecto del AV sobre otras enzimas que intervienen en el metabolismo del GABA

Estudios posteriores (43) demostraron que el aumento en los niveles del GABA cerebral fue acompañado por la activación de la descarboxilasa del ácido glutámico y la inhibición de la T-GABA. Además de las enzimas mencionadas,

se ha involucrado a la deshidrogenasa del semialdehído -- succínico (DH-SAS), como lo demuestran los estudios de -- Harvey y col. (44) quienes obtuvieron una constante de -- $K_1 = 1.5 \times 10^{-3} M$, utilizando concentraciones de 5-10mg de VNa. Anlezark y col. (45) obtuvieron resultados simila-- res con 5mg de VNa, los cuales producen una inhibición -- del 89%. La inhibición es de tipo competitivo.

Van der Lan y col. (46) reportaron una inhibición preferencial del AV por la DH-SAS e indirecta hacia la T-GABA con las siguientes constantes cinéticas:

$$K_{GABA} = 1.5 \times K_{SAS} = 8.7 mN.$$

Otros estudios reportados (47) demostraron que el AV es un potente inhibidor de la aldehído reductasa, enzima responsable de la conversión del SAS a ácido hidroxibutírico en el cerebro. El tipo de inhibición es no competitiva,

Estudios bioquímicos del efecto del AV sobre el Guanosín monofosfato cíclico (GMPC)

Se ha tratado de dar una explicación alternativa sobre el efecto anticonvulsivante del AV, por lo que -- Lust y col. (48) estudiaron la relación entre los niveles

del GABA cerebral y el GMPc. El incremento del GABA cerebral fue paralelo a la disminución del GMPc. Esta misma relación ocurre con otros anticonvulsivantes.

Efecto del AV sobre los niveles cerebrales de otros aminoácidos

Por otro lado Schechter y col. (49), utilizando como modelo los ratones susceptibles a crisis audiogénicas, observaron que después de la administración intraperitoneal de AV se produce una disminución de un 68% en la concentración de aspartato, acompañado de un incremento de GABA y sin modificación en otros aminoácidos. Kukino y Deguchi (50) obtuvieron resultados similares después de la administración de 400 mg/kg a ratones, ya que la disminución del aspartato fue de un 48% comparada al control.

Estudios alternativos para dilucidar el mecanismo de acción del AV

En uno de los pocos trabajos realizados in vivo, Löscher (51) observó un incremento de un 77% del GABA en el líquido cefalorraquídeo después de la administración intravenosa de VNA a perros, y como no presentaron cambios en el GABA del plasma, se plantea otro modelo para el es-

tudio de la relación entre el GABA y el AV.

Schobben y col. (52) plantearon que probablemente no fuera el AV el causante del efecto anticonvulsivante, sino uno de sus metabolitos, pero Loscher (53) demostró que la actividad anticonvulsivante se debe en un 80% a la droga inalterada.

A pesar del gran número de estudios realizados sobre el mecanismo de acción del AV, este aún no ha sido dilucidado completamente, sin embargo, existe amplia evidencia de que su acción es consecuente a un aumento en los niveles cerebrales del GABA. (7)

Características farmacocinéticas

El AV administrado oralmente, como sal de Sodio, de Magnesio o la amida correspondiente, a voluntarios sanos o pacientes epilépticos se absorbe rápidamente y resulta en una concentración máxima después de 0.5-5 h. (54,55). La absorción es completa en las diferentes formulaciones, lo que establece su bioequivalencia (56,57,58,59,60,61). Por lo contrario la velocidad de absorción se modifica considerablemente por factores de la formulación (32,56,57,58) y por la presencia de alimento (60,62,63) en el tracto gastrointestinal.

No existe una clara relación entre la dosis y los niveles plasmáticos: en estudios con dosis única (54,64), por administración crónica (65,66,67) e infusión endovenosa se han observado fluctuaciones en los niveles de un 50% después de alcanzar el estado estacionario (65). El curso temporal de estos niveles se ha descrito por modelos de uno y dos compartimientos en diferentes especies, incluyendo al hombre (60,61,67,68,69). Se han observado que los niveles se alcanzan más rápidamente en pacientes que en sujetos sanos y que el tiempo de vida media varía con el individuo y su edad. Se han reportado valores de $T_{1/2}$ de 3,8-8,3 h.--- después de una sola administración de AV en pacientes tratados con otros antiepilépticos (70). Por esto, se considera que la vida media del AV es corta, lo que trae como consecuencia que el estado estacionario se alcanza entre 24-48 h después de iniciado el tratamiento en contraste con el efecto clínico que se observa generalmente solo semanas después (71).

El AV se encuentra enlazado en un 87-95% a las proteínas del plasma, principalmente la albúmina. El enlazamiento es dependiente de la concentración (67,69). La unión a las globulinas es despreciable.

El AV penetra en los glóbulos rojos en cantidad limitada. La relación sangre/plasma es de 0.28 (60) y la concentración en cerebro es de 1/3 de la del plasma (20). También está presente en el líquido cefalorraquídeo (66,--67) en un 5-15%, en semen en un 7-8% de los niveles plasmáticos (71), y en lágrimas la relación con respecto al plasma es de 0.1. (72)

Su eliminación principal es por metabolismo hepático y se excreta en forma inalterada en cantidades despreciables. (21)

Rutas metabólicas del Acido Valproico

Gracias al desarrollo de técnicas analíticas de gran precisión y resolución y su aplicación a los estudios del metabolismo del AV, se ha logrado identificar ya a la mayoría de sus metabolitos en varias especies animales y en el hombre, lo que ha permitido establecer las vías metabólicas (73,86,87,96) Fig.2.

Eymard y col. (74) encontraron 5 metabolitos en orina de rata después de la administración oral de AV y demostraron que este presenta ciclo enterohepático, lo que fue confirmado por Kukino y col. (75) quienes reportaron una--

excreción biliar de un 40-60% de la dosis administrada. La recuperación en orina es de aproximadamente un 70% y encontraron un 10-20% en el aire espirado en forma de CO₂ marcado. Tanto en orina como en bilis detectaron el AV en forma inalterada y en mayor porcentaje su glucorónido. Kukahara y Matsumoto (76) identificaron mediante Espectrofotometría de Masas, a dos metabolitos del AV después de la administración oral a ratas. Estos compuestos son el 2-n-propil-5-hidroxipentanoico (5-OH-AV) y el ácido 2-n-propilglutárico (APG). El mecanismo propuesto para la formación de éstos metabolitos es una oxidación de tipo Omega. También propusieron que el paso final del AV era la formación del APG, debido a que este ácido se recupera completamente inalterado en orina después de su administración oral a ratas. Ferrandes y Eymard (77) cuestionaron la etapa final, ya que solo recuperaron 50-60% de la dosis administrada de APG a ratas.

Posteriormente Matsumoto y col. (78) identificaron tres productos metabólicos; el ácido 2-n-propil-4-hidroxipentanoico (4-OH-AV) y el ácido 2-n-propil-3-cetopentanoico (3C-AV), en orina de ratas después de la administración por intubación gástrica de AV. El patrón metabólico propuesto por éstos autores es una combinación de Omega y

Beta Oxidaciones. Esto fue confirmado por otros investigadores (79,80,81) quienes demostraron la presencia de 3C-AV, 4-OH-AV, 5-OH-AV y APG en orina de pacientes epilépticos.

Schobben (82), en experimentos realizados en monos Rhesus a los que se hizo una infusión endovenosa de 14C-AV y analizando sangre, orina, heces y el aire espirado, obtuvo una recuperación del 95% de la dosis administrada e identificó dos metabolitos en sangre: la Gamma-Valprolactona y el ácido 2-n-propil-3-pentanoico. Estos compuestos también estuvieron presentes en el plasma de pacientes epilépticos.

Jakobs y Löscher (83), analizando el suero de diferentes especies incluyendo el de un paciente epiléptico, identificaron cuatro metabolitos. Su presencia en el suero fue dependiente de la especie. Así, el 3-OH-AV se encontró en todas las especies, el 4-OH-AV solo en el suero de humanos y ratones y el 5-OH-AV únicamente en ratones, lo que establece la preferencia e importancia de la vía metabólica según la especie.

La Beta oxidación es la vía principal para el humano como lo demuestran los estudios realizados por Gompertz y col. (80) quienes reportaron la presencia de dos metaboli-

tos en orina de pacientes epilépticos: el 3C-AV y el APG.

De los metabolitos identificados actualmente, solo para el 2 EN-AV, se ha logrado establecer su curso temporal en plasma y cerebro y se ha tratado de correlacionar con la actividad anticonvulsivante del AV, la que abre una perspectiva más para tratar de dilucidar el mecanismo de acción del AV. (32)

Estudios toxicológicos y reacciones adversas

Las principales reacciones adversas que se observan en el tratamiento del AV son del tracto gastrointestinal y son: anorexia, náuseas y vómito, en ocasiones se presenta pérdida del cabello y aumento o disminución de peso, pero todas estas reacciones son transitorias y generalmente no requieren la suspensión del medicamento. También se reportan casos en los que en presencia de otras drogas anticonvulsivantes se llegaron a tener estados de estupor y en otros inclusive "coma", pero los pacientes se recuperaron y el AV quedó como droga única en su terapia. (84)

Eventualmente se presentan reacciones más serias como la hiperamonemia y más en concreto, disturbios de la funcionalidad hepática; la Hepatitis Viral A es otra de--

las reacciones reportadas en pacientes bajo politerapia, pero al recuperarse, la mayor parte de los pacientes reinicia la administración del AV (35). La hiperamonemia es adjudicada a un posible efecto del AV sobre la regulación a corto plazo de la síntesis de Urea, para lo cuál, recomiendan disminuir el consumo de proteínas al mínimo necesario, sobre todo en pacientes jóvenes que reciben politerapia. (86)

Por otro lado, existen reportes de un Síndrome que se presenta en una proporción pequeña de pacientes, en el cual la sintomatología se cruza con la del Síndrome de Reye y a la Enfermedad Jamaicana del Vómito, pero se diferencia de éstas porque genera Esteatosis Microvestibular así como Necrosis Hepatocelular (87). La Enfermedad Jamaicana del Vómito es debida a una hipoglicina la cuál es muy parecida al ácido 4-n-pentanoico que es metabolito del AV producto de la N-1 Oxidación, esta evidencia obtenida por Nau y Loscher (37) correlaciona muy bien por la expuesta por Ater y col. (88) y ambos proponen que los metabolitos que se originan de la N y N-1 oxidación son los responsables de los efectos tóxicos del AV.

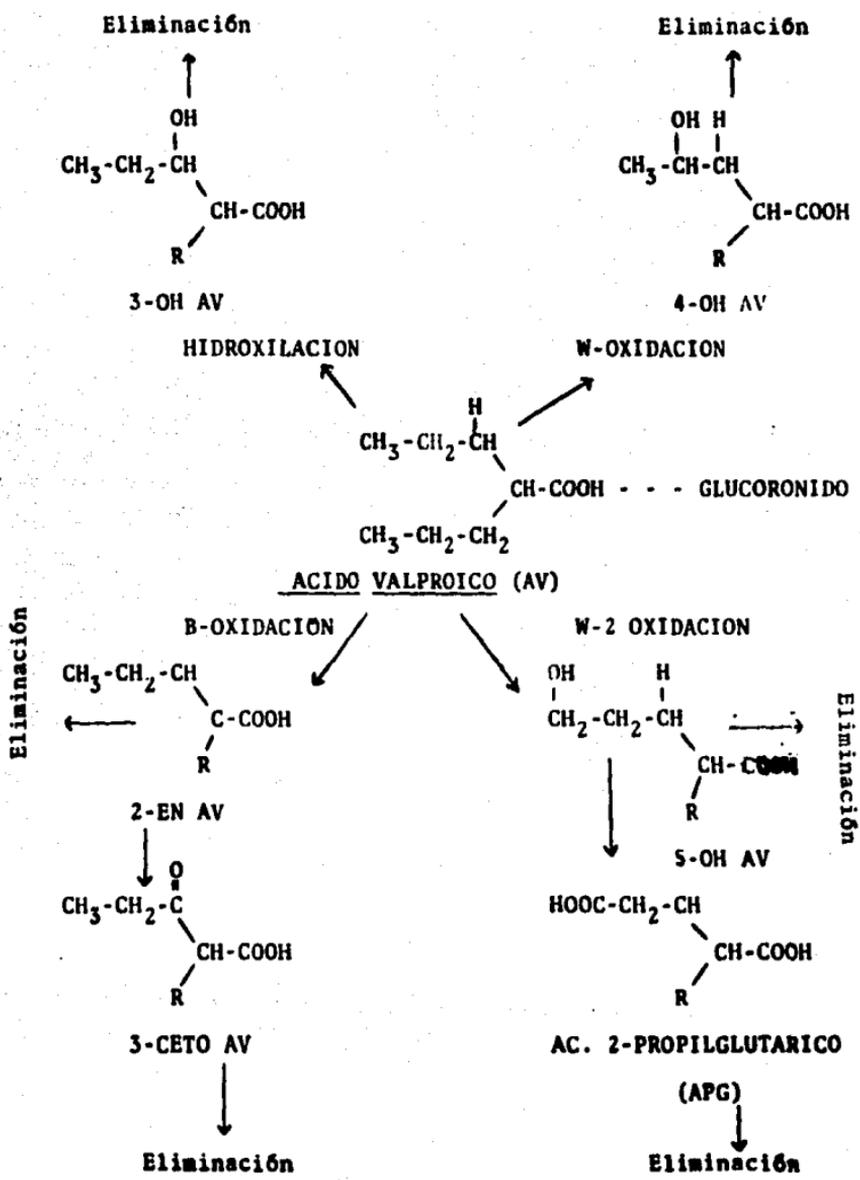


Fig. 2. Metabolismo del AV
 Modificado de Escobedo, R.A.J. (1987) (96)

J U S T I F I C A C I O N

Debido a que muchos medicamentos que se usan en la terapia humana, también son aplicados en Medicina Veterinaria, es recomendable realizar estudios encaminados a conocer los niveles que se alcanzan en los -- animales; como en el caso de los anticonvulsivos ya que en los animales también se presentan crisis convulsivas por diferentes causas, como son: Enfermedades (Moquillo canino, Epilepsia), Deficiencias nutricionales, Traumatismos, Intoxicaciones, Envenenamientos, etc.

En este trabajo utilizamos el anticonvulsivante Acido Valproico como una alternativa terapéutica más para el tratamiento de la Epilepsia en caninos.

O B J E T I V O S

Quantificar, mediante la Técnica de Cromatografía de Gases, los niveles plasmáticos que alcanza un anti-convulsivo ampliamente utilizado en la medicina humana en México, cuando es administrado en forma de cápsula, de dos diferentes fabricantes a conejos.

Obtener el nivel plasmático óptimo de Acido Valproico como alternativa terapéutica en crisis convulsivas en los animales domésticos; principalmente para la Epilepsia en caninos.

Evaluar cuál de las dos formulaciones empleadas resulta más biodisponible.

Probar al conejo como modelo experimental en este tipo de estudios.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL

- Material biológico:

10 conejos Nueva Zelanda Blanco, hembras, adultas, sanas.

Plasma de los mismos

- Material para toma de muestras sanguíneas:

200 jeringas desechables de 3 ml. con aguja calibre 22 (estériles)

Algodón

Alcohol

Heparina sódica de 1000 UI / ml. como anticoagulante.

Gotero

- Material de vidrio:

100 tubos de ensayo de 3 ml.

200 concentratubos de 10 ml. con tapón

5 micropipetas de 10,20,30,40,50,75 y 100 μ g c/u

4 pipetas volumétricas de 0.5, 1.0, 2.0 y 5 ml

4 vasos de precipitado de 10 y 25 ml.

6 matraces de Erlenmeyer de 10 ml.

- **Reactivos:**

Acido ciclohexancarboxílico (ACHC) como estándar interno

Acido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

Cloroformo

Acetato de Isoamilo, como reactivo analítico (R.A)

- **Fármacos:**

Acido Valproico "Valprosid" (Fórmula "A")

"Depakene" (Fórmula "B")

- **Equipo:**

Agitador "Vortex"

Centrifuga clínica "SolBat" mod. j12 Aparatos científicos

Bomba de vacfo "Cenco Pressovac" 52435

Evaporador de muestras y cilindro de Nitrógeno

Balanza analítica "Sartorius"

Cromatógrafo de gases "Varian 4600" Vista Series

Monitor "Varian CDS 401" Vista Series

Microjeringas de 10 ul Hamilton Co. # 701

MÉTODOS

Cromatografía de Gases

Esta técnica muy desarrollada desde 1951, se ha convertido en el método preferido para el análisis rápido y exacto de cualquier sustancia volátil a una columna que contiene un líquido absorbente apoyada en un material --- inerte.

El fundamento para la separación de los componentes de la sustancia volátil es la diferencia de sus coeficientes de partición cuando se transportan a través de la columna mediante un gas inerte como el Helio. (89)

La columna debe acondicionarse primero con el gas que sirve como vehículo para eliminar cualquier material que se haya inyectado anteriormente y obtener una línea basal estable.

La muestra se introduce en el inyector de muestras y el gas vehículo transporta el material volátil inyectado a través de la columna donde los componentes sufren una partición y se separan. Eventualmente una fracción atraviesa el detector, el cual emite señales de vértices, en una secuencia útil. (90)

Toma de muestras sanguíneas

A 8 conejos, aparentemente sanos, por medio de un muestreo aleatorio, se les clasificó en dos grupos de 4 individuos cada uno, quedando de la siguiente manera:

<u>GRUPO A</u>	<u>GRUPO B</u>
Conejo #2	Conejo #1
Conejo #3	Conejo #4
Conejo #5	Conejo #7
Conejo #6	Conejo #8

Con un ayuno previo de 12 h, al grupo "A" se le administró el medicamento Valprosid (Fórmula "A") y al grupo "B" el medicamento Depakene (Fórmula "B") por vía oral la cual se hizo con una jeringa desechable de 3 ml. sin punta, que se utilizó como abre bocas y a la vez como sonda, para colocar la cápsula en el fondo de la cavidad oral del animal y que éste la deglutiera.

Se tomaron las muestras de sangre con intervalos de tiempo de 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min y 240 min. por punción cardíaca, debido a que no fue posible obtener mayor volumen sanguíneo por vena marginal de la oreja. Se utilizó una jeringa por cada muestra.

Cada muestra de sangre se colocó en tubos de ensaye de 3 ml. previamente identificados, conteniendo Heparina en dosis de 0.01 mg/ml de sangre.

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos. Se separó el plasma en tubos recolectores, previamente identificados y se congelaron hasta su posterior análisis.

A los animales se les dió un descanso de 15 días para proceder a intercambiar los medicamentos, es decir; al grupo "A" se le administró la formulación "B" y al grupo "B" se le dió la formulación "A" y se siguió el procedimiento ya descrito.

Obtención del plasma blanco para las curvas estándar

Se utilizaron 2 conejos sin tratamiento, de los que se obtuvieron 25 ml. de sangre, por punción cardíaca, de cada uno. Las dos muestras se colocaron en un solo tubo conteniendo Heparina, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se separó el plasma y se congeló hasta su posterior procesamiento.

Preparación del tubo blanco

En un concentratubo se colocaron 0.2 ml de plasma blanco, se agregaron 40 ul de H_2SO_4 concentrado, se agitó 10 seg. (Vortex) y se le adicionaron 5 ml de cloroformo, se agitó un minuto (Vortex) y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, con la bomba de vacío, se separó la fase acuosa y la fase orgánica se transfirió a otro concentratubo, se le agregaron 50 ul de Acetato de Isoamilo, se evaporó con corriente de Nitrógeno y se inyectaron 2 ul al Cromatógrafo de gases.

Preparación de las curvas estándar de AV para cada Conejo

Se pesaron 50 mg de AV estándar y se aforó a 10 ml de Metanol (sol. A), de ésta, se tomaron 0.125 ml, 0.250 ml, 0.5 ml y 1.0 ml, para formar las soluciones B, C, D y E respectivamente, que a su vez, se aforaron a 10 ml de Metanol cada una.

En cinco concentratubos se colocaron 200 ul de plasma blanco y se añadieron 40 ul de H_2SO_4 concentrado se agitó 10 seg (Vortex), se agregaron 50 ul de cada solución a diferente tubo, más 50 ul de ACHC y 5 ml de cloroformo, se agitó un minuto y se centrifugó a 3000

rpm durante 5 minutos. Con la bomba de vacio, se separó la fase acuosa y la fase orgánica se transfirió a otro concentratubo, a lo que se le agregó 50 ul de Acetato de Isoamilo, se evaporó con corriente de Nitrógeno y se inyectaron 2 ul al Cromatógrafo de gases.

Método de extracción y cuantificación del AV del plasma de los conejos tratados

En 10 concentratubos de 10 ml se colocaron 200 ul de las muestras de plasma, agregándole 50 ul de ACHC como estándar interno, más 40 ul de H_2SO_4 concentrado y 5 ml de cloroformo. Se agitó 30 seg (Vortex) y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min.

Con la bomba de vacio se separó la fase acuosa y la capa orgánica se transfirió a otro concentratubo. A ésta se le agregó 50 ul de Acetato de Isoamilo, se evaporó con corriente de Nitrógeno. Se inyectaron 2 ul al Cromatógrafo de gases, que tenia las siguientes condiciones:

Flujo de gases:	Nitrógeno 30 ml/min
	Hidrógeno 50 ml/min
	Aire 150 ml/min

Temperatura del Inyector: 210°C

Temperatura del Horno ó Columna: 190°C

Temperatura del Detector: 240°C

Obtención de resultados

Para la obtención de los resultados se utilizó una calculadora TEXAS INSTRUMENTS TI PROGRAMMABLE 59 y una COMPUTADORA IBM.

La determinación de las concentraciones de AV de las curvas estándar para cada conejo, se realizó de la siguiente manera:

De una solución de AV con una concentración de 5 mg por ml de Metanol (diluyente), se tomaron 0.125 ml, 0.250 ml, 0.5 ml y 1.0 ml para formar 4 soluciones; que contienen una concentración de 62.5 mg/ml, 125.0 mg/ml, 250.0 mg/ml y 500.0 mg/ml de AV respectivamente. Estos datos se obtuvieron realizando "reglas de tres" para calcular dichas concentraciones.

La relación de AV y ACHC (estándar interno) se obtuvo dividiendo el área de los picos de cada uno de éstos, dados por el Cromatógrafo de gases.

Las concentraciones obtenidas de AV del plasma de cada conejo se obtuvieron dividiendo el área de los picos de AV y de ACHC, dados por el Cromatógrafo de gases y éstos datos se procesaron en la calculadora, programa da para dar la concentración real, que multiplicada por 5 nos dá la concentración en ug/ml de plasma, éstos da-tos, a su vez, se procesan en la Computadora que nos indica el Area bajo la curva de concentración de AV en plasma.

R E S U L T A D O S

En la Tabla 1 se muestran los datos de las curvas estándar para cuantificar el AV en plasma de conejo.

En la Gráfica 1 se muestra la curva estándar del conejo #3, que se tomó como ejemplo, dado que las curvas de los 8 conejos fueron semejantes.

En la Tabla 2 se presentan los resultados de los niveles plasmáticos de AV en los conejos 1 al 8, obtenidos después de la administración de 2 formulaciones en cápsula conteniendo 250 mg de AV.

En las Gráficas 2 a la 9 se muestran los resultados mencionados en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se presentan los resultados del Area bajo la curva de concentración (ABC) de AV en plasma de conejo.

Tabla 1. Datos de las curvas estándar para cuantificar el AV en plasma de conejo.

C O N E J O 1

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: $Y = a + bx$
62.5	0.067	$Y = -0.012 + 0.001 (x)$
125.0	0.114	$n = 4$
250.0	0.285	$r^2 = 0.99$
500.0	0.559	

C O N E J O 2

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: $Y = a + bx$
62.5	0.054	$Y = -0.122 + 0.002 (x)$
125.0	0.167	$n = 4$
250.0	0.345	$r^2 = 0.99$
500.0	1.019	

sigue.....

Cont. Tabla 1.....(2)

C O N E J O 3

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: $Y = a + bx$
62.5	0.069	$Y = -0.047 + 0.001(x)$
125.0	0.099	$n = 4$
250.0	0.256	$r^2 = 0.99$
500.0	0.631	

C O N E J O 4

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: $Y = a + bx$
62.5	0.036	$Y = -0.003 + 0.0009(x)$
125.0	0.125	$n = 4$
250.0	0.274	$r^2 = 0.99$
500.0	0.477	

sigue....

Cont. Tabla 1.....(3)

C O N E J O 5

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: Y= a+bx
62.5	0.086	Y=-0.004+0.0012(x)
125.0	0.115	n=4
250.0	0.327	r ² = 0.99
500.0	0.600	

C O N E J O 6

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: Y= a+bx
62.5	0.101	Y= 0.016+0.0012(x)
125.0	0.150	n=4
250.0	0.332	r ² = 0.99
500.0	0.620	

sigue.....

Cont. Tabla 1..... (4)

C O N E J O 7

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: $Y = a + bx$
62.5	0.064	$Y = 0.054 + 0.0008(x)$
125.0	0.163	$n = 4$
250.0	0.335	$r^2 = 0.95$
500.0	0.446	

C O N E J O 8

Concentración de AV en 0.5 ml de plasma (ug/ml)	AV/ACHC*	Ecuación de regresión: $Y = a + bx$
62.5	0.072	$Y = -0.081 + 0.0015(x)$
125.0	0.116	$n = 4$
250.0	0.335	$r^2 = 0.97$
500.0	0.748	

* Se añadieron 50 ul de ACHC como estándar interno (1mg/ml)

Gráfica 1. Curva estándar para cuantificar el AV en plasma del conejo # 3.

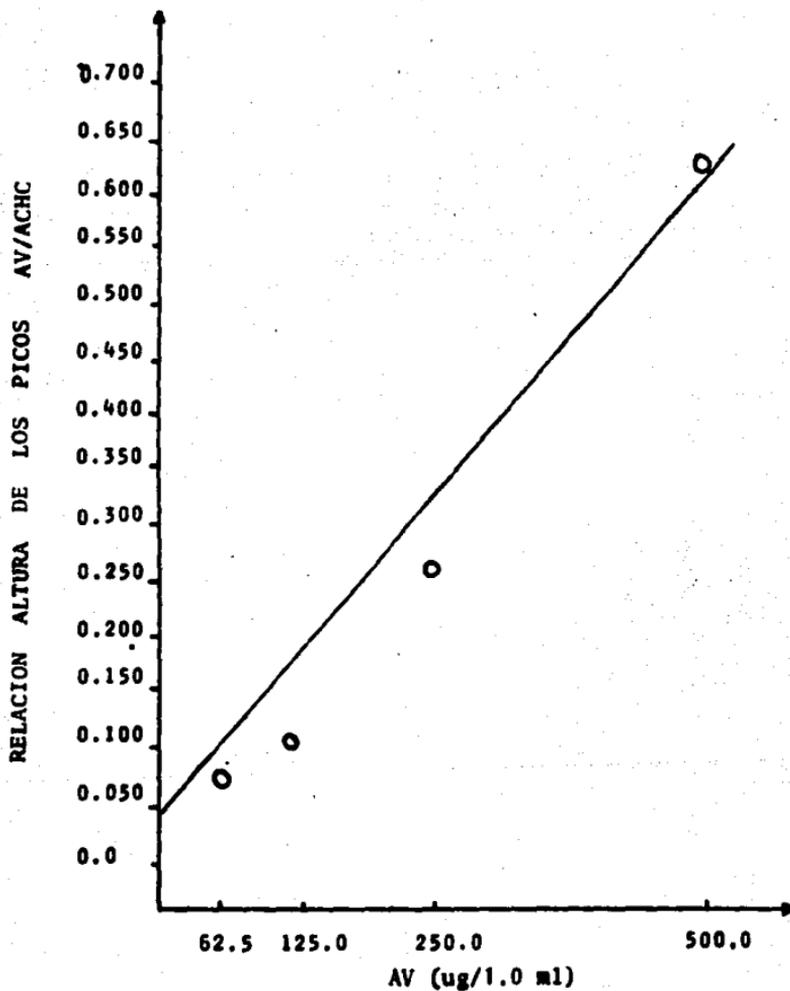


Tabla 2. Niveles plasmáticos obtenidos en conejos, después de la administración de 2 formulaciones en cápsula, conteniendo AV(250mg)

CONEJO 1			CONEJO 2		
Tiempo (min)	Concentración (ug/ml)		Tiempo (min)	Concentración (ug/ml)	
	Fórmula A	Fórmula B		Fórmula A	Fórmula B
5	461.0	521.9	5	1047.9	545.8
10	1680.2	1074.9	10	1160.5	500.4
15	482.7	1353.6	15	1556.5	584.8
30	2394.3	1331.9	30	2216.6	532.8
45	761.4	1553.9	45	1372.6	957.0
60	1649.7	1941.5	60	1768.6	1205.9
90	1092.4	1035.7	90	1552.2	1240.5
120	1710.7	1092.4	120	1653.9	552.3
180	1310.1	500.1	180	1396.4	1009.0
240	974.8	996.6	240	561.0	524.2

sigue.....

Cont. Tabla 2.....(2)

CONEJO 3			CONEJO 4		
Tiempo	Concentración (ug/ml)		Tiempo	Concentración (ug/ml)	
(min)	Fórmula A	Fórmula B	(min)	Fórmula A	Fórmula B
5	1029.5	486.5	5	479.6	691.8
10	1557.4	407.3	10	909.1	454.3
15	2247.4	554.4	15	403.8	2359.3
30	3397.4	463.9	30	1848.9	934.3
45	1926.9	1202.9	45	1889.4	1975.3
60	2616.9	1636.6	60	2313.8	1025.3
90	2239.8	1696.9	90	1955.1	909.1
120	2417.1	497.8	120	3961.1	2894.9
180	1968.4	1293.4	180	1758.0	1156.7
240	512.9	448.8	240	590.7	1252.7

sigue.....

Cont. Tabla 2..... (3)

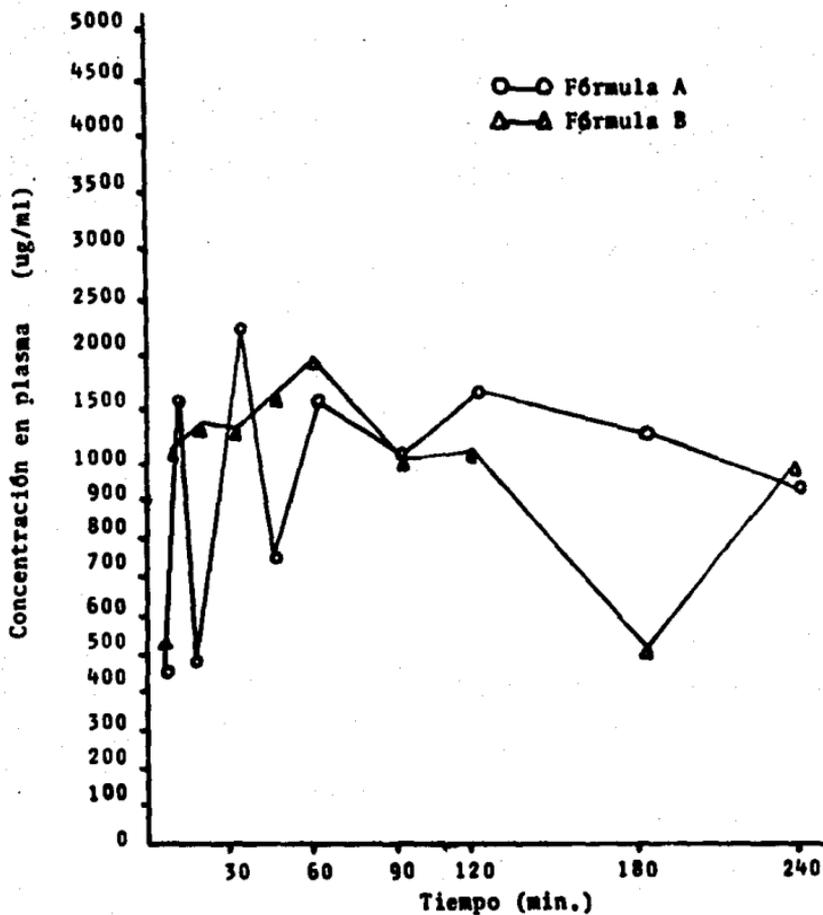
CONEJO 5			CONEJO 6		
Tiempo	Concentración (ug/ml)		Tiempo	Concentración (ug/ml)	
(min)	Fórmula A	Fórmula B	(min)	Fórmula A	Fórmula B
5	410.2	668.1	5	3223.2	991.3
10	1114.5	840.1	10	2880.8	1259.5
15	1917.1	619.0	15	1494.6	1898.9
30	1990.8	1503.5	30	2191.9	591.2
45	1405.2	1560.8	45	2575.5	2022.7
60	1835.2	1466.7	60	2715.8	1601.9
90	1884.4	1929.4	90	2711.7	1502.9
120	2338.9	1949.9	120	2567.3	1387.4
180	1274.2	4206.2	180	1523.5	1205.9
240	2469.9	447.0	240	549.9	574.7

sigue.....

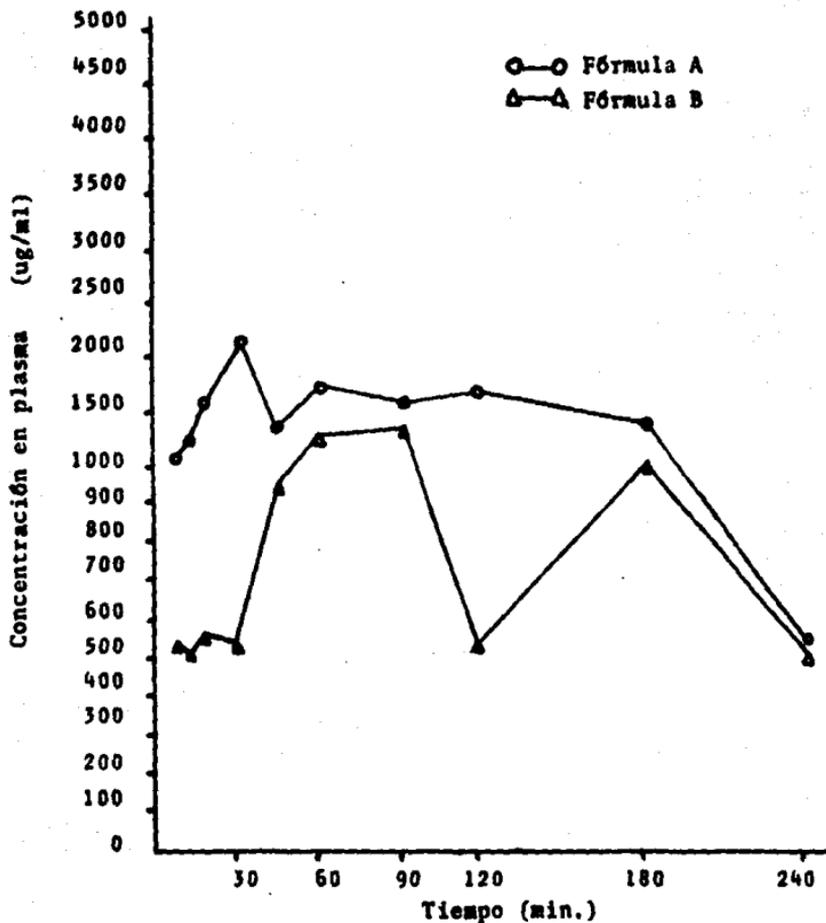
Cont. Tabla 2..... (4)

CONEJO 7			CONEJO 8		
Tiempo	Concentración (ug/ml)		Tiempo	Concentración (ug/ml)	
(min)	Fórmula A	Fórmula B	(min)	Fórmula A	Fórmula B
5	100.6	1225.1	5	1213.1	873.6
10	449.8	59.1	10	1225.8	591.3
15	1787.4	917.3	15	1133.8	699.1
30	3024.3	473.4	30	2059.9	981.5
45	3237.4	420.2	45	1723.8	1013.2
60	2716.6	88.7	60	1463.7	968.8
90	3225.6	556.3	90	1584.2	715.0
120	769.4	432.0	120	940.2	822.9
180	1899.8	396.5	180	734.0	829.2
240	1485.5	1236.9	240	1197.2	1990.3

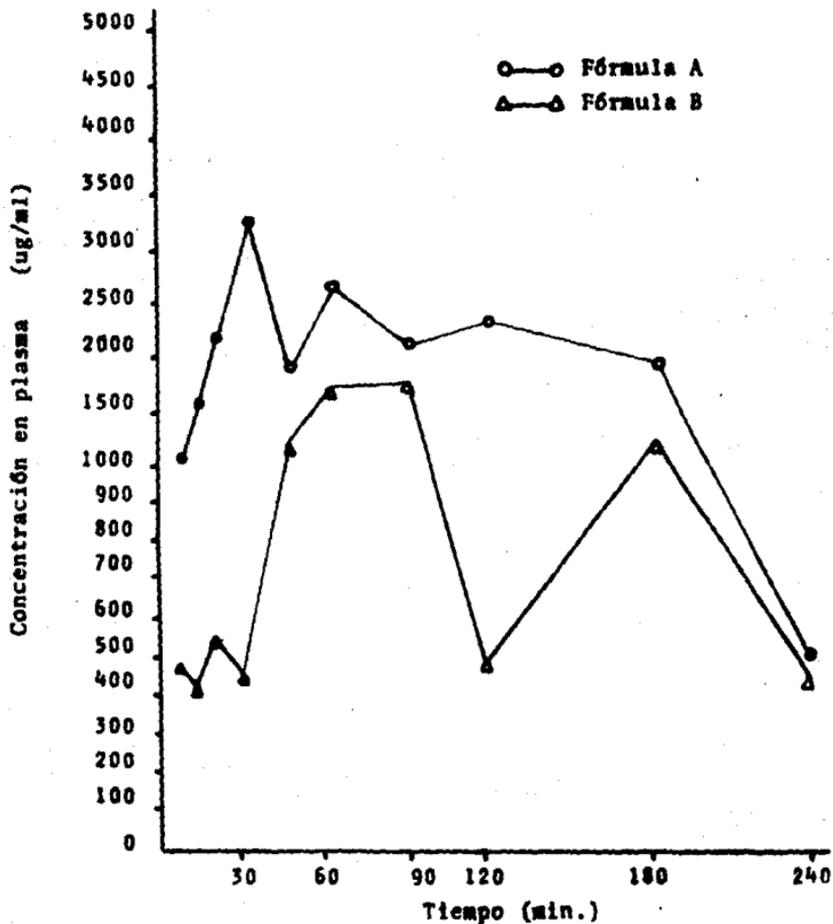
Gráfica 2. Niveles plasmáticos obtenidos en el co nejo 1, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).



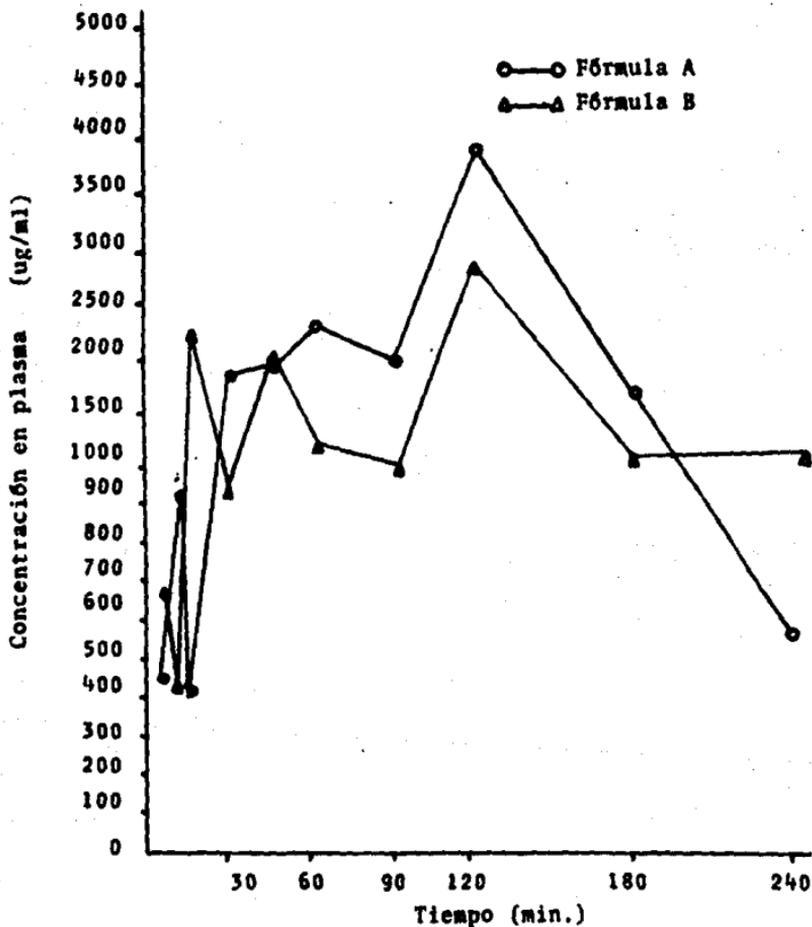
Gráfica 3. Niveles plasmáticos obtenidos en el co nejo 2, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).



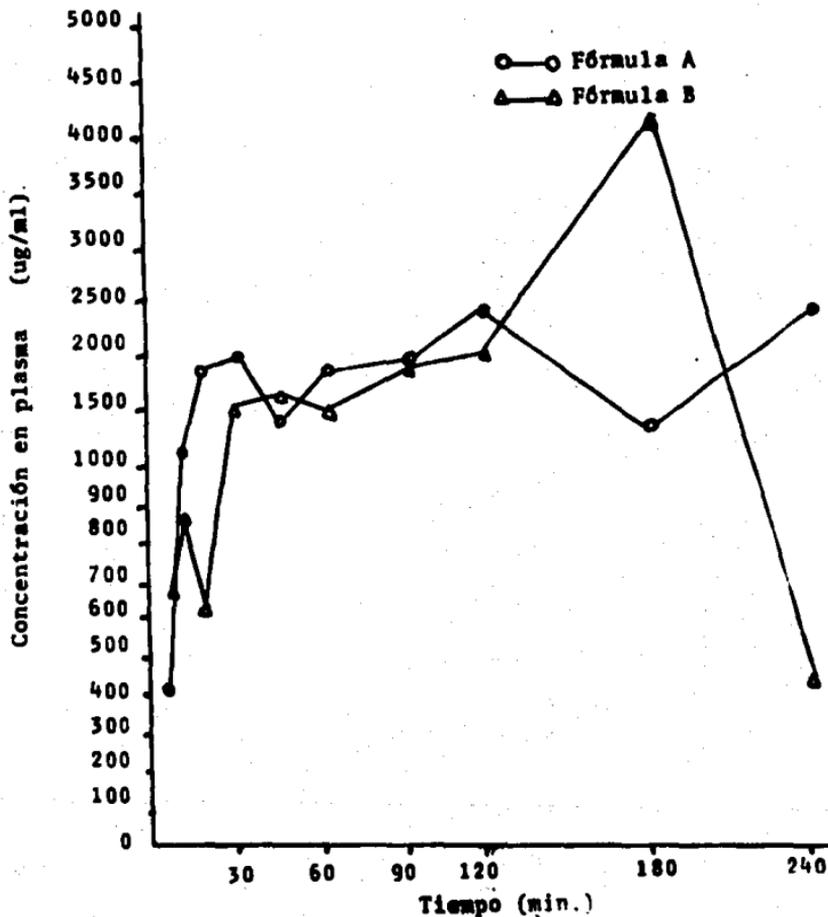
Gráfica 4. Niveles plasmáticos obtenidos en el co
nejo J, después de la administración
de dos formulaciones en cápsula conte
niendo AV (250mg).



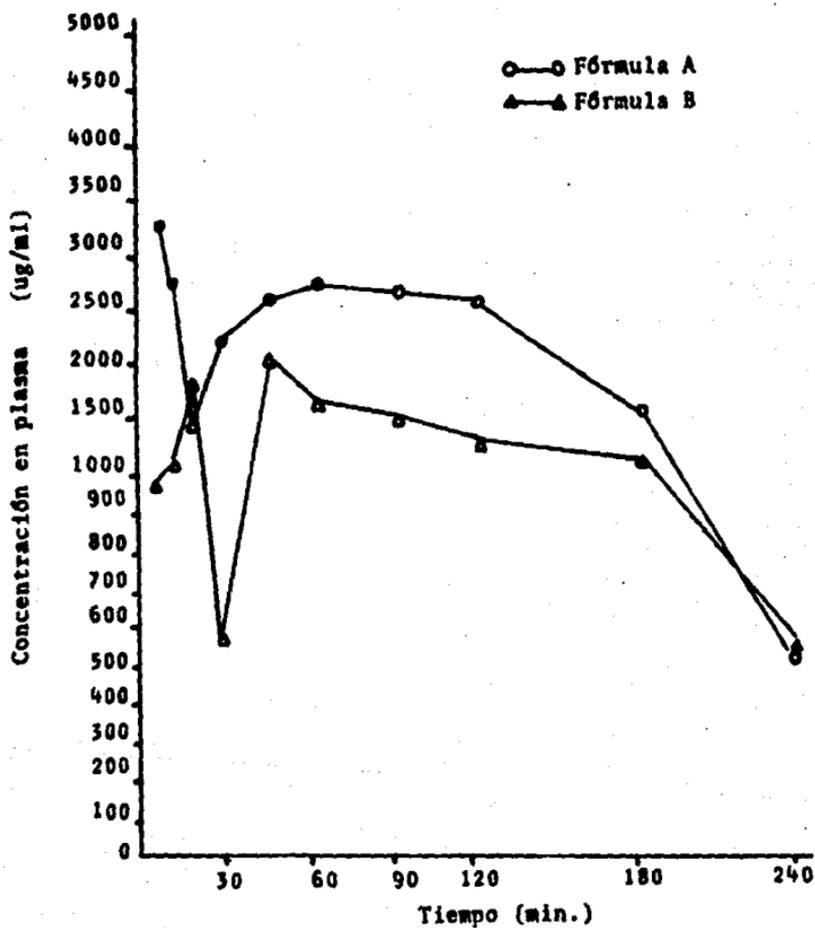
Gráfica 5. Niveles plasmáticos obtenidos en el co nejo 4, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).



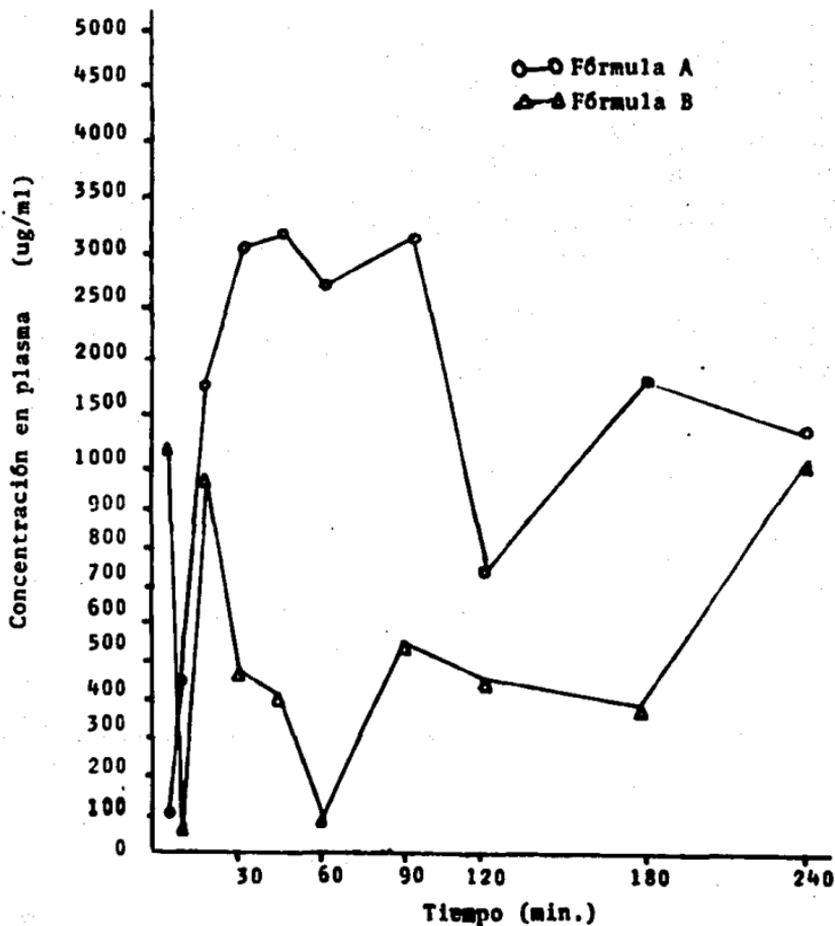
Gráfica 6. Niveles plasmáticos obtenidos en el conejo 5, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).



Gráfica 7. Niveles plasmáticos obtenidos en el conejo 6, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).



Gráfica 8. Niveles plasmáticos obtenidos en el co nejo 7, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).



Gráfica 9. Niveles plasmáticos obtenidos en el co nejo 8, después de la administración de dos formulaciones en cápsula conteniendo AV (250 mg).

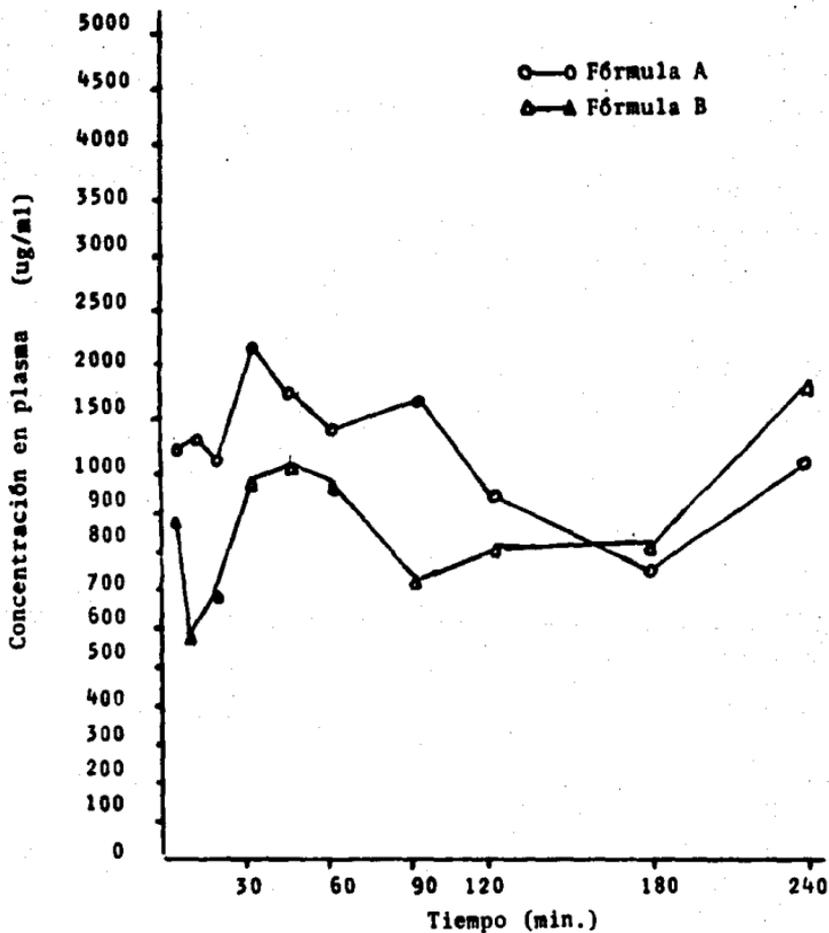


Tabla 3. Area bajo la Curva de concentración del AV en plasma de conejo

Conejo	ABC (ug/ml)		R=B/A	Conc. máx. (ug/ml)		Tiempo máx. (min)	
	Fórmula A	Fórmula B		A	B	A	B
1	5293.52	4146.68	0.78	2394.3	1941.5	30	60
2	5699.28	3314.10	0.58	1768.6	1240.5	60	90
3	8064.44	3937.20	0.48	3397.4	1696.9	30	90
4	7986.89	6015.02	0.75	3961.1	2894.9	120	120
5	7194.50	8401.73	1.16	2469.9	4206.2	240	180
6	8042.53	5046.72	0.62	3223.2	2022.7	5	45
7	7017.49	2132.64	0.30	3237.4	1236.9	45	240
8	4716.81	3899.10	0.82	2059.9	1990.3	30	240

ABC (Area bajo la Curva)

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Existen varios métodos para la determinación del AV en plasma, métodos de extracción como la Cromatografía de gases y la Cromatografía de líquidos de alta---presión (HPLC). (91,92,93)

En este trabajo se utilizó la Cromatografía de---gases por ser una prueba muy sensible y que permite obtener datos más exactos de la concentración en plasma del fármaco que se está utilizando.

Este método ha sido validado con anterioridad---por diversos autores (7,92,94,95) y es por ello que resulta seguro y confiable.

En todas las técnicas de Cromatografía de gases, un estándar interno es necesario para adiccionarlo a la muestra biológica antes de ser analizado, para enfatizar el fármaco; ya que posee características similares a éste. En este caso, el estándar interno que empleamos fue el ácido ciclohexancarboxílico (ACHC) por ser el más comunmente utilizado para pruebas de análisis del Acido Valproico. (93,96,97)

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir, que la técnica de Cromatografía de gases resulta--- apropiada para este tipo de análisis, debido a que es--- sencilla y muy precisa, lo que nos permitió establecer los niveles plasmáticos de AV alcanzados en los conejos.

Debido a la marcada fluctuación de los niveles---- plasmáticos del fármaco, no fue posible la obtención del nivel plasmático óptimo en el conejo, para la determinación de una dosis como terapéutica anticonvulsiva en pequeñas especies; ésta situación pudo deberse a que el medicamento, por poseer características de absorción rápida en el tracto gastrointestinal, no permite, en el conejo, la obtención de una curva de características normales; con una elevación progresiva, una meseta y un declive.

Estas fluctuaciones pueden deberse también a que--- la técnica, independientemente del fármaco, detecte también sus metabolitos, y que por la biotransformación que sufre el fármaco en diversos órganos, se provoque variación en la absorción y que, por lo tanto, varíen los niveles en plasma.

Al observar los datos de concentración máxima, tiempo máximo y área bajo la curva de ambas formulaciones, se concluye que la Formulación "A" (Valprosid^R) tiene valores más altos que la formulación "B" (Depakene^R) y por lo tanto, resultó más biodisponible.

Por la marcada fluctuación de los niveles plasmáticos que resultó en los conejos, no fue posible determinar el nivel plasmático óptimo, lo que hace difícil establecer una dosis terapéutica para el tratamiento de la Epilepsia canina; proponemos entonces, elevar la dosificación empleada en este trabajo, que fue de 80 mg/kg de peso al doble, para obtener niveles plasmáticos más estables.

Otra propuesta sería que se realizaran estos estudios en otra especie de tipo monogástrico (como en el caso del perro) y observar si se presentan este tipo de fluctuaciones de los niveles plasmáticos o si se mantienen estables.

Los resultados en el presente trabajo, demostraron que el conejo no resultó un modelo experimental apropiado debido principalmente a sus características de fisiología digestiva, que por ser lenta, no es compatible con medica

mentos que presentan una absorción-eliminación y curva de vida media cortas, como en el caso del AV, y por esta razón, los resultados son muy variables además de poco confiables.

Otra causa por la que el conejo no resultó un buen modelo experimental, fue que la administración de cápsulas por vía oral, es muy complicada, además de que la toma de muestras sanguíneas por punción cardíaca resulta muy traumática, y aunque el animal resista, quedan secuelas.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- "Apuntes del curso de procedimientos de animales de laboratorio". Instituto Politécnico Nacional. -- Escuela Superior de Medicina. (1984).
- 2.- Barragán R; Legorreta C.: Efectos comparativos del uso del clorhidrato de ketamina contra el tiopental sódico en conejos. U.N.A.M., Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, tesis licenciatura: pág. 4-6 (1986).
- 3.- "Manual de animales de laboratorio". Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Medicina. (1984).
- 4.- Weisbroth, S.H., Flatt, R.E. and Kraus, A.L.: The ---- biology of the laboratory rabbit. Academic press. Nueva York. U.S.A. (1974).
- 5.- Conejos. Manuales para educación agropecuaria. Area: - Producción animal. Edit. Trillas; Méx.: pág. 16.(1984).
- 6.- Blanchard, J.: Gastrointestinal absorption II. Formulation factors affecting drug ----- bioavailability. Am. J. Pharm. 150: 132-151 (1979).
- 7.- Pérez M.E.: Características biofarmacéuticas del anti-convulsivante Valproato de Magnesio. I.P.N.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados
tesis maestría en la especialidad de Farmaco-
logía. (1983).

- 8.- "Diseño de fármacos y formas farmacéuticas". I.P.N.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Sep.-
Oct. (1986).
- 9.- "El manual Merck de diagnóstico y terapéutica". Sépti-
ma edición en español. Merck Sharp & Dohme.
research laboratories. Merck & Co. Inc. Rahway
N.J. (1986).
- 10.- Kirk W. R.: Terapéutica veterinaria. Prácticas de clí-
nica en pequeñas especies. C.E.C.S.A. Méx.
(1985).
- 11.- Niemand, H.G.: Prácticas de clínica canina. C.E.C.S.A.
Méx.: pág. 483. (1987).
- 12.- El manual Merck de veterinaria. Séptima edición, Merck
Sharp & Dohme Co. (1986).
- 13.- Burton B.S.: Ethyl acetoacetate. Am. Chem. J. 3:385-
395. (1881).
- 14.- Oberreit E.: Ber der Deuts. Chem. Ges. 29: (1896).
- 15.- Meunier H, Carraz G, Meunier Y, Eymard P and Airman M:
Propriétés pharmacodynamiques de l' acide n--
dipropilacetique. I propriétés antiepileptiques.
Therapie 18: 435-438. (1963).

- 16.- Carraz G, Fau R, Chateu R y Bonin J.: First clinical trial of the antiepileptic activity of n- -- dipropilacetic acid (sodium salt). Ann. Med. Phisicol. (Parfs) 122: 577-585 (1964).
- 17.- Wilder J.B., Brundi J. y Perchalski J.R.: Valproic acid en"Seizure disorders: A pharmacological approach to tratement", Raven press., Nueva York: 85-91 (1981).
- 18.- Chang L.Z.: Sodium valproate and Valproic acid. "analytical profiles of drug substences", (ed. Florey), vol 8, Academic press., Nueva York: 529-555 (1979).
- 19.- Pinder R.R.M., Brogden, R.N., Speight, T.M. y Avery G.S: Sodium Valproate: A review of its pharmacological propiedades and terapeutic efficacy in Epilepsy. Drugs, 13: 81-123 (1977).
- 20.- Frey, H.H., y Löscher W.: Di-n-propylacetic acid: profile of anticonvulsivant activity in Mice. Arzneim. Forsch. 26: 299-301 (1976).
- 21.- Kupferberg J.H.: Antiepileptic drugs. Sodium valproate. En "antiepileptic drugs: mechanism of action" (eds. G.H. Glasser, J.K Penry y D.M. Woodbury) Raven press. Nueva York, U.S.A: 643-654 (1980).
- 22.- Lockard S.J. y Levy R.H.: Valproic acid: reversibly acting drug. Epilepsia, 17: 477-479 (1976).

- 23.- Lockard S.J, Levy R.H, Congdon C.W, Ducharme L.L y Patel H.I.: Efficacy testing of valproic acid----- compared to ethosuximide in monkey model:II seizure, EEG and diurnal variations. ----- *Epilepsia*, 18: 215-223 (1977).
- 24.- Leviel V. y Naquet R.: A study of valproic acid on the kindling effect. *Epilepsia*, 18: 229-234 (1977).
- 25.- Jeavons P.M, Clarck J.E y Maheshwari M.C.: Treatment of generalized Epilepsies of childhood and adolescence with sodiun valproate ('Epilim') *Develop. med. child. Neurol.* 19: 9-25 (1977).
- 26.- Cabazzuti G.B.: Prevention of febrile convulsion with dipropylacetate (Depakine). *Epilepsia*, 16: 647-648 (1975).
- 27.- Vajda E.J.F, Nihaly W.G, Miles L.J, Donnan A.G y Bladin F.P.: Rectal administration of sodium valproate in status epilepticus. *Neurol*, 28: 897-899 (1978).
- 28.- Broque R.T.: Valproic acid. *Neurol. Engl. J. Med.* 302: 661-666 (1981).
- 29.- Rowan J.A, Binnie D.C, Warfield A.C, Meinardi H y ----- Meijer A.W.J.: The delayet effect of sodium valproate on the photoconvulsive response in man. *Epilepsia*, 20: 61-78 (1979).

- 30.- Shakti A.R., Johnson H.R., Jambie G.D., Melville D.I.
y Nanda N.R.: Comparison of sodium valproate
and phenytoin as single drug treatment in
Epilepsy. *Epilepsia*, 22: 27-33 (1981)
- 31.- Gram L., Wulff K.E., Rasmussen E., Flachs H., Wurtz
Jorgensen A., Sommerbeek W.K. Lohren V.:
Valproate sodium: A controlled clinical trial
including monitoring of drug levels. *Epilepsia*
18: 141-148 (1977).
- 32.- Mei-Jen Liu, Kenneth R., Scott and Gary, M Pollack.:
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of
Valproate analoges in rats. *Epilepsia*, 31,4:
465-473 (1990).
- 33.- Turner J.A., y Whittle R.S.: Sodium valproate, GABA
and epilepsy. *Trends in pharmacological
sciences*. 1: 257-260 (1980).
- 34.- Undefried S.: Identification of gamma-aminobutyric
acid in brain by the isotope derivate
method. *J. Biol. Chem.* 187: 65-69 (1950).
- 35.- Roberts E. y Frankel S.: Aminobutyric acid in brain:
its formation from glutamic acid. *J. Biol.
chem.* 187: 55-62 (1950).
- 36.- Killiam F.K. y Bain A.J.: Convulsant hydrazides II:
Electrical changes and enzyme inhibition
induced by the administration of -----

- thiosemicarbazide. *J. Pharm. Exp. Ther.* 119:
263-271 (1957).
- 37.- Tower B.D.: Glutamic acid and gamma-aminobutyric acid
in seizures. *Clin. Chem. Acta.* 2: 397-402
(1957).
- 38.- Hawkins E.J.: On the efficacy of asparagine, glutamine
gamma-aminobutyric acid and 2-pyrrolidone in
mice. *Clin. Acta.* 2: 481-484 (1957).
- 39.- Da Vanzo J.P., Graig M.E. y Cronin M.A.: Anticonvulsiv
vant propiedades of amino-oxiacetyl acid. *Am.
J. Physiol.* 201: 833-837 (1961).
- 40.- Kerwin W.R. y Taverner B.P.: The mechanism of action of
sodium valproate. *Gen. Pharm.* 12: 71-75 (1981)
- 41.- Godin Y, Heiner L, Mark J. y Mandel P.: Effects of di-
n-propylacetate, and anticonvulsive compound
on GABA metabolism. *J. Neurochem.* 16: 869---
873 (1969).
- 42.- Ciesielski L., Maitre M, Cash C y Mandel P.: Regional
distribution in brain and effect on cerebral
mitochondrial respiration of the -----
anticonvulsive drug n-dipropylacetate. *Bioch.
Pharm.* 24: 1055-1058 (1975).
- 43.- Löscher W.V. y Frey H.H.: Zum Wirkungsmechanismus
von valproinsäure. *Arzneim. Forsch.* 27: 1081-
1082 (1977).

- 44.- Harvey P.K.P., Bradford F.H. y Davison N.A.: The inhibitory effect of sodium n-dipropylacetate on the degradative enzymes of the GABA shunt. FEDS Lett. 52: 251-254 (1975).
- 45.- Anlezark G., Horton R.W., Meldrum B.S y Sawaya M.C.B.: Anticonvulsivant action of ethanolamine-o-sulfate and di-n-propylacetate and the metabolism of gamma-aminobutiric acid (GABA) in mice with audiogenic seizures. Biochem. Pharm. 25: 413-417 (1976).
- 46.- Van Der Lan W.J., de Voer T. y Bruinvels J.: Di-n-propylacetate and GABA degradation: preferential inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase and indirect inhibition of GABA transaminase. Neurochem. 32: 1769-1780 (1979).
- 47.- Whittle R.S. y Turner J.A.: Effects of the anticonvulsant sodium valproate on gamma-aminobutiric acid and aldehyde metabolism in ox brain. J. Neurochem. 31: 1453-1459 (1978).
- 48.- Lust W.D., Kupferberg H.J., Passoneau J.V. y Penry J. K.: On the mechanism of action of sodium valproate: The relation on GABA and the cyclic GMP levels to anticonvulsivant activity. En

"clinical and pharmacological aspects of sodium valproate ('Epilem') in the treatment of epilepsy" (Ed. Legg, N.J.), MCS consultants, Tumbridge Wells. England. 123-129 (1976).

- 49.- Schechter J.P., Trayner Y y Grave J.: Effect of di-n-propylacetate on amino acid concentrations in mouse brain: correlations with anticonvulsant activity. *Neurochem.* 31: 1325-1327 (1978).
- 50.- Kukino K. y Deguchi T.: Effects of sodium dipropylacetate on gamma-aminobutyric acid and biogenic amines in rat brain. *Chem. Pharm. bull.* 25: 2257-2262 (1977).
- 51.- Löscher W.: GABA in plasma and cerebrospinal fluid of different species. Effects of gamma-acetylenic GABA, gamma-vinyl GABA and sodium valproate. *J. Neurochem.* 32: 1587-1591 (1979).
- 52.- Schobben A.: Pharmacokinetics and therapeutics in Epilepsy. Tesis doctoral, Universidad de Nimega, Países Bajos. 125-153 (1979).
- 53.- Löscher W.: Anticonvulsant activity of metabolites of valproic acid. *Arch. Int. Pharmacodin.* 249: 158-163 (1981).
- 54.- Loiseau P, Brachet A. y Henry P.: Concentration of dipropylacetate in plasma. *Epilepsia*, 16:

609-615 (1975).

- 55.- Meijer J.W. y Kalff R.: Less usual ways of administering antiepileptic drugs. En "clinical pharmacology of antiepileptic drugs" Springer Verlag, Berlín-Heidelberg, Nueva York 222-226 (1975).
- 56.- Sonnen A.E.H., Blom G.F. y Meijer J.W.A.: Enteric coated dipropylacetate (Depakine^R). En "clinical pharmacology of antiepileptic drugs" Springer Verlag, Berlín-Heidelberg, Nueva York 229-234 (1975).
- 57.- Reeckers-Ketting J.J, Van der Kleijn E, Leliveld A.B, Schobben M.A.F.A. y Vree T.B.: Pharmacokinetics and metabolism of the antiepileptic drug sodium valproate (Epilim, Depakine). Bonn, Scheltema & Holkema, Utrecht 40-44 (1977).
- 58.- Jordan J.B, Orwin M.J, Nicholson D.J. y Henson R.: The bioavailability of sodium valproate from three Epilim^R formulations. En "pharmacokinetics and metabolism of antiepileptic drug sodium valproate (Depakine^R, Epilim^R)". Bonn, Scheltema & Holkema, Utrecht, 10-13 (1977).

- 59.- Oelkers W.V, Stoffels G, Schafer H. y Reith H.: Zur enteralen resorption van valproinsäure. *Arzneim. Forsch.* 27: 1088-1090 (1977).
- 60.- Klotz U, y Antonin H.K.: Pharmacokinetics and bioavailability of sodium valproate. *Clin. Pharm. Ther.* 21: 736-743 (1977).
- 61.- Perucca E, Gatti G, Frigo G.M, Crema A, Calzetti S. y Visintini D.: Disposition of sodium valproate in epileptic patients. *Br. J. Clin. Pharm.* 5: 495-500 (1978).
- 62.- Loiseau P, Cenraud B, Morselli L.P. y Brachet-Lierman A.: La biodisponibilité du valproate de sodium est modifiée para l'alimentation. *Nouv. Presse med.* 8: 2202-2203 (1979).
- 63.- Levy H.R, Cenraud B, Loiseau P, Akbaraly R, Brachet-Lierman A, Guyot M, Giomani R y Morselli L.P.: Meal dependent absorption of enteric-coated sodium valproate. *Epilepsia.* 21: 273-280 (1980)
- 64.- Schmidt D.: Fluctuation of dipropylacetate plasma levels with one and three daily doses. En "pharmacokinetics and metabolism of the antiepileptic drug sodium valproate (Depakine^R, Epilim^R)". Bonn, Scheltema & Holkema, Utrecht, 22-23 (1977).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 65.- Johannensen I.S, Hendriksen O.: Serum levels of di-n-propylacetate in epileptic patients. En " Pharmacokinetics and metabolism of the antiepileptic drug sodium valproate (Depakine^R, Epilin^R)". Bonn, Scheltema & Holkema, Utrecht, 24-26 (1977).
- 66.- Wulff K, Flachs H, Wurtz-Jorgensen A, y Gram L.: Clinical pharmacological aspects of v valproate sodium. *Epilepsia*. 18: 149-157 (1977).
- 67.- Schobben F, Van der Kleijn E. y Gabreels F.J.N.: Pharmacokinetics of di-n-propylacetate in epileptic patients *eur. J. Clin. Pharm.* 8: 97-105 (1975).
- 68.- Levy R.H, Lockard J.S, Patel I.H. y Congdon C.W.: Time-dependent kinetics III: Diurnal oscillations in steady-state plasma valproic acid levels in Rhesus Monkeys. *J.Pharm. Sci.* 66: 1154-1156 (1977).
- 69.- Gugler R, Schell A, Eichelbaum M, Frosher W, y Schultz H.V.: Disposition of valproic acid in man. *Eur. J. Clin. Pharm.* 12: 125-132 (1977).
- 70.- Brachet-Lierman A, Demarquez J.L.: Pharmacokinetics

of dipropylacetate in infants and young children. En "Pharmacokinetics and metabolism of the antiepileptic drug sodium valproate (Depakine^R, Epilim^R)". Bonn, Scheltema & Holkema-Utrecht, 27-31 (1977).

- 71.- Swanson B.N, Harland R.C, Dickinson R.G. y Gerber N.: excretion of valproic acid in to semen of rabbit and man. *Epilepsia*, 19: 541-546 (1978).
- 72.- Gugler R y Von Onruh E.G.: Clinical pharmacokinetics of valproic acid. *Clin. Pharm.* 5: 67-83 (1980)
- 73.- Eymar P., Simian J, Teoule R, Polverelli M, Werbenee J.P. y Broll M.: Etude de la repartition et de la résorption du dipropylacetate de sodium marqué au 14C chez le rat. *J. Pharm.(Paris)*, 2: 359-368 (1971).
- 74.- Kukino K, y Matsumoto I.: Studies on the absorption, excretion and biotransformation of a new anticonvulsivant drug, dipropylacetate acid. *J. Kurume Med. Assoc.* 34: 369-379 (1971).
- 75.- Kukahara T. y Matsumoto I.: Metabolism of branched medium chain length fatty acids I. W----- Oxidation of sodium dipropylacetate in rats. *Biomed. Mass. Spectrom.* 1: 291-294 (1974).

- 76.- Ferrandez B, y Eymard P.: Metabolism of valproate sodium in rabbit, rat, dog and man. *Epilepsia*. 18: 591-602 (1977).
- 77.- Monaco F, Piredda S, Mutani R, Mastropaolo C, y Tondi M.: The free fraction of valproic acid in tears, saliva and cerebrospinal fluid. *Epilepsia*. 23: 23-26 (1982).
- 78.- Matsumoto I., Kukahara T., y Yoshino M.: Metabolism of branched medium chain length fatty acids II. W-Oxidation of sodium dipropylacetate in rats. *Biomed. Mass. Spectrom.* 3: 235-240 (1976).
- 79.- Kochen W, Imbeck H, Jacobs C.: Untersuchung uber die ausscheidung von metaboliten der valproinsäure im urin der ratte und des Menschen. *Arzneim. Forsch.* 27: 1090-1099 (1977).
- 80.- Gompertz D, Tippet P, Martlett K, Bailie T.: Identification of urinary metabolites of sodium dipropylacetate in man: potential sources of interference in organic acid screening procedures. *Clin. Chim. Acta.* 74: 153-160 (1977).
- 81.- Schäfer H, Lürs R.: Metabolite pattern of valproic acid. *Arzneim. Forsch.* 28: 657-662 (1978).

- 82.- Schobben A.: Pharmacokinetics and therapeutics in
Epilepsy. tesis doctoral, Universidad de Ni
mega, Países Bajos, 148-153 (1979).
- 83.- Jakobs C, Löscher W.: Identification of metabolites of
valproic acid in serum of humans, dog, rats
and mouse. *Epilepsia*. 19: 591-602 (1978).
- 84.- Dowling J.: Hepatitis a in three patients taking
sodium valproate. *Lancet*. 28: 963-964 (1984).
- 85.- Laub M.C.: Nutritional influence on serum ammonia in
young patients recieving sodium valproate.
Epilepsia. 27 (1): 55-59 (1986).
- 86.- Valproate: Chemistry and methods of determination.
antiepileptic drugs. Raven press, L.T.D.,
Nueva York, (1989).
- 87.- Nau H, Löscher W.: Valproic acid and metabolites:
Pharmacological and toxicological studies.
Epilepsia, 25 (suppl 1): 514-522 (1984).
- 88.- Ater S.B., Swinyard E.A., Tolman K.G, Matsen J.A. y
Matsuo F.: Effects of SKF525A, phenobarbital,
Fasting and carnitine on the anticonvulvant
activity and neurotoxicity of valproate in
mice. *Epilepsia*, 25 (5): 599-604 (1984).
- 89.- Conn & Stumpf.: "Bioquímica fundamental", tercera edi
ción, Limusa, Méx., 585-587 (1984).

- 90.- **Organis Chemistry of life. Readings from scientific American. W.H. Freeman and Co. San Fco., Cal. U.S.A. 347- (1973).**
- 91.- **Bialer, Friedman and Rubinstein. Rapid chromatographic assay for monitoring of valproic acid and valproamide in plasma: J. Pharm. Sci. 73 (7): 991-992 (1984).**
- 92.- **Calendrillo B.A, Reynoso G.: A micromethod for the on column methylation of valproic acid by gas-liquid chromatography. J. Anal. Toxicol. 4: 272-274 (1984).**
- 93.- **Chan S.C.: Monitoring serum valproic acid by gas--- chromatographic with elect on capture detection. Clin. Chem. 26: 1528-1530 (1980).**
- 94.- **Kumps A, Mardens Y.: Simplified simultaneous determination of valproic acid and ethosuccimide by gas-chromatography. Clin. Chem. 26: 1759- (1980).**
- 95.- **Odusate K.A., Serwin A.L.: A simple, direct extration method for gas-liquid determination of valproic acid in plasma. Ther. drug monitor. 3: 103-106 (1981).**
- 96.- **Escobedo R.A.J.: Revisión bibliográfica del anticonvulsivante ácido valproico. Tesis licenciatura**

I.P.N. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
cas. 14 (1987).

- 97.- Pena M.J.A.: Rapid gas-chromatography determination of valproic acid in serum. *J. Chromatog.* 225: 459-462 (1981).