



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



381

EXAMEN DE PROMOCIONALES  
FAC. DE QUIMICA

VIGILANCIA DE LOS NIVELES PLASMATICOS DE  
5, 5 - DIFENILHIDANTOINA EN NIÑOS EPILEPTICOS  
UTILIZANDO COMO METODO ANALITICO LA  
CROMATOGRAFIA DE GAS LIQUIDO.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
CLAUDIO MANUEL LEZAMA DAVILA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:**

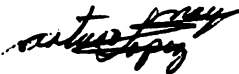
<b>PRESIDENTE:</b>	<b>PROF:</b>	<b>ENRIQUE CALDERON GARCIA</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>PROFA:</b>	<b>ANA MARIA MENDEZ CHAVEZ</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>PROF:</b>	<b>ARTURO LOPEZ ANAYA</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>PROFA:</b>	<b>HELGI JUNG KOOC</b>
<b>2°. SUPLENTE:</b>	<b>PROF:</b>	<b>RUBEN VARELA TORRES</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**DEPARTAMENTO DE QUIMICA FARMACEUTICA Y PRODUCTOS NATURALES, -  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO, FACULTAD DE QUIMICA U N A M**

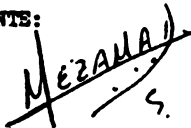
**LABORATORIO DE INMUNOQUIMICA, HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO**

**ASESOR DEL TEMA:**



**M. EN C. ARTURO LOPEZ ANAYA**

**SUSTENTANTE:**



**CLAUDIO MANUEL LEZAMA DAVILA**

**DEDICATORIA:**

**A mi madre, la Sra. MARIA ELENA DAVILA FIGUEROA  
con profundo cariño y gratitud, quien a base de  
esfuerzo hizo posible que alcanzara una de las  
metas más importantes en mi vida.**

**A LA MEMORIA DEL CAP. P. A.**

**GUILLEMO JARA HERRERA**

**CON CARINO Y GRATITUD A MI HERMANO:**

**DR. JOSE LUIS LEZAMA DAVILA**

**PARA MIS HERMANOS:**

**JOSE LUIS  
MARIA ELENA  
ROBERTO  
MARIA DOLORES  
MARIA DEL CARMEN  
MARIA DEL CONSUELO  
PABLO GUILLERMO**

**Mi más sincera gratitud para:**

**M. EN C.   ARTURO LOPEZ ANAYA**  
**DR.        CESAR CHAVARRIA BONEGUI**  
**DR.        FERNANDO GARCIA TAMAYO**  
**DRA.       GRACIELA OLMOS GARCIA**  
**DR.        FERNANDO VALAREZO CRESPO**  
**QUIM.      PILAR FERNANDEZ FERNANDEZ**  
**SR.        RICARDO ESCOBEDO BUSTOS**  
**M. EN C.   ANGELICA DORANTES GUEVARA**  
**DRA.        OPELIA ESPEJO DE OCHOA**  
**DR.        ADOLFO REYES RAMOS**  
**PROFA.     EVANGELINA VELAZQUEZ**  
**SRA.       DOLORES RODRIGUEZ DE LEZAMA**  
**SR.        RAUL FERNANDEZ GARCIA**

**Con la firmeza de su apoyo,  
sus valiosos consejos y su  
inapreciable cariño, contri  
buyeron a hacer posible el  
desarrollo y culminación de  
este trabajo.**



- I N D I C E -

	Pág.
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
GENERALIDADES	3
2.1 Descripción y etiología de la epilepsia	3
2.2 Diagnóstico y tratamiento de la epilepsia	5
2.3 Régimen de dosificación individual en pacientes - que reciben tratamiento con 5,5-Difenilhidantofna	8
2.4 Descripción y aspectos generales de la 5,5-Difenil_ hidantofna	10
CAPITULO III	
PARTE EXPERIMENTAL	12
3.1 Selección de pacientes	12
3.2 Método analítico "CROMATOGRAFIA DE GASES"	13
3.21 Reactivos	13
3.22 Equipo empleado	14
3.23 Preparación de la columna y empaçado	14
3.24 Preparación de soluciones	15
3.25 Procedimiento de extracción de DFH en plasma	16
3.26 Procedimiento de extracción de DFH en saliva	16
3.27 Condiciones del cromatógrafo	17
3.3 Linealidad y reproducibilidad del método analítico	17

<b>CAPITULO IV</b>	<b>Pág.</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
4.1 Selección de pacientes	19
4.2 Método analítico	19
4.3 Linearidad del método analítico	20
4.4 Reproducibilidad del método analítico	20
4.5 Resultados del análisis de muestras de pacientes	22
4.6 Resultados de un estudio realizado en un voluntario sano después de la ingestión de 300 mg de — 5,5-Difenilhidantoina por vía oral	22
 <b>CAPITULO V</b>	
<b>ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>23</b>
5.1 Método analítico	23
5.2 Relación dosis - concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina	24
5.3 Relación concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina-incidencia de convulsiones	24
5.4 Relación concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina-evolución del trazo electroencefalográfico	26
5.5 Relación concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina-concentración salival de 5,5-Difenilhidantoina en un voluntario	28
 <b>CAPITULO VI</b>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>

**CAPITULO VII**

**BIBLIOGRAFIA**

# C A P I T U L O I

## INTRODUCCION

El objetivo de este trabajo surge con la necesidad de ofrecer un tratamiento más adecuado a pacientes epilépticos, de acuerdo a la información disponible, se calcula que en nuestro país existen aproximadamente 630,000 epilépticos, de los cuales 275,000 carecen de un control de sus crisis convulsivas ( 25 ).

En los últimos años se ha demostrado la importancia de establecer la vigilancia de los niveles sanguíneos de fármacos anticonvulsivos con el objeto de incrementar la eficacia y seguridad de la farmacoterapia, detectando y corrigiendo las fallas terapéuticas ( 31 ), sin embargo, la experiencia en otros países reconoce que el mejor resultado del control de crisis convulsivas en pacientes epilépticos, se obtiene cuando se combina el juicio clínico con la información de laboratorio ( 23 ).

La 5,5-Difenilhidantoina ( DFH ), es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la epilepsia de gran mal y epilepsia psicomotora. Para la determinación de la 5,5-Difenilhidantoina en plasma, inicialmente se utilizaron métodos espectrofotométricos; actualmente se cuenta con varios métodos como el de cromatografía de gas líquido, que ofrece la ventaja de mayor especificidad, reproducibilidad y sensibilidad apropiados para determinar niveles plasmáticos de 5,5-Difenilhidantoina, después de su administración a dosis normales. Se ha establecido que el índice terapéutico de 5,5-Difenilhidantoina, en pacientes epilépticos de otros países, es de: 10 - 20 mcg/ml para adultos y 5 - 20 mcg/ml o de 12 - 25 mcg/ml en niños ( 29 ).

La experiencia general del estudio de la vigilancia de los niveles

plasmáticos de 5,5-Difenilhidantoina indica, que en forma individual hay una correlación entre la dosis administrada, el nivel plasmático, efecto terapéutico y ciertos efectos tóxicos ( 31, 16, 23, 22, ). Sin embargo estas relaciones deben tomar en cuenta las variaciones biológicas que origina una farmacocinética individual y por lo tanto características farmacodinámicas diferentes entre un paciente y otro. Las relaciones son reproducibles en un paciente ya que bajo un régimen de dosificación se alcanzan las concentraciones de mantenimiento y al — cambiar la dosis se induce una caída o incremento del nuevo nivel. — Existen algunos factores que modifican los niveles plasmáticos de — 5,5-Difenilhidantoina, como una precaria absorción o un rápido metabolismo, además algunos otros fármacos que se suministren durante el — tratamiento, pueden alterar la concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina, por ejemplo: el disulfiram, isoniazida, cloramfenicol, dicumarol, incrementan la concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina ( 34 ).

En este trabajo se estudiará la relación entre dosis prescrita y concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina ( DPH ), la relación — concentración plasmática y efecto terapéutico, la relación concentración plasmática y evolución del trazo electroencefalográfico, en pacientes epilépticos que reciben tratamiento únicamente con 5,5-Difenilhidantoina, así como la relación entre la concentración plasmática y salival de 5,5-Difenilhidantoina en un voluntario sano. Los niveles plasmáticos de 5,5-Difenilhidantoina deben vigilarse debido a los múltiples trastornos que origina cuando se mantienen concentraciones tóxicas en la sangre durante cierto tiempo, si las concentraciones plasmáticas de 5,5-Difenilhidantoina son subterapéuticas no se ofrece un control adecuado de las crisis convulsivas en pacientes epilépticos.

## C A P I T U L O    I I

### GENERALIDADES

#### 2.1) DESCRIPCIÓN Y ETIOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

La epilepsia es el más importante de los desórdenes convulsivos, por lo que la mayoría de las investigaciones experimentales y clínicas sobre convulsiones, se han enfocado al estudio de la naturaleza y tratamiento de este síndrome. La epilepsia puede ser definida como una disrritmia cerebral paroxística, autosustentada y autolimitada, caracterizada por descarga electroencefalográfica excesiva, con perturbación de la conciencia y puede asociarse o no con movimientos corporales o hiperactividad del sistema nervioso autónomo.

Una de las clasificaciones más conocidas de la epilepsia es la siguiente: gran mal, triada del pequeño mal (Picnoepilepsia, sacudidas mioclonicas, ataques acinéticos) y epilepsia psicomotora.

Cada uno de estos síndromes de la epilepsia presenta un cuadro bastante característico y una forma típica del electroencefalograma durante y entre los ataques, y responde a cierta clase de fármacos ( 42 ).

Se han dedicado muchos estudios a la naturaleza del foco convulsivo; generalmente se cree que el foco convulsivo es un conjunto de neuronas patológicas que descargan excesivamente aún en condiciones normales de esfuerzo. Sin embargo es posible que el foco convulsivo sea un área anteriormente lesionada en la que las neuronas más pequeñas y vulnerables de la red nerviosa han sido destruidas, esto originaría una región hiperactiva estable, desprovista de su mecanismo inhibitorio interno, — que evitaría la necesidad de invocar esfuerzos anormales como causa de los ataques y está de acuerdo con la experiencia clínica de que bastantes pacientes epilépticos tienen ataques durante muchos años sin que pueda demostrarse en ellos una lesión neurológica progresiva ( 42 ).

Puesto que las lesiones que originan los ataques son constantes y - las convulsiones intermitentes, se han investigado los factores re- presivos y precipitantes que pueden influir en la actividad del fo- co epileptógeno, entre ellos se encuentran: la concentración de glu- cosa en la sangre, de los gases sanguíneos, el pH del plasma, la - composición electrolítica y la presión osmótica total de los liqui- dos extracelulares, los trastornos endocrinos, la desnutrición, etc, para citar algunos ejemplos clínicos encontramos reportes que indi- can, que la cetosis puede ser benéfica en el tratamiento de la epi- lepsia, la hipocapnia producida por hiperventilación puede provocar ataques del pequeño mal. La deficiencia de piridoxina en los lactan- tes puede causar convulsiones epileptiformes, la ingestión excesiva de agua puede precipitar el gran mal, así son muchos los factores - que entran en juego para que el cerebro predispuesto por las lesio- nes o defectos hereditarios, presente actividad convulsiva (42, 43, 20).

Las crisis epilépticas, son ocasionadas por diferentes causas, entre las que se encuentran: los traumatismos, infecciones, intoxicación por óxido carbónico, alcohol o morfina, la arterioesclerosis, los - tumores cerebrales, el hidrocéfalo, absceso cerebral, parálisis pro- gresiva, sífilis cerebral, parálisis cerebral infantil, meningitis, esclerosis múltiple. En tales casos se denomina epilepsia sintomáti- ca (ya que sí se ha encontrado una lesión causal) ( 42 ).

En aquellos casos donde no se demuestre una causa primitiva, se de- nomina epilepsia idiopática (denominada también genuina, esencial, verdadera, elemental o constitucional). En ambos casos, está indica- do un tratamiento medicamentoso y dietético; en el primer grupo, en algunos casos puede ser emprendida una terapéutica causal, mientras

que en el segundo grupo es decir, en la epilepsia idiopática, está indicado un tratamiento medicamentoso y dietético.

## 2.2) DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA

### CONSIDERACIONES DIAGNOSTICAS ASOCIADAS CON LA EDAD

Cuando las crisis convulsivas aparecen en la infancia, se ha encontrado que en un 50% de los casos se asocia con retardo mental o daño cerebral, con frecuencia no puede determinarse la patología precisa durante la vida del paciente a menos que se demuestre algún defecto en el desarrollo cerebral o lesión durante el nacimiento, en una pequeña proporción de casos un error metabólico, hematoma subdural, enfermedad neuronal degenerativa o algún otro proceso de deterioro previamente adquirido. El mismo factor que propicia las crisis convulsivas en la infancia, continúa proporcionándolas hasta la adolescencia y disminuyen hasta cierto punto; las crisis convulsivas debidas a una lesión en el nacimiento usualmente se presentan 24 meses después de la lesión aunque pueden retardarse hasta la adolescencia. Las crisis convulsivas que aparecen como una secuela de meningitis u otra infección también pueden retardarse (17), después del segundo año de vida, las crisis convulsivas de causa desconocida rápidamente incrementan su incidencia, incluyendo los casos de la llamada epilepsia genética, el registro electroencefalográfico y la historia clínica del paciente establecen el diagnóstico, estos casos de epilepsia de causa desconocida, -- probablemente se deben a la coincidencia de factores genéticos y patología cerebral debida a otros factores. En la infancia es más frecuente encontrar casos de epilepsia de gran mal, crisis focales y crisis motoras.

### CONSIDERACIONES DIAGNOSTICAS ASOCIADAS CON EL TIPO DE CRISIS

GRAN MAL. En el gran mal de epilepsia se desencadenan crisis con--



vulsivas generalizadas, de un aura no específica que frecuentemente se le dificulta al paciente su descripción y referida con frecuencia al epigastrio, ocurre en ciertos pacientes pero su localización no tiene valor práctico. Ocasionalmente la duración de la inconciencia puede ser corta y las fases características tónica o clónica - pueden abreviarse o ausentarse. La epilepsia de gran mal, con frecuencia puede confundirse con otro tipo de crisis de corta duración, cuando se presenta una crisis de gran mal, una vez que termina, el paciente presenta dolor de cabeza, confusión mental y somnolencia.- Una vez que se han presentado las crisis convulsivas, deberá instruirse al paciente que debe comunicar al médico acerca de las características del ataque como son: mordedura de la lengua, incontinencia fecal o urinaria, o un posterior dolor muscular generalizado. Los detalles del aura y del periodo posterior a las crisis convulsivas sólo pueden ser relatados por el paciente y tiene un considerable valor diagnóstico. Las crisis de gran mal son las más frecuentes en todos los grupos de edades, y resultan de una lesión en alguna parte de la corteza cerebral, o en la epilepsia genética. Las crisis de gran mal, se presentan con un aura focal específica y son consideradas como crisis focales que empiezan a generalizarse.

**CRISIS FOCALES.** Las descargas durante los ataques epilépticos pueden permanecer razonablemente bien confinadas al área de la corteza en que se originan. Las crisis focales pueden durar de uno a dos minutos, por horas o continuar hasta días. La conciencia no se pierde a menos que la descarga, durante la crisis, se propague a todo el cerebro, esto puede suceder algunas veces como resultado de una crisis de gran mal fragmentaria. Las crisis focales son una fuerte evidencia de un daño cerebral estructural en todas las edades, asimismo puede ser ocasionalmente causada por factores metabólicos como -

hipoglucemia o hipocalcemia.

**CRISIS PSICOMOTORAS.** Ocurren en un 30% de los niños epilépticos e incrementa en frecuencia durante la adolescencia y en la vida adulta. Típicamente este tipo de crisis está compuesta por tres fases: fase de aura, fase corporal y fase postictal (posterior a la crisis). En la fase de aura, se presentan características típicas del lóbulo temporal, por ejemplo: alucinaciones, temor, etc., y el paciente usualmente puede relatarlo en detalle. Durante la fase corporal, el paciente usualmente presenta amnesia completa, durante la fase postictal, el paciente presenta somnolencia, confusión mental y dolor de cabeza. La descripción del aura y la fase postictal, por parte del paciente y la descripción de la fase corporal, por parte de un observador, proporcionan un auxilio diagnóstico. Las crisis psicomotoras son usualmente debidas a una lesión estructural en uno o ambos lóbulos temporales, la esclerosis temporal es la patología más común, las crisis psicomotoras pueden aparecer como consecuencia de un trauma postnatal, el desarrollo de un tumor cerebral o una malformación vascular, Bray y Wiser ( 17 ), han documentado la ocurrencia ocasional familiar de crisis psicomotoras. El electroencefalograma en cada una de las crisis anteriormente descritas, tiene un importante poder diagnóstico, cuya interpretación queda en manos de especialistas en electroencefalografía.

#### **PRINCIPIOS DE LA TERAPIA**

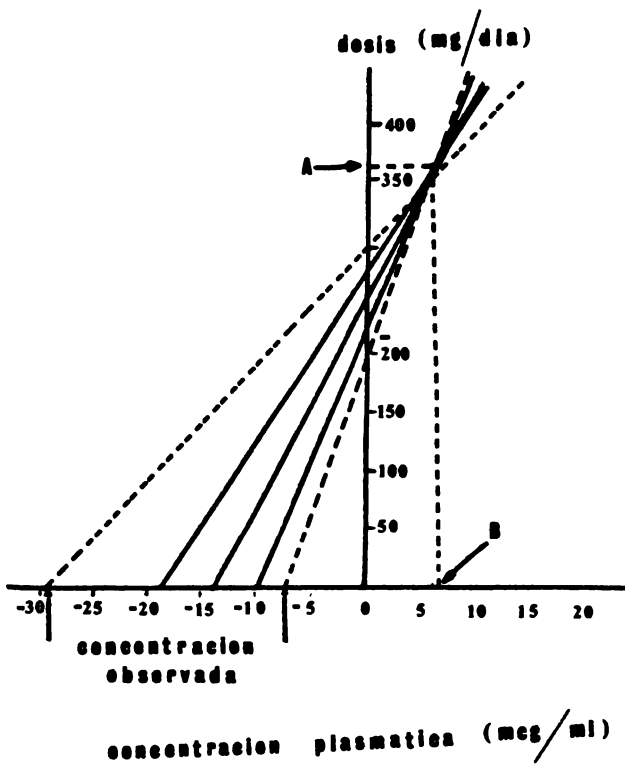
En la epilepsia el adecuado control sintomático de los pacientes es muy importante debido a las enormes implicaciones psicológicas, sociales y económicas en los pacientes; por lo tanto una adecuada terapia debe encaminarse hacia un absoluto control de las crisis convulsivas, desafortunadamente en otros países, esto último sólo ha -

sido posible lograrlo en un 50% a 70% de los pacientes epilépticos, siendo que en nuestro país esta cifra es todavía menor, por lo que debe darse una especial atención a los detalles de la farmacoterapia. Una vez establecido el diagnóstico de epilepsia de gran mal, epilepsia psicomotora o epilepsia focal, la terapia se inicia con la prescripción de un fármaco anticonvulsivo, si después de cierto tiempo de ingerir el anticonvulsivo, las crisis son adecuadamente controladas, no se prescribe un segundo anticonvulsivo, pero si es to no sucede, se recomienda combinar la farmacoterapia; generalmen te se inicia con 5,5-Difenilhidantoína y en su caso se combina con fenobarbital o primidona. Un aspecto muy importante que debe ser - contemplado durante el tratamiento, es el establecimiento de un régimen de dosificación adecuado, vigilando que la concentración del fármaco anticonvulsivo se conserve dentro del índice terapéutico.

### 2.3 ) REGIMEN DE DOSIFICACION INDIVIDUAL EN PACIENTES QUE RECIBEN TRATAMIENTO CON 5,5-DIFENILHIDANTOINA

Este método fue inicialmente descrito por EISENTHAL y CORNISH-BOWDEN, fue PETER W. MULLEN quien le dió su primera aplicación en farmacocinética ( 27 ).

Este es un método seguro para determinar el régimen de dosificación de 5,5-Difenilhidantoína, y tiene la finalidad de predecir la dosis requerida para alcanzar una concentración plasmática en el estado estacionario de 5,5-Difenilhidantoína que permanezca dentro del intervalo de concentración considerado como terapéutico, tomando en cuenta que la 5,5-Difenilhidantoína sigue una cinética dosis-dependiente, se realiza de la siguiente forma: se requiere que el pacien te logre la concentración de 5,5-Difenilhidantoína en plasma en el estado estacionario bajo dos diferentes regímenes de dosificación, -



**figura N<sup>o</sup> 1.** Plano lineal directo, utilizado para relacionar la concentracion plasmatica de DFN deseada a una cierta dosis.

sobre un papel milimétrico se dibuja un plano de ejes coordenados - que abarque los dos primeros cuadrantes, el eje de abscisas, corresponde a la concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina en el estado estacionario, el eje de ordenadas, a la dosis prescrita; cada concentración plasmática en el estado estacionario es arbitrariamente asignada con un valor negativo sobre el eje de abscisas, hasta el correspondiente valor de dosis denotado sobre el eje de ordenadas, - los valores de concentración plasmática y dosis, se unen con una línea recta que se extiende hasta el primer cuadrante, teóricamente se asume que la relación entre dosis y concentración plasmática respectiva, sigue una cinética de Michaelis-Menten, estas líneas se interceptan en un punto común y a partir de este punto, se trazan dos rectas que intercepten al eje de abscisas y al de ordenadas respectivamente nos darán el valor de  $V_{max}$  y  $K_m$  que corresponden a la ecuación de Michaelis-Menten. La dosis requerida para alcanzar una concentración de 5,5-Difenilhidantoina en el estado estacionario se determina simplemente extendiendo una línea recta entre el punto de intersección y el correspondiente valor de concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina deseado en el eje de abscisas, ver fig. N°. 1, el punto donde cada recta que se trace para una correspondiente concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina en el estado estacionario corte el eje de ordenadas, corresponderá a la dosis necesaria para alcanzar esa concentración plasmática deseada.

En cuanto a sus efectos electroencefalográficos, se ha visto que la 5,5-Difenilhidantoina en dosis tóxicas provoca señales de excitación. En algunos casos se ha visto que la administración de 5,5-Difenilhidantoina, produce mejoría del trazo electroencefalográfico y en otros aunque se controlen las crisis convulsivas permanece anormal.

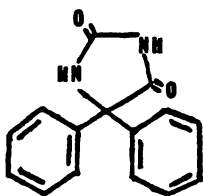
Los trabajos de Plaa, Hine y colaboradores ( 35 ) demostraron que la

DFH es parahidroxilada en el hígado y excretada en la orina, como el glucuronato en un 60% a 70% de la dosis diaria de 5,5-Difenilhidantoina, aparece en la orina como 5-Penil-5-Parahidroxifenilhidantoina y de 1% a 5% como 5,5-Difenilhidantoina inalterada.

Cuando la concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina se mantiene en concentraciones tóxicas ( más de 20 mcg/ml en niños ). Los primeros síntomas de toxicidad son: somnolencia, nistagmus, ataxia y visión borrosa ( 22 ). Existen numerosos reportes acerca de los trastornos debidos a la toxicidad de 5,5-Difenilhidantoina cuando se ingiere durante largo tiempo, algunos de ellos se resumen en la tabla N°. 1, es importante hacer notar que cuando se establece una vigilancia de la concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina, se asegura que ésta entre del intervalo de concentración considerado como terapéutico, y además se individualiza la farmacoterapia, la probabilidad de presentarse estos efectos tóxicos es menor, además de ofrecer un mejor control sobre las crisis convulsivas ( 23 ).

#### 2.4) DESCRIPCION Y ASPECTOS GENERALES DE LA 5,5-DIFENILHIDANTOINA -- (DFH)

5,5-DIFENIL-2,4-IMIDAZOLIDINDIONA (C<sub>15</sub> H<sub>12</sub> N<sub>2</sub> O<sub>2</sub>)



pKa = 8.3

P.M. = 252.26 g/mol.

C (71.41 %), H (4.8%),

N (11.11 %), O (12.68 %)

Pto. fusión - 295 - 298° C

Polvo blanco de sabor amargo, prácticamente insoluble en agua, lg.

de DFH se disuelve en aproximadamente 60 ml. de alcohol, y aproximadamente 30 ml. de acetona.

Dosis letal media (MLD) en ratas = 2.2 g/kg.

La 5,5-Difenilhidantoina (DFH), fue introducida en el mercado por Merrit y Putnam en 1938, como resultado de un amplio estudio experimental de las sustancias químicas que pudieran ser anticonvulsivas, investigaciones llevadas a cabo por medio de convulsiones por electrochoque en animales de experimentación. El descubrimiento de la DFH como agente anticonvulsivo, es un marcado adelanto de la terapéutica — por tres razones: en primer lugar, la sustancia no tiene un efecto sedante y esto va de acuerdo con el hecho de que las sustancias químicas efectivas en la epilepsia, no necesariamente tienen que ser hipnóticas, en segundo lugar, la eficacia de la dilantina en los ataques psicomotores ha impulsado el estudio de las diferencias metabólicas, neurofisiológicas y electroencefalográficas entre los diferentes tipos de epilepsia y ha hecho ver que los anticonvulsivos descubiertos en el laboratorio, pueden tener especificidad terapéutica en los diferentes tipos de ataques y finalmente la DFH y sus afines, al igual que los medicamentos anticonvulsivos de otras clases, han demostrado su valor en el estudio experimental de los ataques, investigación que tiene el propósito de lograr un mejor entendimiento de la naturaleza del proceso convulsivo y aclarar la relación existente entre la estructura química y la acción anticonvulsiva ( 60 )

#### TRASTORNOS ASOCIADOS CON LA TOXICIDAD DE DFH

- Disminución de 24, 25-Dihidroxicolecalciferól - (Vitamina D)
- Disminución de la Bilirrubina sérica no conjugada
- Incremento de las lipoproteínas de alta densidad
- Disminución de la tiroxina total, tiroxina libre y Triiodotironina libre
- Induce a un incremento en la unión de hormonas sexuales a globulina
- En algunos casos reduce la secreción de insulina
- Se le ha asociado con la aparición de hiperplasia gingival
- Produce deficiencia de IgA
- Elevación del ácido 5-Hidroxiindolacético en -- fluido cerebroespinal
- Elevación de la fosfatasa alcalina sérica y de hueso (Los osteoblastos son ricos en fosfatasa alcalina)
- Induce aberraciones en el metabolismo de ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>
- Induce alteraciones hematológicas

TABLA N°. I



## C A P I T U L O   I I I

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1) SELECCION DE PACIENTES

Se seleccionaron 83 niños epilépticos con edad promedio de 7 años - al azar, que acuden periódicamente al Departamento de Electroencefalografía del Hospital Infantil de México; a cada uno de ellos, se le tomó un electroencefalograma cada 6 meses para conocer la evolución del trazo electroencefalográfico: al mismo tiempo se les interroga para indagar si persisten las crisis epilépticas y así valorar la efectividad del tratamiento.

Se seleccionaron solamente pacientes que ingieren 5,5-Difenilhidantoina durante su tratamiento, a los 83 pacientes se les tomaron 5 - mililitros de sangre venosa y, de manera simultánea, a 39 pacientes se les tomó un electroencefalograma para saber si el trazo electroencefalográfico había mejorado, comparando con el electroencefalograma tomado previamente con 6 meses de anterioridad: adicionalmente se registraron los siguientes datos, para los mismos 39 pacientes:

- a) Edad
- b) Sexo
- c) Dosis diaria (mg de DFH/día)
- d) Incidencia de crisis epilépticas (cuando tuvo la última crisis)
- e) Electroencefalograma (si mejora el trazo o empeora)
- f) Tipo de epilepsia
- g) Concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina

Asimismo se registraron los siguientes datos de 35 pacientes:

- a) Edad
- b) Sexo
- c) Tipo de epilepsia
- d) Dosis diaria (mg/Kg/día)
- e) Concentración plasmática (mcg/ml)

Se estudió la relación de la concentración de 5,5-Difenilhidantofina - en saliva y sangre en un voluntario sano, al que se le instruyó no tomar alcohol, por lo menos un mes antes del estudio, se le administraron 300 miligramos de 5,5-Difenilhidantofina por vía oral y se muestreó 5 mililitros de sangre venosa y 5 mililitros de saliva simultáneamente a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 24, - 28 y 32 horas.

### 3.2 ) METODO ANALITICO "CROMATOGRAFIA DE GASES"

#### 3.21) REACTIVOS

Etanol	R.A.	(MERCK)
Metanol	R.A.	(MERCK)
Tolueno	R.A.	(MERCK)
Acetona	R.A.	(MERCK)
Cloroformo	R.A.	(MERCK)
Acido acético	R.A.	(MERCK)
Fosfato monobásico de sodio	R.A.	(BAYER)
5,5-Difenilhidantofina 99.93 % de pureza (proporcionado por los laboratorios LA CAMPANA)		
5-Parametilfenil-5-fenilhidantofina	R.A.	(ALDRICH)
Hidróxido de tetrametilamonio al 10 % en metanol	R.A.	(MERCK)
Trimetilclorosilano al 5 % en tolueno	R.A.	(MERCK)
OV-17 (fase líquida)	SUPELCO	
Chromosorb W H.P. 80-100 mesh size	SUPELCO	
Lana de vidrio silanizada	SUPELCO	

### 3.22) EQUIPO EMPLEADO

CROMATOGRAFO DE GASES PACKARD MODELO 7300, EQUIPADO CON DETECTOR DE IONIZACION DE FLAMA

CENTRIFUGA REFRIGERADA AUTOMATICA SERVALL MODELO KSB-R DE 0 A -- 20,000 RPM

CENTRIFUGA CLINICA INTERNATIONAL EQUIPMENT Co. MODELO IEC DE 0 A 10,000 RPM

ROTAVAPOR - BÜCHI RINCO INSTRUMENT Co. INC

AGITADOR TIPO VORTEX

BALANZA ANALITICA SARTORIUS MODELO EH-201

ESTUFA DE LABORATORIO MEDI-LAB MODELO EH-201

POTENCIOMETRO INT. CIENTIFICA MODELO E 520

MATERIAL DE VIDRIO COMUN DE LABORATORIO

### 3.23) PREPARACION DE LA COLUMNA Y EMPACADO

El procedimiento para recubrir las particulas del soporte con la fase líquida a un porcentaje de 1%, se realizó de la siguiente manera:

Pesar 9.9 g. de soporte

Pesar 0.1 g. de fase líquida

Disolver la fase líquida con un volumen equivalente al que ocupa el soporte pesado con cloroformo, vaciar esta solución en una caja Petri limpia y seca, adicionar el soporte lentamente y mezclar con cuidado, pues las particulas del soporte se fragmentan con tratamientos bruscos, secar el soporte en la estufa a 100° C durante una hora. Lavar la columna de vidrio vacía con mezcla cromica, enjuagar con agua destilada, llenar la columna con una solución de trimetil clorosilano al 5% en tolueno durante una hora y enjuagar con tolueno 3 veces y 3 más con metanol, secar la columna a 100° C en el horno del cromatógrafo.

Colocar lana de vidrio silanizada en un extremo de la columna y en este mismo extremo, conectar la bomba de vacío, por otro extremo, -- llenar con el soporte recubierto y golpear suavemente con un lápiz -- para acomodar las partículas del soporte 2 cm. antes de llenar la co l u m n a, colocar en este extremo lana de vidrio silanizada.

Condicionar a la columna empacada durante 48 horas a 280°C con un -- flujo de nitrógeno de 10 ml/min.

### 3.24) PREPARACION DE SOLUCIONES

Preparar una solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio - 0.3 M, pesar 41.4 g. de  $\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y disolver en un matraz aforado de 1 litro con agua desionizada, aforar a 1 litro, el pH de esta solución es de 4.8.

Preparar una solución patrón de DFH a una concentración de 1 mg/ml, pesar 100 mg de DFH y disolver y, en un matraz aforado, aforar a -- 100 ml con etanol.

Preparar una solución patrón de 5-Parametilfenil-5-Fenilhidantoína (patrón interno) en tolueno a una concentración de 10 mcg/ml, pesar 50 miligramos del patrón interno, disolver y aforar en un matraz aforado a 100 ml con tolueno, posteriormente de esta solución, tomar - 1 ml y transferir a otro matraz aforado de 50 ml y aforar con tolu e n o a 50 ml.

Preparar una solución de 5-Parametilfenil-5-Fenilhidantoína (patrón interno) a una concentración de 0.1 mcg/ml, tomar 1 ml de la solución patrón de patrón interno, es decir la que tenía una concentración de patrón interno de 10 mcg/ml y aforar en un matraz aforado - con tolueno a 100 ml.

Preparar una solución de DFH en etanol a una concentración de 0.1 -

mg/ml, tomar un mililitro de la solución patrón de DFH, es decir, la que tenía una concentración de 1 mg/ml y aforar a 10 mililitros con etanol, en un matraz aforado de 10 mililitros.

### 3.25) PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE DFH EN PLASMA

Este procedimiento de extracción es aplicable tanto a la curva patrón como a las muestras problema.

Colocar un mililitro de plasma en un tubo de plástico para la centrifuga refrigerada y adicionar 0.5 mililitros de solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 0.3M y 5 mililitros de tolueno que contiene el patrón interno a una concentración de 10 mcg/ml, agitar 1 minuto en el agitador vortex y centrifugar a 15,000 RPM durante 10 minutos, extraer 4 mililitros del tolueno sobrenadante y transferir a un tubo de vidrio, agregar 50 microlitros de hidróxido de tetra-metilamnio al 10% en metanol, agitar 1 minuto, centrifugar a 5,000 RPM durante 10 minutos y proceder a inyectar al cromatógrafo 2 microlitros de la fase metanólica inferior.

### 3.26) PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE DFH EN SALIVA

Este procedimiento de extracción es aplicable, tanto a la curva patrón como a las muestras problema.

Colocar un mililitro de saliva en un tubo para la centrifuga refrigerada, adicionar 0.5 mililitros de solución amortiguadora de fosfato monobásico de sodio 0.34 M y 5 mililitros de tolueno con el patrón interno a una concentración de 0.1 mcg/ml, agitar un minuto, centrifugar a 20,000 RPM durante 10 minutos, separar 3 mililitros del tolueno sobrenadante, transferir a un tubo de vidrio y adicionar 50

m̄icrolitros de hidróxido de tetrametilamonio al 10% en metanol, agitar un minuto y centrifugar a 5,000 EPM, finalmente inyectar 2 microlitros de la fase metanólica inferior al cromatógrafo.

### 3.27) CONDICIONES DEL CROMATOGRFAO

#### CONDICIONES CROMATOGRAFICAS DEL METODO EN PLASMA

Se empleó una columna de 6 pies de largo y 2 mm. de diámetro interior, empacada con OV-17 al 1% sobre chromosorb W.H.P. 80 - 100 mesh size -

TEMPERATURA DEL DETECTOR = 280°C

FLUJO DE HIDROGENO = 40 ml/min

TEMPERATURA DEL INYECTOR = 300°C

FLUJO DE AIRE = 250 ml/min

TEMPERATURA DE LA COLUMNA = 210°C  
(Isotérmica)

FLUJO DE NITROGENO = 20 ml/min

VELOCIDAD DE LA CARTA = 10 --  
min/pulgada

SENSIBILIDAD =  $16 \times 10^{-11}$

SUPRESION DE CORRIENTE =  $0.3 \times$

$10^{-9}$

Las condiciones cromatográficas del método en saliva son las mismas, - excepto que la sensibilidad en el caso de saliva fue de  $16 \times 10^{-12}$ .

### 3.3) LINEARIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ANALITICO

Para validar el método de B Solov (14), se determinó la linealidad y - reproducibilidad del mismo, esto se realizó preparando una curva patrón con 6 diferentes concentraciones de DFH en plasma: 5, 10, 20, 30, 40, 50 mcg/ml. En el caso de la curva patrón en saliva, el intervalo fue - de 0 a 1 mcg/ml de DFH con las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, - 0.8, 1, mcg/ml y en ambos casos se incluye un blanco de plasma y sali- va respectivamente; una vez que se terminó de inyectar al cromatógrafo,

se procede a calcular la razón de alturas en cada cromatograma obtenido; esto se realiza dividiendo la altura del pico de la DFH, entre la altura correspondiente a su patrón interno y se procede a realizar el análisis estadístico.

## C A P I T U L O   I V

### RESULTADOS

#### 4.1) SELECCION DE PACIENTES

En el Departamento de Electroencefalografía del Hospital Infantil de México, se recopilaron los datos que se presentan en la tabla N°. 2, co--rrespondientes a: edad, sexo, tipo de epilepsia, diagnóstico, dosis diaria (mg/día), evolución electroencefalográfica, sintomatología, conjuntamente con el análisis de la concentración plasmática de DFH, de 39 de los pacientes estudiados; adicionalmente se recopilaron los datos de: - edad, sexo, dosis diaria (mg/kg de peso corporal/día) y concentración - plasmática de 35 pacientes estudiados. Puede observarse que en esta tabla, el tipo de epilepsia que fue diagnosticada a cada paciente así como la evolución del trazo electroencefalográfico que cada paciente manifiesta durante su tratamiento, la sintomatología se estableció en relación a la incidencia de convulsiones considerando a un paciente como --asintomático cuando la última crisis convulsiva se presentó en un período de tiempo no menor a 6 meses antes de la toma de muestra sanguínea, también se presentan los datos de edad, sexo y dosis de la DFH prescrita.

#### 4.2) METODO ANALITICO

Al reproducir el método reportado por E. B. Solow (14) y optimizar, tanto el método de extracción de DFH en plasma como las condiciones cromatográficas, se procedió a analizar muestras de pacientes, en la Figura N°. 2, se presenta un cromatograma típico que se obtiene al analizar una muestra plasmática de DFH, puede observarse claramente el pico de la --



PACIENTE N°.	EDAD EN AÑOS	SEXO	T. E.	DOSIS DIARIA	CONCENTRACION PLASMATICA DE DFH	E E G	SINTOMATOLOGIA
1	5	F	* E.G.T.C.	90 mg/día	6 mcg/ml	ANORMAL	ASINTOMATICA
2	16	F	" " " "	100 " " "	6 " "	ANORMAL	ASINTOMATICA
3	13	M	" " " "	200 " " "	4 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
4	3	M	" " " "	150 " " "	6 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
5	5	M	" " " "	30 " " "	3 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
6	6	M	" " " "	130 " " "	6 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
7	11	M	" " " "	120 " " "	7 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
8	2	M	" " " "	120 " " "	5 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
9	3	M	" " " "	75 " " "	4 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
10	11	M	" " " "	250 " " "	1 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
11	2	M	" " " "	60 " " "	3 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
12	7	F	" " " "	100 " " "	8 " "	ANORMAL	ASINTOMATICA
13	10	M	" " " "	60 " " "	0 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
14	14	M	" " " "	250 " " "	3 " "	ANORMAL P/MEJOR	ASINTOMATICO
15	12	M	" " " "	20 " " "	1.7 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
16	2	F	" " " "	66 " " "	2.5 " "	ANORMAL P/MEJOR	ASINTOMATICA
17	4	F	" " " "	66 " " "	4.5 " "	ANORMAL P/MEJOR	ASINTOMATICA
18	14	M	" " " "	200 " " "	4 " "	ANORMAL P/MEJOR	ASINTOMATICO
19	12	M	" " " "	200 " " "	5 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
20	5	F	" " " "	130 " " "	1.5 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
21	12	F	" " " "	200 " " "	2 " "	ANORMAL P/MEJOR	ASINTOMATICA

\* E.G.T.C. = EPILEPSIA GENERALIZADA TONICO CLONICA

TABLA N° 2. DIAGNOSTICO, EDAD, SEXO, TIPO DE EPILEPSIA (TE), DOSIS DIARIA, CONCENTRACION PLASMATICA DE DFH ELECTROENCEFALOGRAMA ( E E G ), SINTOMATOLOGIA

PACIENTE N°.	EDAD	SEXO	T. E.	DOSIS DIARIA	CONCENTRACION PLASMATICA DE DPH	E E G	SINTOMATOLOGIA
22	19	F	* E.G.T.C.	400 mg/día	6.3 mcg/ml	ANORMAL	C/CONVULSIONES
23	10	M	" " " "	200 " "	13.3 " "	ANORMAL P/MEJOR	C/CONVULSIONES
24	3	F	" " " "	90 " "	11 " "	NORMAL	C/CONVULSIONES
25	17	M	" " " "	300 " "	10 " "	ANORMAL P/MEJOR	ASINTOMATICO
26	13	M	" " " "	300 " "	6 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
27	9	F	" " " "	200 " "	8 " "	ANORMAL P/MEJOR	C/CONVULSIONES
28	9	M	" " " "	60 " "	3 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
29	2	M	" " " "	60 " "	1.3 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
30	10	M	" " " "	70 " "	3 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
31	6	F	*T.C.E.	180 " "	10.5 " "	NORMAL	C/CONVULSIONES
32	9	M	E.G.T.C.	45 " "	4.7 " "	NORMAL	C/CONVULSIONES
33	13	F	" " " "	180 " "	42.5 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
34	3	M	" " " "	150 " "	4.6 " "	ANORMAL	C/CONVULSIONES
35	12	M	" " " "	300 " "	6.7 " "	ANORMAL P/MEJOR	C/CONVULSIONES
36	15	F	" " " "	100 " "	4 " "	ANORMAL	ASINTOMATICA
37	4	M	" " " "	180 " "	5 " "	ANORMAL	ASINTOMATICO
38	1	F	" " " "	200 " "	5 " "	ANORMAL	ASINTOMATICA
39	6	F	* Q.H.I.	150 " "	8 " "	ANORMAL	ASINTOMATICA

- \* T.C.E. = TRAUMA CRANEO ENCEFALICO
- \* Q.H.I. = QUISTE EN HEMISFERIO IZQUIERDO
- \* E.G.T.C. = EPILEPSIA GENERALIZADA TONICO CLONICA

TABLA N° 2 CONTINUACION:

DIAGNOSTICO, EDAD, SEXO, TIPO DE EPILEPSIA (TE),  
 DOSIS DIARIA, CONCENTRACION PLASMATICA DE DPH  
 ELECTROENCEFALOGRAMA ( E E G ), SINTOMATOLOGIA

PACIENTE N°	EDAD	SEXO	T. E.	DOSIS DIARIA	CONCENTRACION PLASMATICA
1	5	F	E.G.T.C.	5.6 mg/kg/día	2 mcg/ml
2	6	M	*****	6.8 " " "	6 " "
3	6	F	*****	7.5 " " "	4 " "
4	1	M	*****	7.5 " " "	6 " "
5	17	M	*****	1.5 " " "	2 " "
6	19	M	*****	2.8 " " "	7 " "
7	3	M	*****	3.8 " " "	1 " "
8	3	M	*****	5 " " "	4 " "
9	11	M	*****	5 " " "	1 " "
10	7	F	*****	5.4 " " "	8 " "
11	10	M	*****	6.6 " " "	8 " "
12	10	M	*****	2.3 " " "	0 " "
13	14	M	*****	4.5 " " "	3 " "
14	5	M	*****	6 " " "	1 " "
15	12	F	*****	5.7 " " "	1.3 " "
16	12	M	*****	3.5 " " "	1.7 " "
17	3	M	*****	6 " " "	4 " "
18	4	F	*****	4.5 " " "	4.5 " "
19	3	M	*****	7 " " "	8.6 " "
20	5	F	*****	6.1 " " "	1.5 " "
21	12	F	*****	5.2 " " "	2 " "
22	19	F	*****	7.7 " " "	6.3 " "
23	10	M	*****	6.9 " " "	13.3 " "
24	17	M	*****	5.8 " " "	10 " "

\* E.G.T.C. = EPILEPSIA GENERALIZADA TONICO CLONICA

TABLA N°. 2.- CONTINUACION:

DIAGNOSTICO, EDAD, SEXO, TIPO DE EPILEPSIA (TE)  
 DOSIS DIARIA, CONCENTRACION PLASMATICA DE DPH  
 ELECTROENCEFALOGRAMA (E E G)

PACIENTE N°.	EDAD	SEXO	T.E.	DOSIS DIARIA	CONCENTRACION PLASMATICA
25	13	M	E.G.T.C.	8.5 mg/kg/día	6 mcg/ml
26	9	F	" " " "	7.1 " " "	9 " "
27	19	M	" " " "	4.1 " " "	6 " "
28	3	M	" " " "	4.2 " " "	5 " "
29	9	M	" " " "	2.5 " " "	3 " "
30	2	M	" " " "	5.21 " " "	1.3 " "
31	10	F	" " " "	1.8 " " "	3 " "
32	6	F	" " " "	6.6 " " "	10.5 " "
33	9	M	" " " "	5.6 " " "	4.7 " "
34	13	F	" " " "	7.8 " " "	42.5 " "
35	12	F	" " " "	5.3 " " "	6.7 " "

\* E.G.T.C. = EPILEPSIA GENERALIZADA TONICO CLONICA

TABLA N° 2 CONTINUACION:

DIAGNOSTICO, EDAD, SEXO, TIPO DE EPILEPSIA (TE),  
 DOSIS DIARIA, CONCENTRACION PLASMATICA DE DPH,  
 ELECTROENCEFALOGRAMA (E E G)

DFH señalado con el N°. 1, que tiene un tiempo de retención de 9 minutos y el pico del patrón interno (5-Parametilfenil-5-fenilhidantoina), señalado con el N°. 2; el patrón interno tiene un tiempo de retención de 13 minutos, también se observa en la Figura N°. 2 los picos de algunas impurezas plasmáticas marcadas con la letra x, que no se eliminan durante el procedimiento de extracción, pero se separan lo suficiente del pico de DFH y no interfieren en el análisis.

En la Figura N°. 3 se observa un cromatograma típico que se obtiene al analizar muestras salivales de DFH, se señala con el N°. 1 el pico de DFH que tiene un tiempo de retención de 9 minutos y se señala con el N°. 2, el pico de su patrón interno (5-parametilfenil-5-fenilhidantoina), con un tiempo de retención de 13 minutos, el tiempo que consume analizar una muestra plasmática o salival de DFH, es de 15 minutos.

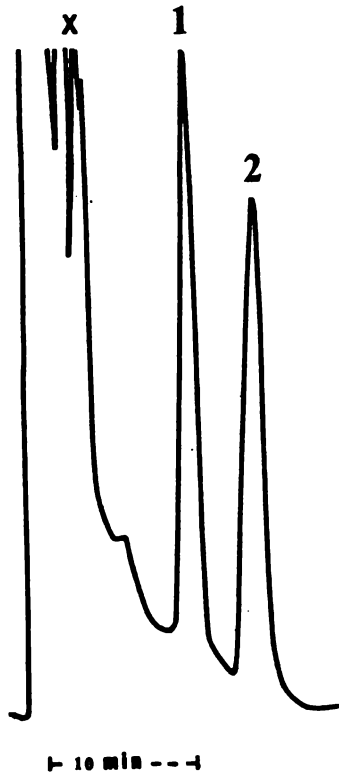
#### 4.3) LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO

Para conocer la linealidad del método en el intervalo de concentración de interés terapéutico se realizaron 6 curvas patrón de DFH en plasma humano y se realizó el cálculo de coeficiente de correlación, intercepto y pendiente de cada una de las curvas patrón como puede observarse en la tabla N°. 3, la correlación de cada una de las curvas patrón es buena ( $r \geq 0.95$ ), esto nos indica que el método analítico tiene una buena linealidad, en el intervalo de concentración de 5 a 50 mcg/ml, además el cálculo del intercepto nos indica que cada una de las curvas patrón intercepta al eje de ordenadas cerca del origen.

En la Figura N°. 5, se observa una curva patrón de DFH en saliva ( $r=0.95$ ) y en la Figura N°. 4, una curva patrón de DFH en plasma humano ( $r=0.99$ ).

#### 4.4) REPRODUCIBILIDAD DEL METODO ANALITICO

Para validar la reproducibilidad del método analítico, además de las 6 -



**FIGURA N°. 2** CROMATOGRAMA TÍPICO DEL ANÁLISIS DE DFH EN -  
PLASMA, EL PICO (1), CORRESPONDE A LA DFH, -  
EL PICO (2), CORRESPONDE A SU PATRÓN INTERNO,  
X CORRESPONDE A IMPUREZAS PLASMÁTICAS

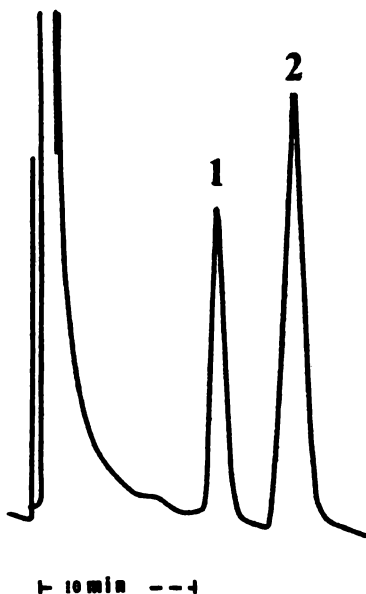
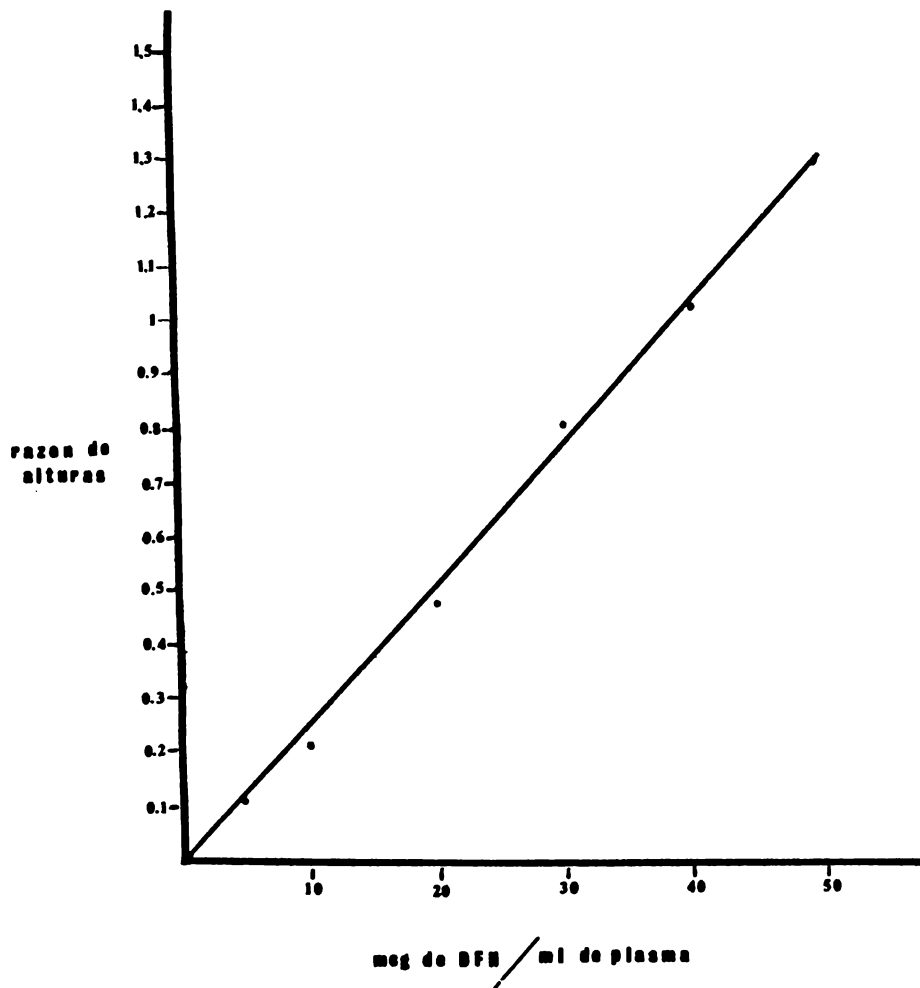


FIGURA N°. 3 CROMATOGRAMA TÍPICO DEL ANÁLISIS DE DFH EN SALIVA, EL PICO (1), CORRESPONDE A LA DFH, EL PICO (2) CORRESPONDE A SU PATRÓN INTERNO

CURVA PATRON	COEFICIENTE D E CORRELACION (r)	PENDIENTE (m)	INTERCEPTO (y)
1	0.98	0.026	- 0.05
2	0.99	0.021	- 0.04
3	0.99	0.025	0.01
4	0.95	0.025	0.01
5	0.97	0.026	- 0.04
6	0.99	0.027	0

**TABLA N°. 3** COEFICIENTES DE CORRELACION Y CURVAS DE REGRESION LINEAL OBTENIDAS POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS A PARTIR DE CURVAS PATRON DE DPH EN PLASMA

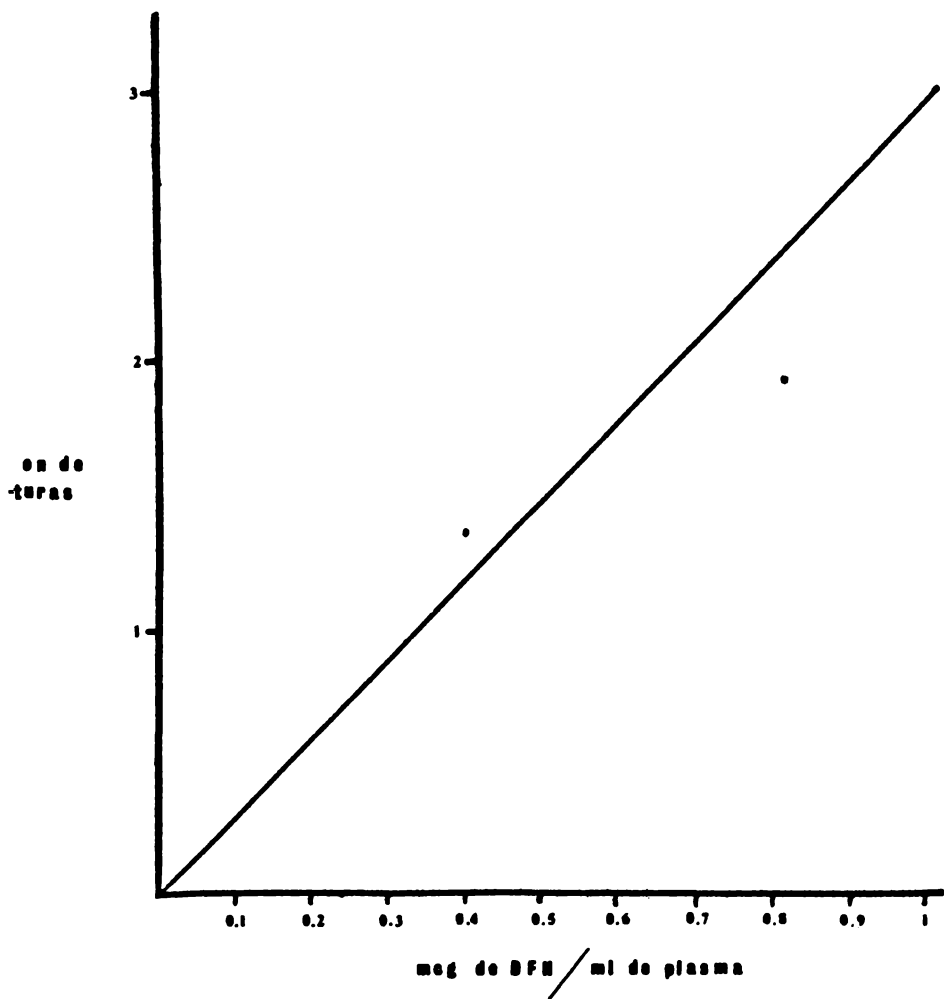




Equacion de regresion lineal  $y = 0.02x - 0.03$

Coefficiente de correlacion  $r = 0.99$

Figura N<sup>o</sup> 4. Curva patron de DFH en plasma.



Ecuacion de regresion lineal  $y = 3x - 0.2$

Coefficiente de correlacion  $r = 0.95$

Figura N<sup>o</sup> 5. Curva patron de DFM en saliva.

curvas patrón realizadas, se incluyeron 2 concentraciones diferentes de la curva patrón (10 y 50 mcg/ml), esto nos permitió determinar variaciones entre un día y otro del método analítico.

En la Tabla N°. 4 se incluye la media aritmetica de la razón de áreas - para cada concentración estudiada de las diferentes curvas patrón así como desviación standard, coeficiente de variación e intervalo de confianza. Puede observarse al analizar estos datos que el cálculo de desviación standard no presenta una dispersión considerable en relación a su valor medio, el cálculo de coeficiente de variación expresado en - por ciento indica que las concentraciones de: 5, 10 y 20 mcg/ml tienen una menor precisión de comparación a las concentraciones de 20, 40, 50 mcg/ml; la precisión aquí encontrada, se puede considerar apropiada para el propósito de vigilancia de niveles plasmáticos de fármacos anti--convulsivos.

CONCENTRACION (mcg/ml)	MUMERO DE - MUESTRAS ANA LIZADAS (N)	MEDIA ( $\bar{x}$ )	DESVIACION TIPICA (s)	COEFICIENTE DE VARIACION (%)	INTERVALOS DE CONFIANZA (95%)
5	6	0.12	0.03	24.6	0.12 $\pm$ 0.03
10	11	0.23	0.03	16.4	0.23 $\pm$ 0.02
20	6	0.46	0.10	23.2	0.46 $\pm$ 0.12
30	6	0.76	0.04	6.4	0.76 $\pm$ 0.05
40	6	0.99	0.08	8.5	0.99 $\pm$ 0.09
50	11	1.21	0.12	10	1.21 $\pm$ 0.08

TABLA N°. 4 REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO  
PARA LA CUANTIFICACION DE DPH EN PLASMA

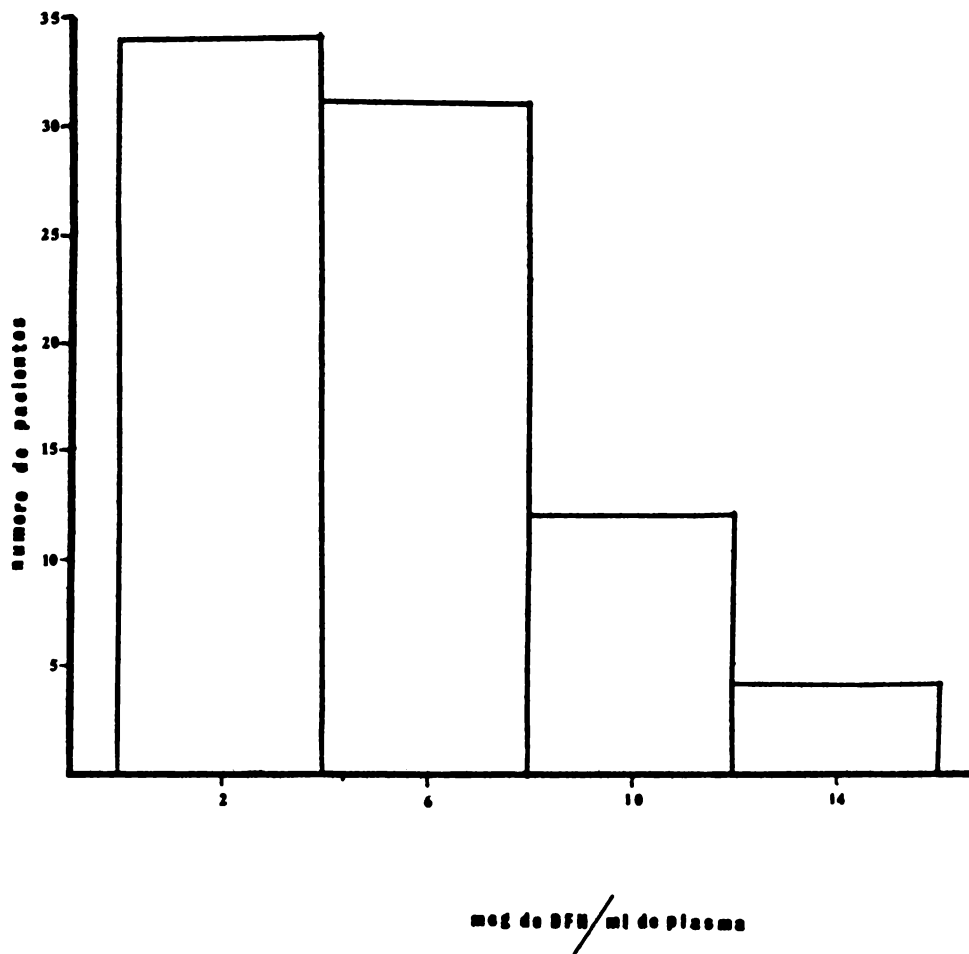
#### 4.5) RESULTADOS DEL ANALISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES

A continuación se exponen los resultados del análisis de 83 muestras de diferentes pacientes que se incluyen en un histograma de frecuencia-concentración plasmática, Figura N°. 6, puede observarse que la mayor frecuencia se encuentra en el intervalo de 0-3.9 mcg/ml de DFH en plasma, siguiendo el orden decreciente de frecuencia el intervalo de 4 a 7.9 mcg/ml de DFH en plasma, 8 a 11.9 mcg/ml y por último, el intervalo de menor frecuencia que es el de 12-15.9 mcg/ml de 5,5-Difenilhidantoina en plasma.

#### 4.6) RESULTADOS DE UN ESTUDIO REALIZADO EN UN VOLUNTARIO SANO DESPUES DE LA INGESTION DE 300 mg DE DFH POR VIA ORAL

El objetivo de este estudio es el de comprobar la existencia de la correlación de DFH en plasma y la correspondiente concentración de DFH en saliva a un tiempo determinado (28).

El voluntario se presentó al estudio en ayunas y sin haber ingerido bebidas alcohólicas desde un mes anterior al estudio, se le proporcionaron 3 cápsulas de dilantine (PARKE DAVIS) de 100 mg cada una, se le colocó un cateter en la vena y se le tomaron muestras de plasma y saliva simultáneamente, a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 28 y 32 horas; una vez que terminó el muestreo, se valoraron las muestras encontrándose los resultados que se presentan en la Tabla N°. 5.



**Figura N<sup>o</sup> 6. Histograma de Frecuencia - Concentracion plasmatICA de DFH.**

TIEMPO (hs)	(mcg/ml) CONCENTRACION PLASMATICA	(mcg/ml) CONCENTRACION SALIVAL
0.25	3	1.3
0.5	3.7	*
1	3.7	*
1.5	9	0.7
2	4.8	*
3	*	*
4	3.8	*
6	*	1.6
8	*	*
24	2.3	0.7
28	1.5	*
32	1.5	*

\* NO DETECTADA

TABLA N°. 5. CONCENTRACION DE DFH EN PLASMA Y SALIVA A DIFERENTES TIEMPOS, DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE: - 300 mg. POR VIA ORAL

## C A P I T U L O    V

### ANALISIS DE RESULTADOS

#### 5.1) METODO ANALITICO

Actualmente existen numerosos reportes que demuestran el creciente interés que ha tenido la determinación de DFH en plasma humano, por el método de cromatografía de gas líquido.

En algunos reportes publicados en revistas especializadas, se muestran modificaciones principalmente en el método de extracción de la DFH a partir de plasma, así como en la fase líquida utilizada para recubrir el soporte con el que se empaca la columna, las condiciones de temperatura y flujo de gas portador con las que se estabiliza el cromatógrafo, estas modificaciones han originado una variabilidad en el control de calidad inter-laboratorios ( 1 ). En este trabajo se empleó el método reportado por E. B. Solow (14), realizando algunas modificaciones con el fin de ajustarlo a las posibilidades del laboratorio y a las necesidades del método, estas modificaciones son:

- a) Disminución en el porcentaje de fase líquida, con el que se recubrió el soporte, de 5% a 1% debido a que el método reportado por E.B. Solow, es aplicable a la determinación simultánea de varios fármacos anticonvulsivos y en este trabajo, sólo se determinó DFH.
- b) En el método reportado por E. B. Solow, se empleó como soporte cromosorb Q, aquí se empleó chromosorb W, pues es más inerte.
- c) En el método de E.B. Solow, se empleó temperatura programada en la columna, aquí se eligió temperatura isotérmica ya que nuestro análisis fue para un solo fármaco y además con temperatura isotérmica - los resultados son más reproducibles.



Al hacer estas modificaciones, encontramos que los resultados obtenidos son satisfactorios, como puede apreciarse, en la sección de resultados, la linealidad del método, es buena, en cada una de las curvas patrón -- que se realizaron, los coeficientes de correlación cercanos a la unidad; la reproducibilidad del método analítico es aceptable, a las concentraciones de 5, 10, 20 mcg/ml y en las concentraciones de 30, 40 y 50 mcg/ml, la reproducibilidad encontrada es buena.

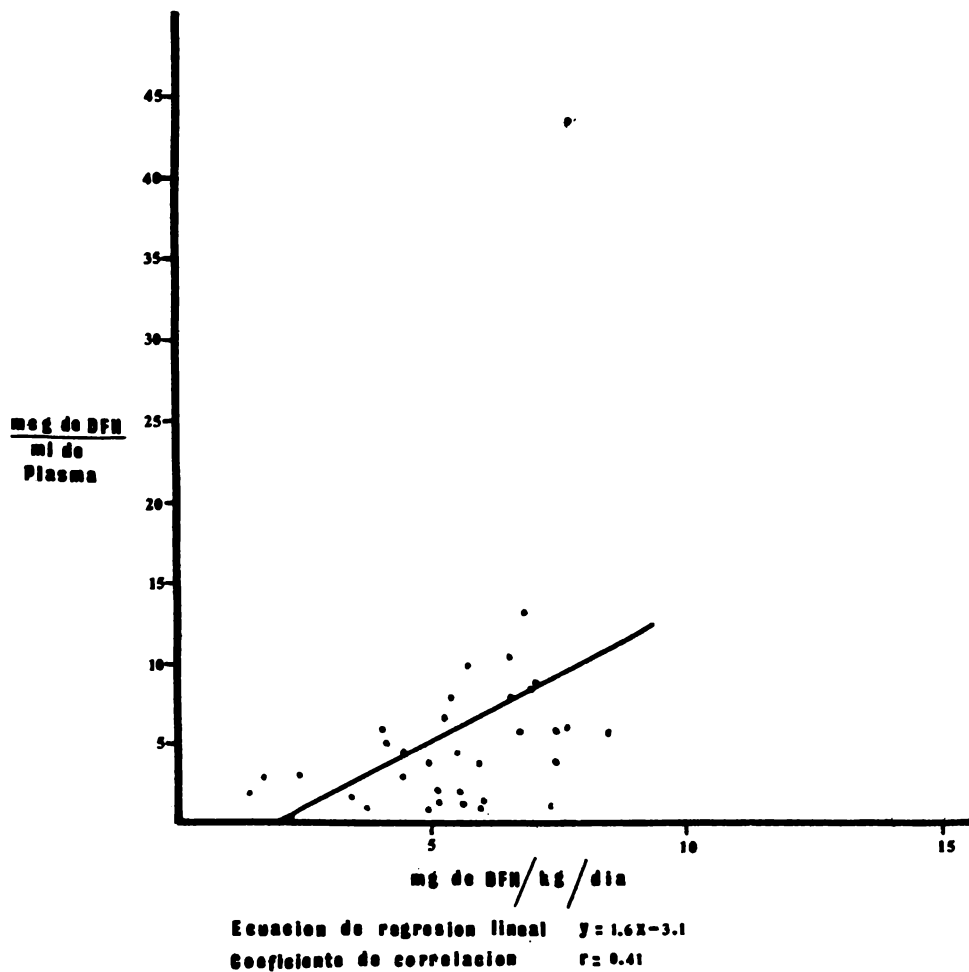
### 5.2) RELACION DOSIS-CONCENTRACION PLASMATICA DE DFH

Existen numerosos reportes en la actualidad acerca de la dificultad que representa alcanzar niveles plasmáticos de DFH en el estado estacionario que proporcionen un adecuado efecto terapéutico (16), de acuerdo a lo reportado por Z. Niazi (44), no hay una buena correlación, entre dosis prescrita y concentración plasmática de DFH entre los diferentes pacientes, debido a la gran variabilidad interindividual; en niños esta variabilidad es aún más marcada, según el reporte de Wilson y colaboradores (26), quien reportó que no se han logrado establecer con precisión intervalos de concentración de DFH considerados como terapéuticos. Los intervalos de concentración de DFH en plasma de niños epilépticos reportados por diferentes autores, son considerados como apropiados pero no efectivos en todos los casos (16).

En este trabajo no encontramos una buena relación entre dosis prescrita por kilogramo de peso corporal por día y concentración plasmática alcanzada de DFH, en los pacientes estudiados ( $r=0.4$ ) como se aprecia en la Figura N°. 7, esto concuerda con lo reportado por Z. Niazi (44), en el sentido de que existe una gran variabilidad en la disposición de DFH.

### 5.3) RELACION CONCENTRACION PLASMATICA DE DFH-INCIDENCIA DE CONVULSIONES

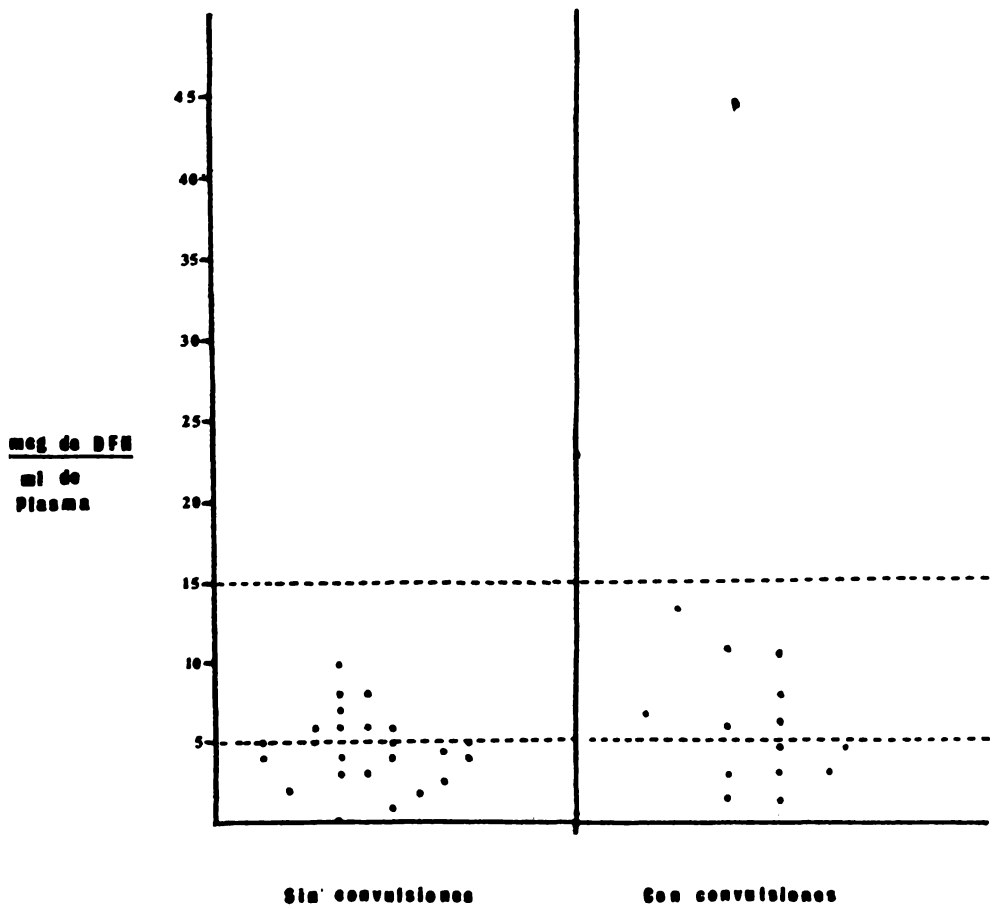
Actualmente existen numerosos reportes acerca de la dificultad que re--



**Figura N<sup>o</sup> 7. Relación Dosis - Concentración plasmática de DFH.**

presenta el obtener una respuesta terapéutica adecuada en pacientes - que reciben tratamiento con DFH (26); D.B. Hunninghake (16), reportó que la variabilidad interindividual de DFH se debe a múltiples factores, algunos de ellos se citan a continuación: peso corporal, edad, - absorción, metabolismo, distribución y excreción renal, pero principalmente a diferencias metabólicas interindividuales de DFH, J.T. Wilson reportó algunos casos de intoxicación debidos a la acumulación del fármaco que resultan por una capacidad de biotransformación limitada en algunos pacientes, Borofsky y colaboradores (29), reportaron que - en niños el intervalo de concentración terapéutico es de 5 a 20 mcg/ml, Noreli y colaboradores (29), reportó que en niños el intervalo de concentración de DFH considerado como terapéutico es de 12 a 25 mcg/ml, Willian A. Sibley, entre otros, reportó que en algunos casos, -- cuando las crisis convulsivas persisten aún cuando la concentración plasmática de DFH se encuentre en el intervalo de concentración considerado como terapéutico, es necesario combinar la farmacoterapia - utilizando fenobarbital, primidona u otro anticonvulsivo: esto se ha ce disminuyendo paulatinamente la dosis de DFH y al mismo tiempo, in crementando la dosis de fenobarbital u otro fármaco anticonvulsivo - hasta alcanzar niveles sanguíneos estables de ambos fármacos.

En este trabajo se trató de buscar la correlación entre concentración plasmática de DFH y la incidencia de convulsiones en 39 pacientes estudiados, clasificando a dichos pacientes de la siguiente manera: -- sin convulsiones corresponde al grupo de pacientes que no presentaron crisis convulsivas durante 6 meses anteriores a la toma de muestra - sanguínea y con convulsiones corresponde al grupo de pacientes que sí presentaron convulsiones durante 6 meses anteriores a la toma de mues tra sanguínea; en la Figura N° 8, puede observarse que de los 19 - pacientes con una concentración plasmática de DFH dentro del inter-- valo de concentración considerado como terapéutico, 12 no presentaron convulsiones durante los 6 meses anteriores a la toma de muestra san-



**Figura N<sup>o</sup> 8. Relacion Concentracion plasmatica de DFN -  
Incidencia de Convulsiones.**

guinea, mientras que 7 sí presentaron convulsiones en el mismo período de tiempo, en este grupo de pacientes se sugiere la posibilidad de combinar la farmacoterapia con algún otro fármaco anticonvulsivo; de los 19 pacientes con una concentración plasmática de DFH subterapéutica (menor de 5 mcg/ml), 12 no presentaron convulsiones, mientras que 7 sí presentaron convulsiones durante los 6 meses anteriores a la toma de muestra sanguínea, en este último grupo de pacientes se sugiere reajustar la dosis con la finalidad de lograr una concentración plasmática de DFH, dentro del intervalo de concentración considerado como terapéutico; por último, se encontró que un paciente presentó una concentración plasmática de DFH a un nivel tóxico (42.5 -- mcg/ml), se sugiere que en este paciente se disminuya paulatinamente la dosis de acuerdo a lo recomendado por Hunninghake (16).

#### 5.4) RELACION CONCENTRACION PLASMATICA DE DFH-EVOLUCION DEL TRAZO ELECTROENCEFALOGRAFICO

Existen algunos reportes que muestran la importancia que tiene correlacionar la concentración plasmática de DFH, la evolución del trazo electroencefalográfico y mejoría clínica en pacientes epilépticos, - que reciben tratamiento con DFH únicamente (24).

La variabilidad en la respuesta inter-individual a la terapia con DFH, puede deberse a diferencias en absorción, metabolismo, distribución - y excreción de DFH, adicionalmente una deficiente distribución de DFH en los tejidos puede originar un nivel subterapéutico en el tejido -- blanco (SMC), por lo tanto correlacionar la concentración plasmática de DFH con la correspondiente en el tejido blanco es difícil (45), -- además en el caso de fármacos que actúan en el sistema nervioso central, la barrera hematoencefálica origina concentraciones más bajas - en el tejido blanco que en la sangre, por lo que se ha sugerido deter

minar la evolución del trazo electroencefalográfico, como un parámetro más de auxilio para verificar la eficacia del tratamiento de pacientes epilépticos que ingieren DFH. Goodman y Gilman reportaron - que el efecto de la administración de DFH sobre el electroencefalograma entre los ataques, en pacientes con epilepsia de gran mal y - con epilepsia psicomotora, es variable. En algunos casos hay una mejora notable del electroencefalograma con remisión clínica, pero - asimismo se observa con frecuencia que los ataques clínicos, son dominados permaneciendo en forma anormal el electroencefalograma. -- Fritz Buchthal y colaboradores reportaron que en un grupo de pacientes epilépticos de diferentes edades estudiados, presentaban una -- disminución en la actividad paroxismal cuando el nivel plasmático - de DFH fue mayor de 10 mcg/ml, asimismo reportaron que cuando la -- concentración plasmática de DFH fue menor de 10 mcg/ml, se incrementó la actividad paroxismal (24).

En este trabajo se trató de buscar la correlación entre concentración plasmática de DFH y la evolución del trazo electroencefalográfico en 39 pacientes estudiados, clasificando los hallazgos electroencefalográficos de la siguiente manera: E.E.G. anormal, E.E.G. normal, E.E.G. anormal pero con mejora del trazo, E.E.G. anormal pero con empeoramiento del trazo, estos electroencefalogramas se tomaron a cada uno de los 39 pacientes estudiados de manera simultánea a la toma de muestra sanguínea, y se compararon con un electroencefalograma tomado 6 meses antes, en la Figura N°. 9, puede observarse -- que solamente 3 pacientes presentan un electroencefalograma normal, de los cuales sólo 2 tienen una concentración plasmática de alrededor de 10 mcg/ml y uno de ellos menor a 10 mcg/ml; 27 pacientes presentaron un trazo electroencefalográfico francamente anormal, 25 de los cuales tenían una concentración plasmática inferior a 10 mcg/ml y solamente un paciente tuvo una concentración plasmática de 11 ---

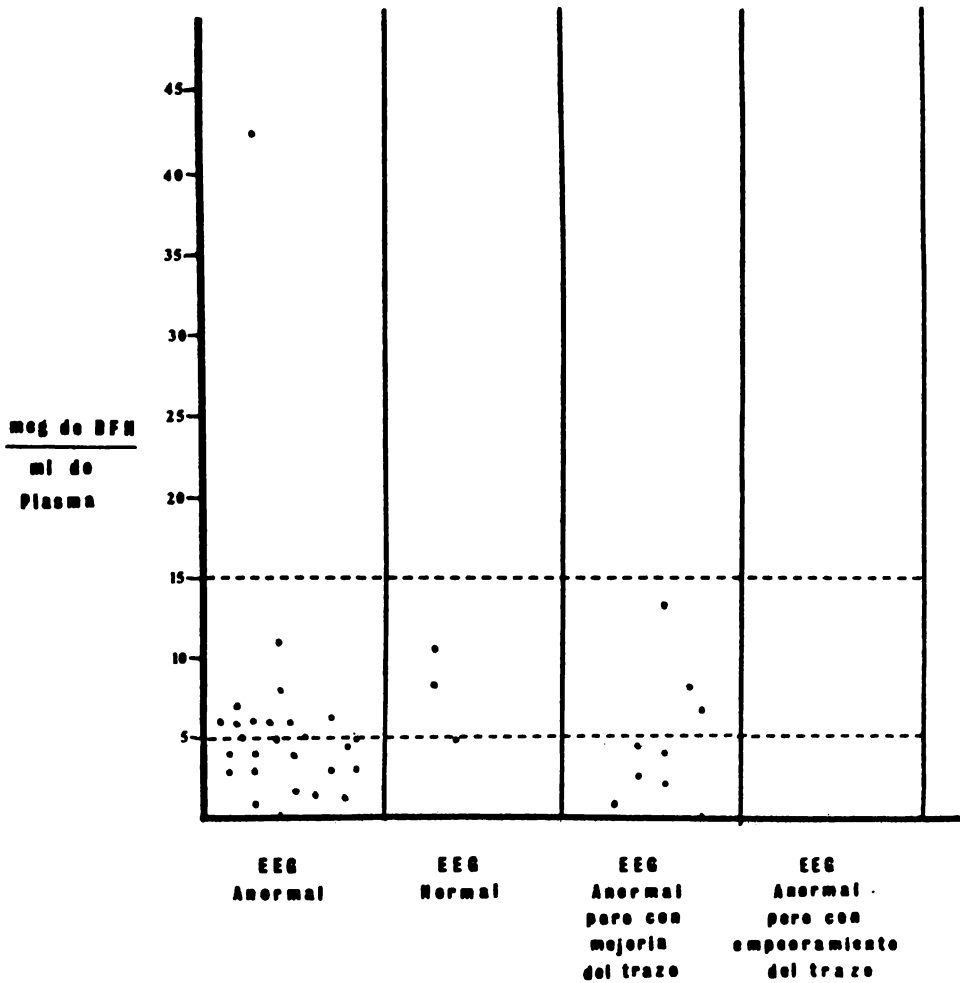


Figura N<sup>o</sup> 9. Relación Contracción plasmática de BFN -  
 Evolución del trazo electroencefalográfico.

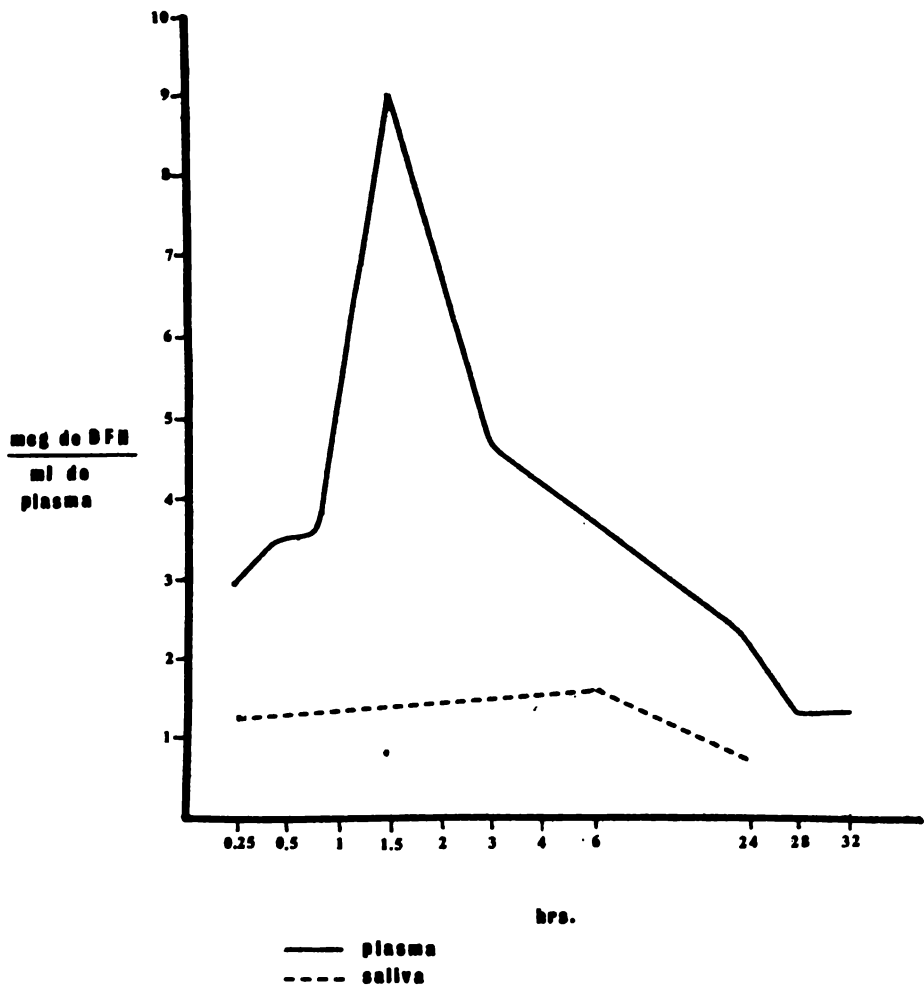
mcg/ml y otro paciente con una concentración plasmática de 42.5 mcg/ml, también presentó un trazo anormal; 9 pacientes presentaron un trazo - electroencefalográfico anormal pero que mejoró al compararlo con un -- electroencefalograma tomado con 6 meses de anterioridad, de los cuales 7 pacientes tuvieron una concentración plasmática de DFH inferior a 10 mcg/ml, uno de ellos presentó una concentración plasmática de DFH de - 10 mcg/ml y otro tuvo una concentración plasmática de DFH de 13 mcg/ml; no se observó ningún paciente con un trazo anormal que hubiese empeorado con relación a un electroencefalograma tomado 6 meses antes. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Buchthal (24), ya que encontramos que el 87.1% de pacientes con una concentración plasmática de - 5,5-Difenilhidantoina inferior a 10 mcg/ml, presenta un trazo electro-encefalográfico anormal, mientras que 1 de los 5 pacientes con una concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina mayor de 10 mcg/ml, presentaron un trazo electroencefalográfico anormal.

#### 5.5) RELACION CONCENTRACION PLASMATICA-CONCENTRACION SALIVAL DE DFH EN UN VOLUNTARIO

Actualmente existen algunos reportes que muestran la relación entre concentración plasmática y salival de DFH (28, 55). En el caso de fármacos como DFH, es posible calcular la fracción del fármaco enlazado a proteinas haciendo la determinación en plasma y saliva, simultáneamente, individual o repetidamente. J.C. Mucklow reportó que la concentración de -- DFH en saliva, es un reflejo de la concentración plasmática de DFH, ya que en el caso de fármacos que al pH normal de la sangre no se encuentran ionizados, la relación S/P que debe determinarse para cada paciente no se altera considerablemente.

En este trabajo se encontró que existe cierta relación entre la concentración plasmática y salival de DFH, lo cual puede observarse en la Figura N°. 10, haciendo notar que para validar más este resultado, es necesario estudiar un número estadísticamente representativo de pacientes





**Figura. N<sup>o</sup> 10. Relacion Concentracion Plasmatica de DFH -  
Concentracion Salival de DFH.**

por lo que sólo se sugiere que existe cierta tendencia lineal entre -  
la concentración plasmática de DFH y su respectiva concentración de -  
DFH en saliva a un tiempo dado.

## C A P I T U L O V I

### CONCLUSIONES

En relación al método analítico se puede concluir que la cromatografía de gases es un buen método para implementarse como rutina en la determinación de niveles plasmáticos de fármacos anticonvulsivos, con el cual pueden cuantificarse 20 muestras diariamente con un solo operador.

Se puede sugerir el empleo de la fase SP-2510 DA de supelco, ya que -- tiene la ventaja de cuantificar varios fármacos anticonvulsivos simultáneamente, evitando la necesidad de derivar la muestra (5, 6).

Se encontró una precaria relación entre dosis prescrita y concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina ( $r= 0.4$ ); se hace evidente la necesidad de establecer un régimen de dosificación individual y evitar la dosificación empírica, una vez establecido el régimen de dosificación -- en cada paciente, es importante notar que para que este régimen permanezca las marcas comerciales de 5,5-Difenilhidantoina sean bioequivalentes (45).

Se encontró que el 51.2% de los pacientes estudiados presentan una concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina inferior a la reportada como terapéutica, asimismo el 38.4% de los pacientes estudiados no tienen un adecuado control de sus crisis convulsivas, por lo cual se considera que un importante porcentaje de pacientes estudiados no tienen un adecuado control sintomático de su enfermedad.

Se sugiere realizar un estudio con un mayor número de pacientes con el fin de determinar la concentración plasmática de 5,5-Difenilhidantoina y tratar de establecer intervalos de concentración terapéutica en pacientes mexicanos. Se sugiere la determinación de la concentración de

5,5-Difenilhidantofna en saliva, evitando de esta manera la venipuntura, especialmente útil tratándose de lactantes, adicionalmente la determinación de la concentración de 5,5-Difenilhidantofna en plasma y saliva simultáneamente, ofrece la ventaja de conocer la concentración de 5,5-Difenilhidantofna libre, así como la concentración total de 5,5-Difenilhidantofna en plasma.

## C A P I T U L O VII

### BIBLIOGRAFIA

1. - GAS CHROMATOGRAPHIC ON - COLUMN METHYLATION TECHNIQUE FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANTIEPILEPTIC DRUGS IN BLOOD
  - KENNETH H. DUDLEY, DANIEL L. BIUS, BETSY L. KRAUS AND LARRY W. BOYLES
  - EPILEPSIA, 18 (2) : 259, (1978)
  
2. - COMPARATIVE DETERMINATION OF PHENYTOIN BY SPECTROPHOTOMETRY, - GAS CHROMATOGRAPHY, LIQUID CHROMATOGRAPHY, ENZYME IMMUNOASSAY, AND RADIOIMMUNOASSAY
  - ALBERT CASTRO, JOAQUIN IBAÑEZ, JOSEPH L. DICESARE, REGINALD F. ADAMS, AND HERBERT MALIKUS
  - CLIN. CHEM., 24 (4) : 710 (1978)
  
3. - QUANTITATION OF ANTICONVULSANT DRUGS IN SERUM BY GAS CHROMATOGRAPHY ON THE STATIONARY PHASE SP-2510
  - WILLIAM GODOLPHIN AND JERRY THOMA
  - CLIN. CHEM., 24 (3) : 483, (1978)
  
4. - IMPROVED GAS - CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS FOR ANTICONVULSANTS
  - THOMAS E. HEWITT, DIANA L. SIEVERS, GERALD KESSLER
  - CLIN. CHEM., 24 (10), 1854, (1978)
  
5. - G. C. SEPARATION OF ANTICONVULSANT DRUGS

- SUPELCO, BULLETIN 768 A. (1977)
- 6 - QUANTITATIVE ANALYSIS OF UNDERIVATIZED ANTIEPILEPTIC -  
DRUGS
- SUPELCO, BULLETIN 779, (1979)
- 7. - SIMULTANEOUS GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS FOR THE FOUR  
COMMONLY USED ANTIEPILEPTIC DRUGS IN SERUM
- CHEMPITHERA VARUGHESE ABRAHAM AND HARRY DOUGLAS JOSLIN
- JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 128 : 281, (1976)
- 8. - DETERMINACION DE 5,5-DIFENILHIDANTOINA Y FENOBARBITAL  
EN PLASMA, POR CROMATOGRAFIA EN FASE LIQUIDA-GASEOSA -
- DRS. IVAN SAAVEDRA, GLORIA CONCHA, ANA LUISA VALENZUELA,  
D. GADAMES, E. MORALES Y OLIVIA BENTJERODT
- REV. MEDICA DE CHILE, 106 : 217 (1978)
- 9 - RAPID ISOTHERMAL DETERMINATION OF SOME ANTIEPILEPTIC -  
DRUGS BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY
- JAN ERIK BREDESEN
- CLIN. CHEM, 25 (9) : 1669 (1979)
- 10 - GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY OF UNDERIVATIZED DRUGS AFTER  
CHROMATOGRAPHIC EXTRACTION FROM BLOOD
- MARIO WERNER, ROBERT J. MOHBACHER AND CAROL J. RIENDEAU

- CLIN. CHEM 25 (12) : 2020, (1979)
- 11. - COMPARISON OF SERUM PHENYTOIN DETERMINATION BY THE SUBSTRATE-LABELED FLUORESCENT IMMUNOASSAY WITH GAS - CHROMATOGRAPHY, LIQUID CHROMATOGRAPHY, RADIOIMMUNOASSAY AND "EMIT"
  - RAPHAEL C. WONG, RON GEORGE, ROSITA YEUNG, AND JOHN F. BURD
  - CLIN. CHIMICA ACTA, 100 : 65, (1980)
- 12. - MICROTÉCHNIQUES FOR THE GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF BARBITURATES IN SMALL BLOOD SAMPLES
  - W DÜNGES AND E. BERGHEIM-IRPS
  - JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 145 : 265 (1978)
- 13. - RAPID AND SIMPLE CLEAN-UP AND DERIVATIZATION PROCEDURE -- FOR THE GAS CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ACIDIC DRUGS IN PLASMA
  - H. ROSEBOOM AND A. HULSHOFF
  - JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 173 : 65, (1979)
- 14. - ANTIEPILEPTIC DRUGS: A CURRENT ASSESSMENT OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF MULTIPLE DRUG THERAPY BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY-ON COLUMN METHYLATION
  - ELIZABETH B. SOLOW, JOHN M. METAKAS, AND THEODORE R. SUMMERS

- 15 - ANTIEPILEPTIC DRUGS QUANTITATIVE ANALYSIS AND INTERPRE-  
TATION
- C. E. PIPPENGER, J. K. PENRY AND H. KUTT RAVEN PRESS, -  
NEW YORK, 1978
- 16 - PLASMA ANTICÒNVULSANT LEVELS
- D. B. HUNNINGHAKE
- PHARMACOLOGY AND THE FUTURE OF MAN PROC. 5th. INT. CONGR.  
PHARMACOLOGY, SAN FRANCISCO 3 : 127, (1972)
- 17 - THE TREATMENT OF PAROXYSMAL DISORDERS
- JOHN H. MENKES, M.D.
- PEDIATRICS, 53 (4) : 529, (1974)
- 18 - THE TREATMENT OF STATUS EPILEPTICUS
- C. T. LOMBROSO
- PEDIATRICS, 53 (4) : 536, (1974)
- 19 - PSYCHOMOTOR EPILEPSY IN CHILDHOOD
- ARNOLD P. GOLD, M.D.
- PEDIATRICS, 53 (4) : 540 (1974)



- 20 - DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CHILDHOOD MYOCLONIC SEIZURES
- SAMUEL LIVINGSTON, M.D.
  - PEDIATRICS, 53 (4) : 542, (1974)
- 21 - UNUSUAL PRESENTATIONS OF EPILEPSIES
- GREGORY O. WALSH, M.D.
  - PEDIATRICS, 53 (4) : 548 (1974)
- 22 - TOXIC EFFECTS OF ANTICONVULSANTS: GENERAL PRINCIPLES
- H. HOSSEMAND, M.D.
  - PEDIATRICS, 53 (4) : 551, (1974)
- 23 - THE USE OF BLOOD LEVELS OF ANTIEPILEPTIC DRUGS IN -  
CLINICAL PRACTICE
- HENN KUTT, M.D.
  - PEDIATRICS, 53 (4) : 557, (1974)
- 24 - CLINICAL AND ELECTROENCEPHALOGRAPHIC CORRELATIONS -  
WITH SERUM LEVELS OF DIPHENYLHYDANTOIN
- FRITZ BUCHTAL, M.D. OLE SUENSMARY M. SC., AND POUL -  
J. SCHILLER, M.D.
  - A. M. A. ARCHIVES OF NEUROLOGY, 2 : 624 (1960)

- 25 - FARMACOLOGIA CLINICA DE ANTICONVULSIVANTES
- PEDRO A. LEHMANN P.
- PROYECTO DE INVESTIGACION (C.I.E.A. I.P.N.)
- 26 - LOADING AND CONVENTIONAL DOSE THERAPY WITH PENYTOIN IN -  
CHILDREN: KINETIC PROFILE OF PARENT DRUG AND MAIN METABOLITE  
LITE IN PLASMA
- WILSON, M. D., HOJER, M.D., AND A. RANE M.D.
- CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 20 (1) : 48, (1976)
- 27 - OPTIMAL PHENYTOIN THERAPY: A NEW TECHNIQUE FOR INDIVIDUALIZING  
ZING DOSAGE
- PETER W. MULLEN, Ph. D.
- CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 23 (2) : 228, (1978)
- 28 - DRUG CONCENTRATION IN SALIVA
- J. C. MUCKLOW, M.R. BENDING, G.C. KAHN, B. S C., AND C.T. -  
DOLLERY
- CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 24 (5) : 563, (1978)
- 29 - PLASMA LEVEL MONITORING OF DIPHENYLHYDANTOIN AND CARBAMAZEPINE  
PINE IN THE PEDIATRIC PATIENT
- ANDERS RANE AND JOHN T. WILSON

- CLINICAL PHARMACY AND CLINICAL PHARMACOLOGY, EDITED BY GOUVEIA, TOGNONI & VAN DER KLEIJN (CHAPTER 22, pp. 295)
- ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS 1976
- 30. - PHENYTOIN AND I g A CONCENTRATIONS IN PLASMA AND SALIVA IN EPILEPTIC CHILDREN
- T. MCDEER, G. TOMSON, O. FALK AND A. RANE
- ACTA PEDIATR. SCAND., 70 : 373, (1981)
- 31. - USEFULNESS OF BLOOD LEVELS OF ANTIEPILEPTIC DRUGS
- HENN KUTT MD, J. KIFFIN PENRY, MD.
- ARCH. NEUROL., 31 : 283, (1974)
- 32. - PLASMA DIPHENYLDANTOIN LEVELS AFTER LOADING AND MAINTENANCE DOSES
- B.J. WILDER, M.D., E. E. SERRANO, M. D., AND R. EUGENE RAMSAY, M.D.
- CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 14 (5): 797. (1973)
- 33. - OPTIMUM PHENYTOIN - DOSAGE REGIMENS
- T. M. LUDDEN, D. W. HAWKINS, J. P. ALLEN, S. F. HOFFMAN
- THE LANCET, pp. 307, (1976)
- 34. - ANTICONVULSANT DRUGS INTERACTIONS
- HANSTEN, Ph. D., LEA & FEBIGER
- DRUG INTERACTIONS PHILADELPHIA, 1973

35. - THE RATE OF DECLINE OF DIPHENYLHYDANTOIN IN HUMAN PLASMA -
- KEITH ARNOLD AND NICHOLAS GERBER
  - CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 11 (1) : 121, (1969)
36. - PHENYTOIN DOSAGE NOMOGRAM
- LARS LUND, GUNNAR ALVÁN
  - THE LANCET, pp. 1305, (1975)
37. - THE RENAL HANDLING OF DIPHENYLHYDANTOIN AND 5-(P-HYDROXYPHENYL) - 5-PHENYLHYDANTOIN
- F. BOCHNER, M.B., B.S., WAYNE D. HOOPER, M. Sc., JOHN M. — (SUTHERLAND) B. Sc., MERVYN J. EADIE M. D., P. D., AND JOHN H. TYRER, M.D.
  - CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 14 (5) : 791, (1973)
38. - ALKYLATION STUDIES OF 5,5-DISUBSTITUTED HYDANTOINS, APPLICA TION TO THE GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PHENYTOIN, MEPHENYTOIN AND NIRVANOL
- R. DE SAGHER, J. POCIUS AND J. P. THENOT
  - (JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 156 : 48, (1978)
39. - MICRO-DETERMINATION OF PLASMA DIPHENYLHYDANTOIN BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY
- JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 143 : 171, (1977)
40. - IDENTIFICATION AND ESTIMATION OF PHENYTOIN AND ITS MAJOR META BOLITE IN RAT BRAIN FOLOWING ITS ADMINISTRATION BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY AND, GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROME TRY
- K.K. MIDHA, C. CHARETTE, H. S. BUTTAR AND I. DUPUIS

- JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 11 (165) : 416, (1978)
  
- 41. - RAPID MICRO-METHOD FOR THE MEASUREMENT OF PHENOBARBITONE, -  
PRIMIDONE, AND PHENYTOIN IN BLOOD, PLASMA OR SERUM BY GAS -  
LIQUID CHROMATOGRAPHY
  
- D.M. RUTHERFORD AND R. J. FLANAGAN
  
- JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 11 (090) : 311, (1978)
  
- 42. - BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA
  
- L. S. GOODMAN, M.A., M.D. Y A. GILMAN Ph.D
  
- COPYRAIGHT, 1957 BY UTEHA
  
- 43. - ALGUNOS ASPECTOS BIOQUIMICOS Y ELECTROFISIOLÓGICOS DE LA --  
EPILEPSIA
  
- G. MASSIEU
  
- GACETA MEDICA DE MEXICO, 112 (1) : 3,(1976)
  
- 44. - TEXTBOOK OF BIOPHARMACEUTICS AND CLINICAL PHARMACOKINETICS
  
- Z. NIAZI
  
- APPLETON-CENTURY-CROFTS,(1979)
  
- 45. - THE EFFECT OF DISEASE STATES ON DRUG PHARMACOKINETICS
  
- L. Z. BENET
  
- AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION ACADEMY OF PHARMACEUTI  
CAL SCIENCES (1976)

- 46 - **INTESTINAL ABSORPTION OF VITAMIN D3 IN EPILEPTIC PATIENTS -  
AND PHENOBARBITAL-TREATED RATS**
- **K. SCHAEFER, D. KRAFT, D. VON HERRATH AND A. OPITZ**
- **EPILEPSIA, 13 : 509, (1972)**
47. - **PLASMA PROTEIN BINDING OF DIPHENYLHYDANTOIN IN MAN**
- **PER KNUT M. LUNDE, ANDERS RANE, SUMMER J. YAFFE, LARS LUNA,  
AND FOLKE SJOQVIST**
- **CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 11 (6) : 846, (1971)**
48. - **MONITORING SERUM-PHENYTOIN**
- **ALAN RICHENS, ANDREW DUNLOP, SUHAIL AH MAD, JOHN LAIDLAW**
- **THE LANCET, pp. 699, (1976)**
49. - **SERUM-PHENYTOIN LEVELS IN MANAGEMENT OF EPILEPSY**
- **ALAN RICHENS, ANDREW DUNLOP**
- **THE LANCET, pp. 247, (1975)**
50. - **DIPHENYLHYDANTOIN AND PHENOBARBITAL TOXICITY**
- **H. KUTT, MD., W. WINTERS, MD., R. SCHERMAN, MD., AND F. McDO  
WELL, MD.**
- **ARCH. NEUROL., 11 : 649, (1964)**
51. - **DIPHENYLHYDANTOIN METABOLISM, BLOOD LEVELS AND TOXICITY**
- **H. KUTT, MD., W. WINTERS, MD., R. KOKENGE, MD., AND F. McDO-  
WELL, MD**

- ARCH NEUROL., 11 : 642, (1964)
- . - HAEMATOLOGICAL EFFECTS OF ANTICONVULSANT TREATMENT
- E.H. REYNOLDS, M. LAUNDY
- THE LANCET, pp. 682, (1978)
- . - INCREASE OF SERUM HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN IN PHENYTOIN -  
USERS
- E. A. NIKKILÄ, MD., M. KASTE, MD C. EHNHOLM, MD., J. --  
VIIKARI, MD.
- BRITISH MEDICAL JOURNAL, 2 : 99 (1978)
- 4. - SERUM BILIRUBIN AND HEPATIC ENZYME INDUCTION
- SCOTT, A. K., JEFFERS, T.A.; PETRIE, J. C.; GILBERT, J.C.
- BRITISH MEDICAL JOURNAL, 2 : 310, (1979)
- 5. - ANTICONVULSANTS AND THYROID FUNCTION
- P P B YEO, D BATES, J G HOWE, W A RATCLIFFE, C W SCHARDT,  
A HEATH, D C EVERED
- BRITISH MEDICAL JOURNAL, 1 : 1581 (1978)
- 6. - DECREASED SERUM 24,25-DIHYDROXY VITAMIN D CONCENTRATIONS -  
IN CHILDREN RECEIVING CHRONIC ANTICONVULSANT THERAPY
- WEISMAN, FATTAL, EISENBERG, HAREL, SPIRER, HARELL
- BRITISH MEDICAL JOURNAL, 2 : 521 (1979)

57. - DIPHENYLHYDANTOIN CONCENTRATIONS IN SALIVA
- F. BOCHNER, WAYNE, EADIE, TYRER
  - ARCH NEUROL, 31 : 57 (1974)
- 58 - GENETICS OF CONVULSIVE DISORDERS
- KATHERIN METRAKOS, JULIUS METRAKOS,
  - NEUROLOGY, 10 : 474 (1960)
- 59 - STUDIES ON THE METABOLISM OF DIPHENYLHYDANTOIN (DILANTIN)
- EUGENE W. LOESR, Jr.
  - NEUROLOGY, 10 : 424 (1960)
- 60 - THE MERCK INDEX, NINTH EDITION
- MARTHA WINDHOLZ, EDITOR
  - MERCK & C<sup>o</sup>. INC., RAHWAY, N.J., U.S.A.