

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Departamento de Farmacología

**Estudio de la interacción farmacocinética entre glibenclamida y
losartán en ratas**

Tesis que presenta

QFI ROBERTO GARRIDO HERNÁNDEZ

Para obtener el Grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

Director de Tesis: Dr. Carlos Hoyo Vadillo

MÉXICO, D.F., DICIEMBRE DE 2014

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio 10 del departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), bajo la dirección del Dr. Carlos Hoyo Vadillo con el apoyo de la beca CONACyT No. de CVU.- 290480

DEDICATORIA

A mis papás y hermano por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Hoyo Vadillo por permitirme estar en su laboratorio y ayudarme durante la tesis.

A mis sinodales por su apoyo y su guía en el desarrollo de esta tesis.

A las siguientes personas por su ayuda durante la parte experimental de esta tesis:

Aux. de Inv. Flor María Galván Rodríguez- Depto. Farmacología

Martha Patricia Gonzalez García- Depto. Farmacología

MVZ. Benjamin Emmanuel Chávez Álvarez- Bioterio Cinvestav-IPN

IBQ. Luis Francisco Vázquez Flores- Depto. Farmacología

QFB Sael Casas Grajales- Depto. Farmacología

Lic. en Enfermería Rosa Elena Flores Beltrán- Depto. Farmacología

Sr. Luis Ramón Hernández Guadarrama- Depto. Farmacología

Dr. Pablo Muriel de la Torre- Depto. Farmacología

MVZ María Antonieta López López- Bioterio Cinvestav-IPN

Indice General

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Interacción Farmacocinética	4
2.1.1. Alteración de la absorción de los fármacos.....	4
2.1.2. Distribución de los fármacos	6
2.1.3. Biotransformación de fármacos.....	6
2.1.4. Eliminación del fármaco	8
2.2. Diabetes.....	8
2.2.1. Diabetes tipo 1	9
2.2.2. Diabetes tipo 2	9
2.3. Complicaciones de la Diabetes	10
2.4. La diabetes y la hipertensión	11
2.5. Fármacos	12
2.5.1. Glibenclamida	13
2.5.2. Losartán Potásico	14
2.6. Diabetes en México.....	15
3. Justificación y Objetivo del Trabajo	16
3.1. Justificación	16
3.2. Hipótesis	16
3.3. Objetivo general.....	16
3.4. Objetivos particulares.....	16
4. Materiales y Métodos.....	17
4.1. Estándares.....	17
4.2. Método Bioanalítico.....	17
4.2.1. Validación del método Bioanalítico	18
4.2.1.1. Selectividad	18
4.2.1.2. Límite Inferior de cuantificación	18
4.2.1.3. Curva de Calibración	19
4.2.1.4. Precisión y Exactitud.....	20
4.2.1.5. Estabilidad	21
4.3. Animales y Administración	21

4.4.	Estudio Farmacocinético	22
4.4.1.	Procesamiento de muestras.....	23
4.4.2.	Condiciones cromatográficas	24
4.5.	Farmacocinética y Análisis Estadístico	24
5.	Resultados y Discusión.....	25
5.1.	Validación del método analítico.....	25
5.1.1.	Selectividad.....	25
5.1.2.	Curva de calibración	26
5.1.3.	Repetibilidad y Reproducibilidad.....	30
5.1.4.	Exactitud	32
5.1.5.	Estabilidad.....	33
5.2.	Farmacocinética.....	35
5.2.1.	Curvas Farmacocinéticas.....	35
5.2.2.	Parametros farmacocinéticos.....	38
6.	Conclusiones	44
7.	Bibliografía.....	45

GLOSARIO DE TÉRMINOS

P-gp	Glicoproteína P
CYP	Citocromo P450
ACE	Enzima convertidora de Angiotensina
Ang II	Angiotensina II
IP3K	Fosfatidil-3-inositol cinasa
MAPK	Protein cinasa activada por mitogeno
LIC	Limite inferior de cuantificación
MCB	Muestra control baja
MCM	Muestra control media
MCA	Muestra control Alta
ABC_{0-12h}	Área bajo la curva de 0 a 12 horas
ABC_{0-inf}	Área bajo la curva de 0 a infinito
Ke	Constante de eliminación
Cl	Depuración
F	Biodisponibilidad
C _{máx}	Concentración máxima
T _{max}	Tiempo donde se encuentra la concentración máxima
EI	Estándar Interno
NOM	Norma Oficial Mexicana

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Sistema de acarreador glicoproteína P</i>	5
<i>Figura 2 Biotransformación de Fármacos</i>	7
<i>Figura 3 Interacción entre ang II y el receptor de insulina en células musculares.</i>	12
<i>Figura 4 Estructura química de la glibenclamida</i>	13
<i>Figura 5 Estructura química del Losartán</i>	14
<i>Figura 6 Cromatogramas para determinar selectividad</i>	18
<i>Figura 7 Equipo para anestesiarse animales.</i>	22
<i>Figura 8 Diagrama de flujo para la recuperación de fármacos</i>	23
<i>Figura 9 Cromatograma muestra blanco</i>	25
<i>Figura 10 Cromatograma de LIC</i>	25
<i>Figura 11 Curva tipo losartán</i>	27
<i>Figura 12 Curva tipo glibenclamida</i>	27
<i>Figura 13 Curva farmacocinética losartán</i>	35
<i>Figura 14 Curva farmacocinética de glibenclamida</i>	36
<i>Figura 15 Comparación de las áreas bajo la curva 0-12 h de de losartán solo y combinado con glibenclamida, valor $p= 0.0054$.</i>	38
<i>Figura 16 Comparación de las áreas bajo la curva 0-inf de losartán solo y combinado con glibenclamida, valor $p= 0.0013$.</i>	39
<i>Figura 17 Comparación de las áreas bajo la curva 0-12 h de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.065$.</i>	40
<i>Figura 18 Comparación de las áreas bajo la curva 0-infinito de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.088$.</i>	40
<i>Figura 19 Comparación de la depuración de losartán solo y combinado con la glibenclamida, valor $p= 0.04$</i>	41
<i>Figura 20 Comparación de la depuración de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.088$.</i>	42
<i>Figura 21 Comparación de las constantes de eliminación de losartán solo y combinado con la glibenclamida, valor $p= 0.76$.</i>	43
<i>Figura 22 Comparación de las constante de eliminación de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.49$</i>	43

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Distribución de los animales.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 2 Resultados de las curvas de calibración de losartán en plasma.</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 3 Resultados de las curvas de calibración de glibenclamida en plasma.</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 4 Resultados obtenidos en la linealidad del método.</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 5 Resultados obtenidos en la repetibilidad de losartán y glibenclamida.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 6 Resultados obtenidos en la reproducibilidad de losartán y glibenclamida.</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 7 Resultados de Exactitud de gibenclamida y losartán.</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 8 Resultados de estabilidad de glibenclamida y losartán.</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 9 Datos reportados para losartán y glibenclamida en ratas.....</i>	<i>37</i>

1. Resumen

En años recientes, con el desarrollo de la medicina la esperanza de vida de las personas ha ido en aumento, esto y el estilo de vida ha dado lugar a mayor cantidad de enfermedades, cada vez mas complejas que requieren de tratamiento con múltiples fármacos para poder tratarlas, esto trae como consecuencia que sea más común hoy en día encontrar interacciones entre fármacos. Las interacciones farmacocinéticas son aquellas interacciones en la cual un fármaco altera cualquiera de los procesos absorción, distribución, biotransformación y eliminación de otro fármaco.

Una de estas enfermedades en la que se presentan multiples complicaciones es la diabetes, que se caracteriza por una ineficiencia hipoglicemiante, está enfermedad tiene alta incidencicia en México, en años recientes se ha encontrado una alta relación entre la diabetes y la hipertensión, ya que el sistema renina-angiotensina que da lugar a la angiotensina II (un poderoso vasoconstrictor) se encuentra alterado, este polipéptido interactúa con la cascada de señalización de la insulina promoviendo la resistencia a esta hormona, Es por esta razón que a pacientes diabéticos se les prescribe el uso de antagonistas de los receptores AT1 para controlar la hipertensión y mejorar el efecto de la insulina. Ambos fármacos tanto la glibenclamida como el losartán son metabolizados por los citocromos P450 familia 3A4 y 2C9, sospechando una posible interacción entre estos fármacos.

El presente proyecto tiene como objetivo estudiar la posible interacción farmacocinética entre la glibenclamida y losartán en ratas, no se han realizado estudios previos de interacción entre estos fármacos. Dentro de los resultados obtenidos se observa una interacción a nivel del proceso de absorción, aumentando la concentración de losartán al ser combinado con la glibenclamida, este aumento puede deberse a que la glibenclamida se encuentra inhibiendo la glicoproteína-P, proteína acarreadora muy importante en el proceso de absorción de fármacos y por otro lado el losartán no es capaz de altera los parámetros farmacocinéticos de la glibenclamida.

Abstract

In recent years with the development of medicine and the increase of life expectancy, has led to greater amount of diseases, each time requiring more complex treatment with multiple drugs to cure it, so nowadays is more common encounter drug-drug interactions. Pharmacokinetic interactions are those in which a drug alters any process involving the pharmacokinetics, these processes can be: absorption, distribution, biotransformation and elimination.

One of these diseases that presents multiple complications is diabetes, which is characterized by the inefficiency to decrease the concentration of glucose in blood, this disease has high incidence in Mexico and the world, in recent years it has found a high relation of diabetes and hypertension, as the renin-angiotensin system which results in a powerful vasoconstrictor such as angiotensin II is altered, this polypeptide interacts with the signaling cascade by promoting insulin resistance, which is why diabetic patients are prescribed the use of angiotensin receptor antagonists to treat hypertension and improve the effect of insulin. In Mexico is very common prescription of glyburide for the treatment of type 2 diabetes because of its low cost, both drugs glibenclamide and losartan are metabolized by cytochrome P450 family 3A4 and 2C9, suspecting a possible interaction between these drugs.

This project aims to study the possible pharmacokinetic interaction between glyburide and losartan in rats, no previous studies of interaction between these drugs has been made. Among the results obtained an interaction is observed at the absorption process, increasing the concentration of losartan when combined with glibenclamide, this increase may be due to the inhibition of P-glycoprotein by glibenclamide and secondly losartan is not able to modified pharmacokinetic parameters of glibenclamide.

2. Introducción

La gente alrededor del mundo confía en los medicamentos para prevenir, curar, o reducir enfermedades. Los fármacos pueden ser tanto benéficos como perjudiciales, la meta de la terapia es maximizar los efectos benéficos, y disminuir los efectos adversos, cada fármaco prescrito tiene una relación costo-beneficio, Si el beneficio de tomar un fármaco sobrepasa el riesgo de los efectos adversos, entonces la terapia con ese fármaco es apropiada.

Por otro lado, el tomar uno o más fármacos que interaccionan pueden cambiar esta relación costo-beneficio, cambiando lo que alguna vez fue una terapia apropiada por una terapia no apropiada debido al incremento del riesgo de una interacción entre fármacos.

Conforme un individuo envejece, aumenta el número de enfermedades, por lo tanto el paciente puede llegar a tomar más de un fármaco a la vez para tratar un desorden múltiple. Cuando se prescribe una terapia multi-fármacos, las interacciones entre los fármacos toman mayor importancia.

La interacción entre los fármacos es considerada clínicamente significativa cuando ocurre entre dos o más agentes co-administrados y resulta en la necesidad de un ajuste de dosis para los agentes.

La interacción entre los fármacos ocurre cuando dos o más fármacos son administrados al mismo tiempo, la acción de un fármaco es alterado por la presencia de otro fármaco, la interacción entre fármacos pueden ser ampliamente divididos en dos grupos: interacción farmacodinámica e interacción farmacocinética.

La interacción farmacodinámica se refiere al cambio de la respuesta que presenta el paciente en presencia de otro fármaco con o sin alterar la farmacocinética, es decir, cambia la acción del fármaco sin alterar las concentraciones plasmáticas¹.

2.1. Interacción Farmacocinética

La interacción farmacocinética es cuando un fármaco altera la velocidad o magnitud de cualquiera de los cuatro procesos básicos farmacocinéticos: absorción, distribución, metabolismo, excreción (ADME) de otro fármaco.

Este tipo de interacción es mediada por el cambio en uno o más parámetros farmacocinéticos, como la concentración sérica máxima, la vida media, el área bajo la curva, la depuración, etc.¹

2.1.1. Alteración de la absorción de los fármacos

El proceso de absorción de los fármacos se puede ver afectado de diversas maneras debido a:

- Movilidad del intestino.
- pH del intestino.
- Solubilidad del fármaco.
- Metabolismo del intestino.
- Flora intestinal.
- Actividad de las proteínas acarreadoras.

La absorción de los fármacos puede verse alterada por la presencia de otro fármaco que altere la movilidad intestinal, ya que muchos fármacos son absorbidos principalmente en el intestino delgado, si se disminuye o aumenta la velocidad a la que el fármaco llega a esta zona del tracto gastrointestinal, se puede disminuir o aumentar la velocidad de absorción del otro fármaco.

Otra manera de modificar la absorción es modificando el pH del tracto gastrointestinal, algunos fármacos requieren de un ambiente básico o ácido para poder disolverse, los ácidos débiles existirán en su forma no ionizada en un ambiente ácido, facilitando su absorción, mientras que bases débiles serán más fácilmente absorbibles en ambientes básicos.

Otro mecanismo que puede alterar la absorción de los fármacos involucra la actividad de una proteína acarreadora unida a la membrana plasmática que se encuentra en muchos tejidos, especialmente en los órganos responsables de la absorción y eliminación de los fármacos.

La glicoproteína-P (P-gp) es descrita como una glicoproteína acarreadora dependiente de ATP, presente en la membrana plasmática, responsable del transporte activo de una gran variedad de sustratos endógenos y exógenos en el intestino, los túbulos proximales en el riñón y el cerebro.

La P-gp actúa como una bomba con fármacos y toxinas que son transportados fuera de los tejidos, los fármacos son bombeados a través de la membrana plasmática hacia el fluido intersticial o hacia los fluidos excretores, como la bilis, de este modo, limitando la absorción (Figura 1)².

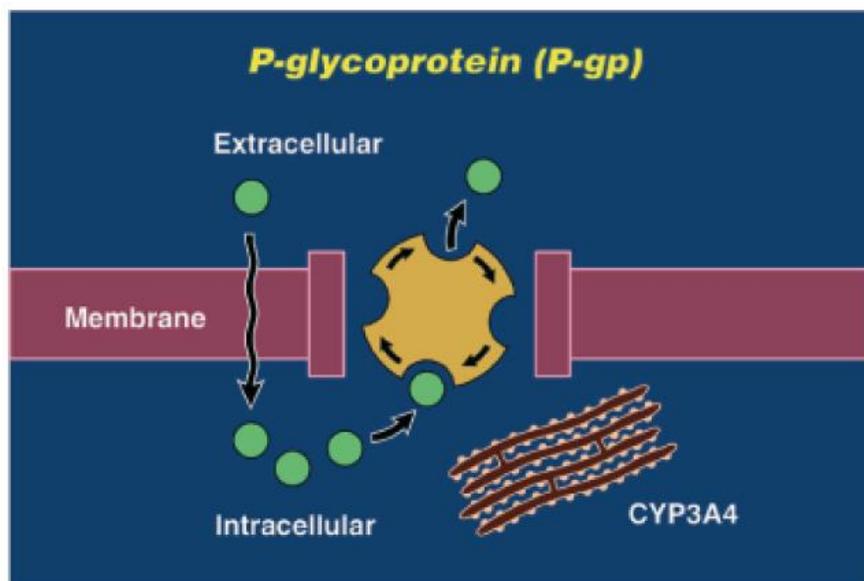


Figura 1 Sistema de acarreador glicoproteína P

Debido a lo mencionado anteriormente, la P-gp debe ser considerada como parte del efecto de primer paso, ya que trabaja cooperativamente con el citocromo P450.

Inhibiendo la función de P-gp puede resultar en un incremento de la absorción de los fármacos, e inducir la actividad de P-gp puede disminuir la absorción del fármaco.

2.1.2. Distribución de los fármacos

Los fármacos son transportados a su sitio de acción o eliminación unidos a proteínas séricas. Mientras el fármaco se encuentra unido a proteínas plasmáticas, el fármaco no contribuye a la concentración del gradiente, no puede ser filtrado por el riñón, en general es farmacológicamente inerte. El fármaco no unido a proteínas plasmáticas o libres es farmacológicamente activo.

Desde el punto de vista de la interacción, un fármaco con alta afinidad por las proteínas séricas puede desplazar un fármaco con menos afinidad, de este modo incrementando la concentración del fármaco menos afín. Por lo tanto, la fracción no unida del fármaco estará más expuesta para su sitio de acción así como más disponible para su eliminación. En la práctica, la interacción por desplazamiento de las proteínas séricas no produce cambios clínicos importantes.

2.1.3. Biotransformación de fármacos

Estudios recientes sugieren que las interacciones más relevantes clínicamente, involucran vías metabólicas. La mayoría de los fármacos son eliminados del cuerpo, al menos en parte, por reacciones químicas a productos más hidrosolubles, y son excretados por los riñones o por la bilis.

El metabolismo puede dividirse en dos fases: Fase 1 y fase 2.

El metabolismo de fase 1, involucra reacciones de oxidación, hidrólisis y reducción de un fármaco. Estas reacciones incrementan la solubilidad de los fármacos en agua y con esto facilitan su eliminación del cuerpo.

Las enzimas que catalizan esta reacción son conocidas como citocromo P450 (CYP). El citocromo es una proteína compleja, que utiliza oxígeno molecular y NADPH como fuente de electrones, este sistema cataliza una serie de reacciones de oxido-reducción, que resultan en la oxidación del fármaco.

Existen más de 50 familias identificadas, pero solo 3 familias (CYP1, CYP2, CYP3) son responsables del metabolismo de la mayoría de los compuestos.

La familia de los citocromos P3A (CYP 3A5, CYP3A4) es la más abundante y clínicamente significativa, es la más común y está implicada en la mayoría de las interacciones entre fármacos, la presencia de la familia CYP3A en el intestino delgado resulta en la disminución de la biodisponibilidad de muchos fármacos.²

El metabolismo de fase 2 involucra reacciones en las que se le adhiere una molécula adicional al fármaco con la finalidad de crear un compuesto inactivo y aumentar la solubilidad del fármaco en agua. Las reacciones de la fase 2 incluyen conjugación con glutatión, glucuronidación, sulfatación, acetilación y metilación(Figura 2).

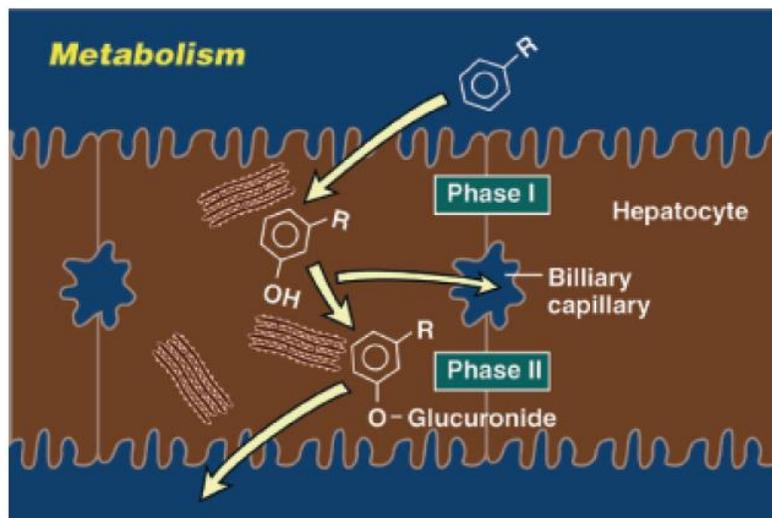


Figura 2 Biotransformación de Fármacos

Teóricamente, dos fármacos que son metabolizados por la misma enzima, pueden producir una interacción, los dos fármacos competirán por la misma enzima, por lo tanto, un fármaco puede ser metabolizado mientras que en el otro fármaco se reduce el metabolismo, resultando en una mayor concentración plasmática del fármaco no metabolizado².

2.1.4. Eliminación del fármaco

Así como el hígado es el órgano primario involucrado para la biotransformación de fármacos, el riñón es el órgano primario encargado de la excreción de los fármacos del cuerpo.

Las alteraciones en la excreción renal pueden ocurrir por distintos mecanismos, incluyendo cambios en el pH urinario, competencia por el mismo sistema de reabsorción, cambios en la secreción tubular, o cambios en el flujo sanguíneo.

La acidificación de la orina puede resultar en un incremento en la tasa de excreción urinaria de bases débiles, esto debido a que en un ambiente más ácido se favorece la formación del fármaco en su forma ionizada, disminuyendo la cantidad que se reabsorbe, por otro lado, la excreción de ácidos débiles es favorecida por condiciones alcalinas.

2.2. Diabetes

Como bien se mencionó en los párrafos anteriores, existe un interés en conocer las interacciones entre fármacos, en enfermedades donde se prescriben múltiples fármacos.

El interés de este proyecto se centra en estudiar la interacción entre los fármacos que se pueden presentar en personas diagnosticadas con diabetes, que es una enfermedad en la que comúnmente se presentan complicaciones como la hipertensión, por ende, se prescriben varios fármacos como la glibenclamida y losartán, que se detallarán más adelante.

Pero ¿Qué es la diabetes?

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina o no puede usar la insulina eficazmente. La insulina es una hormona producida en el páncreas que permite que la glucosa de los alimentos entre a las células del cuerpo, donde se convierte en la energía necesaria para que funcionen los músculos y los tejidos. Una persona con diabetes no absorbe adecuadamente la glucosa, y la glucosa sigue circulando por

la sangre (una afección conocida como hiperglucemia), lo cual daña con el tiempo los tejidos del cuerpo. Este daño puede conducir a una discapacidad y a complicaciones de salud que pueden llegar a ser mortales. Hay dos tipos principales de diabetes:

- La diabetes tipo 1
- La diabetes tipo 2

2.2.1. Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensa del cuerpo ataca las células β , productoras de insulina en el páncreas. Como resultado, el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. No se sabe muy bien por qué ocurre esto. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero generalmente se presenta en niños o adultos jóvenes. Las personas con este tipo de diabetes necesitan insulina todos los días para controlar los niveles de glucosa en sangre. Sin insulina, una persona con diabetes tipo 1 muere.

2.2.2. Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es el tipo de diabetes más común. Por lo general, ocurre en adultos, pero cada vez más aparece en niños y adolescentes. En la diabetes tipo 2, el cuerpo puede producir insulina, pero no en cantidad suficiente o bien el cuerpo no puede responder a sus efectos, dando lugar a una acumulación de glucosa en sangre. Muchas personas con diabetes tipo 2 no son conscientes de su enfermedad durante mucho tiempo, ya que los síntomas pueden tardar años en aparecer o ser reconocidos, pero durante este tiempo el cuerpo está siendo dañado por el exceso de glucosa en sangre. Estas personas suelen ser diagnosticadas sólo cuando las complicaciones de la diabetes ya se han desarrollado. Aunque todavía no se conocen las causas del desarrollo de la diabetes tipo 2, hay varios factores de riesgo importantes. Por ejemplo:

- La obesidad

- La mala alimentación
- La inactividad física
- La edad avanzada
- Los antecedentes familiares de diabetes

A diferencia de las personas con diabetes tipo 1, la mayoría de las personas con diabetes tipo 2 no requieren, por lo general, dosis diarias de insulina para sobrevivir. Muchas personas pueden controlar su enfermedad a través de una dieta sana y una mayor actividad física, y medicación oral. Sin embargo, si no son capaces de regular sus niveles de glucosa en sangre, puede que tengan que tomar insulina. El número de personas con diabetes tipo 2 está creciendo rápidamente en todo el mundo. Este aumento está asociado al desarrollo económico, el envejecimiento de la población, la creciente urbanización, los cambios en la dieta, la poca actividad física y los cambios en otros patrones de estilo de vida.

2.3. Complicaciones de la Diabetes

Las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden provocar la discapacidad o la muerte. Los constantemente altos niveles de glucosa en sangre pueden conducir a enfermedades graves que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. Las personas con diabetes también tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones. La diabetes es la principal causa de las enfermedades cardiovasculares, la ceguera, la insuficiencia renal y la amputación de miembros inferiores; y a medida que la prevalencia de la diabetes tipo 2 crece en los países en vías de desarrollo, también lo hace el impacto de estas costosas complicaciones tanto en términos humanos como económicos. El mantenimiento de los niveles normales de glucosa en sangre, la presión arterial y el colesterol puede ayudar a retrasar o prevenir las complicaciones de la diabetes. Las personas con diabetes requieren un seguimiento regular de las complicaciones.

La enfermedad cardiovascular es la causa más común de muerte y discapacidad entre las personas con diabetes. Algunas de las enfermedades cardiovasculares

que acompañan a la diabetes son la angina de pecho, el infarto de miocardio (ataque al corazón), la enfermedad arterial periférica y la insuficiencia cardíaca congestiva. En las personas con diabetes, la presión arterial alta, el colesterol alto, la alta glucosa en sangre y otros factores de riesgo contribuyen al aumento del riesgo de complicaciones cardiovasculares³.

2.4. La diabetes y la hipertensión

La tolerancia reducida a la glucosa y la hipertensión arterial están fuertemente asociadas, ya que, se ha observado que la mayoría de pacientes con diabetes tipo 2, desarrollan nefropatía diabética con glomeruloesclerosis nodular y expansión mesangial, alterando con esto el sistema renina-angiotensina, que es de gran importancia en la regulación de la presión arterial⁴.

Desde un punto de vista clásico, el sistema renina-angiotensina es considerado un sistema endocrino donde su metabolito activo, la angiotensina II (Ang II) es producido por la actividad enzimática a partir del angiotensinógeno que es de origen hepático. En la circulación sanguínea, la renina (enzima proveniente de las células yuxtaglomerulares del riñón) convierte el angiotensinógeno circulante en un decapeptido llamado angiotensina I (Ang I), la cual es convertida a angiotensina II por la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La angiotensina II, es un potente vasoconstictor que incrementa la resistencia vascular periférica y consecuentemente eleva la presión arterial, así como también puede causar resistencia a la insulina por interferencia con la vía de asociada al PI3K activada por la insulina (Figura 3)⁵.

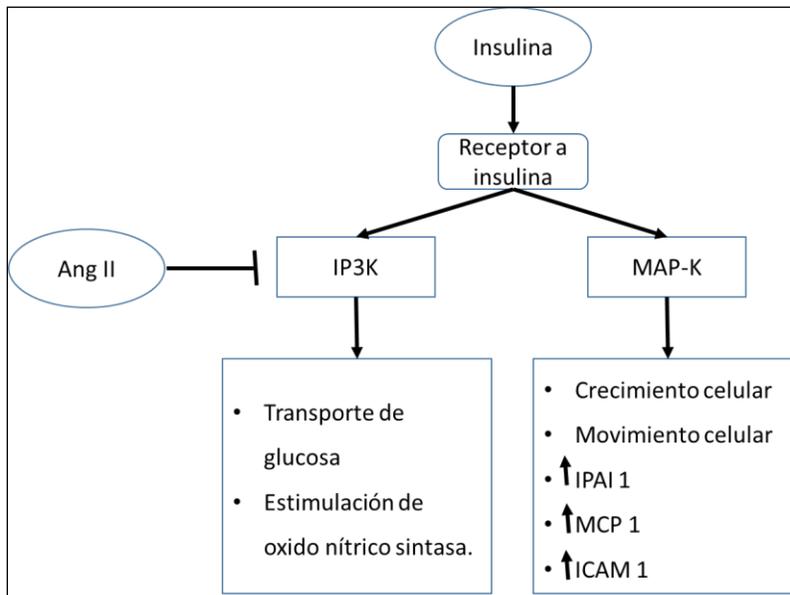


Figura 3 Interacción entre angiotensina II y el receptor de insulina en células musculares.

Se ha demostrado que el sistema renina-angiotensina está implicado en la iniciación y progresión de este desorden, ya que se ha observado que el sistema renina-angiotensina está muy activado en la diabetes con incrementos de Ang II en tejidos que lleva al desarrollo de la nefropatía diabética. Se ha demostrado que el bloqueo del sistema renina-angiotensina, reduce los niveles de Ang II en tejidos, con efectos benéficos en la función renal y cardiovascular, en estudios clínicos se ha utilizado inhibidores del sistema renina-angiotensina como antagonistas de receptores AT1, y estos han reducido significativamente la incidencia de complicaciones vasculares en pacientes diabéticos.

Con respecto a las acciones preventivas en la diabetes tipo 2, se ha observado que la inhibición del sistema renina-angiotensina mejora la sensibilidad a la insulina, permitiendo una mejor acción de la insulina y a una reducción de la dosificación de la insulina en pacientes diabéticos.

2.5. Fármacos

Los fármacos en los que se centrará este proyecto son glibenclamida y losartán, debido a que las sulfonilureas, cuya principal representante es la glibenclamida es un fármaco ampliamente utilizado en el Sector salud en México por su bajo costo⁶,

y el losartán que se ha demostrado ser eficaz en la prevención y tratamiento de hipertensión y nefropatías en la diabetes⁷.

2.5.1. Glibenclamida

La glibenclamida (Figura 4) es un fármaco que pertenece a la familia de las sulfonilureas de segunda generación que actúa mejorando el control de la glucosa, actuando tanto en el control de la secreción de insulina, como en la acción de la misma⁸.

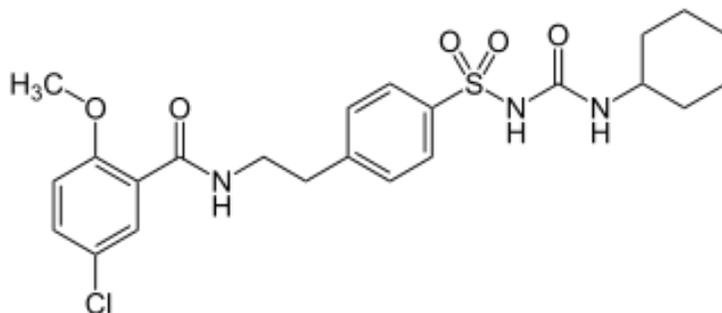


Figura 4 Estructura química de la glibenclamida

En la diabetes tipo 2, existe una resistencia a la insulina, que puede deberse a una secreción ineficiente de la insulina por parte de las células β del páncreas, o a la ineficiente captación de la glucosa en los tejidos. La glibenclamida actúa sobre la secreción de la insulina en las células β del páncreas, ya que este fármaco se une a los canales de potasio dependientes de ATP presentes en la membrana de estas células, disminuyendo con esto su conductancia y el flujo de potasio, produciendo una despolarización de la membrana, que llevará a un influjo de iones calcio, la alta concentración intracelular de calcio disparará la movilización de las vesículas que contienen insulina en su interior hacia la membrana plasmática que culminará en la secreción de insulina al exterior de las células β , ayudando con esto a que la glucosa pueda ingresar al interior de las células⁸.

Esta sulfonilurea se absorbe completamente en el tracto gastrointestinal, alcanzando su C_{max} de 2 a 4 horas, tiene una alta unión a proteínas plasmáticas (90%), su biotransformación se lleva a cabo en el hígado por CYP3A4 y por el CYP2C9, teniendo una vida media de 10 horas, eliminándose del cuerpo por orina y heces.

Los efectos adversos de la glibenclamida son: puede causar hipoglicemia severa causando mareos, visión borrosa, náuseas, además, vómito, dolor epigástrico, estreñimiento y diarrea, sin embargo, el efecto adverso más severo se encuentra a largo plazo, ya que se ha observado que existe una disminución en la función de la célula β paralelo al deterioro progresivo del control de la glicemia, lo cual posteriormente, en estudios realizados en islotes humanos aislados han encontrado que la glibenclamida indujo en 2.09 y 2.46 veces el aumento en la apoptosis de la célula β .

2.5.2. Losartán Potásico

El losartán potásico (Figura 5) es un antagonista no peptídico que se une selectivamente con alta afinidad a los receptores AT1, evitando con esto, la actividad de la angiotensina II. El metabolito activo del losartán (E3174) es un antagonista no competitivo que se une a los receptores AT1 con mayor afinidad que el losartán, el E3174 es de 15 a 20 veces más potente al inhibir los efectos de la angiotensina II.¹⁰

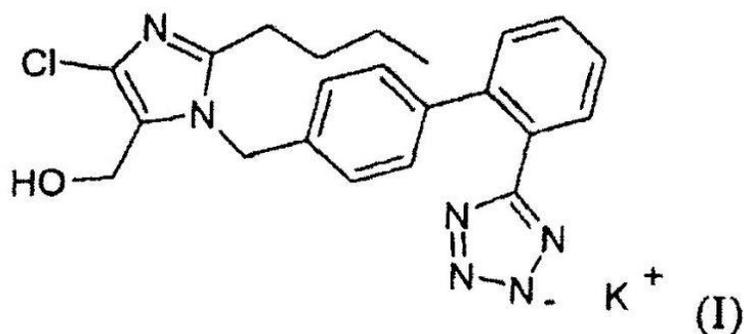


Figura 5 Estructura química del Losartán

Los receptores AT1 son receptores con 7 dominios transmembranales acoplados a una proteína G α . La angiotensina II se une a los dominios 2 y 3 para activar al receptor, entonces el receptor sufrirá un cambio conformacional que dejará libre a la proteína G α , que activará a la proteína fosfolipasa C (PLC), enzima que a su vez, hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), formándose inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol. El IP3 actúa sobre los receptores específicos localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico y facilita la liberación del

calcio allí almacenado. El resultado final es un aumento de la concentración intracelular de calcio, que aumenta el tono arteriovenoso, produciéndose un aumento en la tensión arterial. En la diabetes, este sistema renina-angiotensina se encuentra muy activado por lo que el losartán y su metabolito (E3174) actúan bloqueando al receptor AT1, evitando que la angiotensina II se una a este, evitando la cascada de señalización y produciendo la disminución de la tensión arterial.

El losartán se administra por vía oral, teniendo una biodisponibilidad de alrededor del 33% ya que sufre metabolismo de primer paso, al ser un compuesto muy soluble en agua se absorbe rápidamente alcanzando la C_{max} en 1 hora. Tiene una alta unión a proteínas plasmáticas (98%), la biotransformación del losartán se lleva a cabo en el hígado por el CYP3A4 y el CYP2C9, teniendo una vida media de 2 horas, y su metabolito activo (E3174) de 4 a 6 horas, eliminándose principalmente por vía renal.¹⁰

2.6. Diabetes en México

Como se puede observar, el problema de la diabetes es un problema creciente y los costos para la sociedad son altos y van en aumento, de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), en México, en el año 2013, se diagnosticaron 8.7 millones de personas con diabetes, siendo el 90% de los casos del tipo 2 de esta enfermedad, además, de las personas que padecen diabetes tipo 2, el 50% ya ha sido diagnosticada con hipertensión arterial.¹¹

3. Justificación y Objetivo del Trabajo

3.1. Justificación

Debido a la alta incidencia de diabetes en México y a que su complicación más común es la hipertensión, es muy probable la prescripción de glibenclamida y el losartán, para el control de glucosa en sangre y de la hipertensión, sin embargo, no existe hasta la fecha reporte de la interacción entre estos dos fármacos, por lo tanto, el presente proyecto tiene el objetivo de estudiar la posible interacción farmacocinética entre estos dos fármacos.

3.2. Hipótesis

Si el losartán interacciona con la farmacocinética de la glibenclamida o viceversa, entonces se observaría una alteración en las concentraciones plasmáticas de la glibenclamida o el losartán en relación a los respectivos controles.

3.3. Objetivo general

Estudiar la interacción farmacocinética entre glibenclamida y losartán en ratas.

3.4. Objetivos particulares

- a) Desarrollar la metodología por HPLC para la cuantificación simultánea de glibenclamida y losartán en muestras de plasma de rata.
- b) Validar el método analítico para la determinación de glibenclamida y losartán en plasma de rata.
- c) Administrar por vía oral glibenclamida sola, losartán solo y la combinación a grupos de 6 ratas.
- d) Analizar las muestras de plasma para medir glibenclamida y losartán.
- e) Construir los modelos farmacocinéticos para los fármacos y la interacción.
- f) Realizar el análisis estadístico con los valores obtenidos.

4. Materiales y Métodos

4.1. Estándares

Los estándares de losartán (pureza 0.995 mg/mg) se compraron en los laboratorios de la FEUM, glibenclamida, Valsartán (estándar Interno) y el metil-etil-éter se compraron de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, Mo., USA), El Acetonitrilo utilizado en el proyecto fue grado HPLC.

4.2. Método Bioanalítico

Los métodos analíticos empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas son la clave en la generación de datos confiables y reproducibles que se utilizan en la evaluación e interpretación de hallazgos en biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética, por lo cual es esencial emplear métodos analíticos bien caracterizados y completamente validados, para la obtención de resultados confiables que pueden ser interpretados satisfactoriamente.¹²

Para la recuperación de los fármacos de la matriz biológica (plasma) se estableció un procedimiento en base a las características fisicoquímicas de los fármacos previamente mencionadas, obteniendo un método de recuperación simultánea de glibenclamida y losartán.

Con respecto a las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de glibenclamida y losartán se tomaron como base los métodos reportados por Zarghi A, et al.,¹³ y Emilsson et al.,¹⁴, que fueron modificados para obtener las condiciones óptimas en el laboratorio.

Este método se sometió a una validación, para tener la certeza que los datos obtenidos por este medio son confiables y pueden ser utilizados para experimentos de farmacocinética.

4.2.1. Validación del método Bioanalítico

La validación de método bioanalítico incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método analítico para la determinación cuantitativa de la concentración del analito(s) en una matriz biológica es confiable para la intención prevista.¹⁵

Para la validación de los métodos bioanalíticos se señala que se deben de cumplir con los siguientes puntos:¹⁶

4.2.1.1. Selectividad

En una medición analítica, donde la concentración (x) es determinada como función de la respuesta (y), se desea que la matriz biológica no tenga influencia en la respuesta (Figura 6). La prueba más simple es demostrar la falta de respuesta en un blanco de matriz biológica.¹⁶

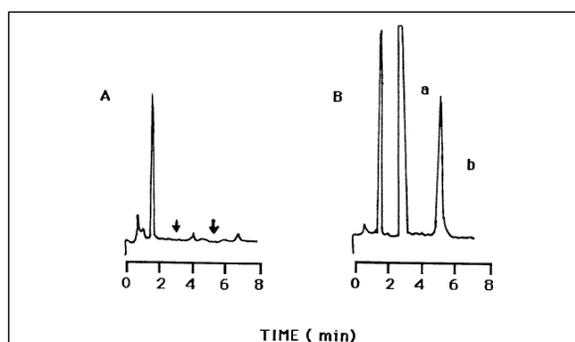


Figura 6 Cromatogramas para determinar selectividad

De acuerdo a la NOM-177, para determinar la selectividad se preparó una mezcla de plasma de 6 ratas y por triplicado se realizó el proceso de extracción, Los cromatogramas blanco se compararon con los cromatogramas obtenidos del plasma. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el Estándar Interno.

4.2.1.2. Límite Inferior de cuantificación

El límite asociado con la cuantificación confiable de los analitos es el Límite inferior de cuantificación (LIC), y es definido como la concentración mínima en donde la cuantificación de los analitos cae dentro de ciertos niveles de certeza.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, el LIC se debe determinar con base en el 5% del $C_{\text{máx}}$ reportado para el analito de interés, sin embargo, al requerir una menor concentración que el 5% de la C_{max} reportada, en el laboratorio se tomó como LIC el valor mínimo de concentración en el que su % de desviación al valor nominal es menor al 20%.¹⁷

4.2.1.3. Curva de Calibración

La linealidad es un parámetro muy importante, ya que con la linealidad se tiene la certeza que la respuesta obtenida es directamente proporcional a la concentración del analito, en el intervalo de concentración a trabajar. La curva de calibración debe ser construida usando al menos de 5 a 7 valores de concentración que abarquen el intervalo de concentración esperada.

Para la determinación de la linealidad, se construyó por triplicado la curva de calibración con las siguientes concentraciones: Losartán: 5, 10, 20, 40 80, 160, 320, 640, 1280 ng/ml, Glibenclamida: 5,10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 ng/ml. teniendo al valsartán como estándar interno a una concentración constante de 1 $\mu\text{g/ml}$, además, se procesaron muestras blanco (plasma sin estándar interno), y muestra cero (plasma blanco adicionado con EI).

Para la preparación de la curva de calibración se pesó por separado 1 mg de cada uno de los estándares (Losartán, Glibenclamida, Valsartán), de los cuales el losartán se disolvió en 10 ml de agua purificada (Concentración= 100 $\mu\text{g/ml}$) de los cuales se preparó una solución stock de 10 $\mu\text{g/ml}$, se tomaron alícuotas de 240 μl de las soluciones stock de losartán y glibenclamida, las cuales fueron vertidas y mezcladas en un frasco de 5 ml limpio y seco, se les agregó 1320 μl de Acetonitrilo/Agua (1:1), para tener un volumen de 1800 μl , del cual se fueron realizando diluciones 1:2, 10 veces, para finalizar agregando 100 μl de la solución de valsartán (Concentración 10 $\mu\text{g/ml}$) a los 10 tubos. Estas concentraciones fueron agregadas al plasma blanco, para la posterior recuperación y determinación de la concentración de los analitos.

La NOM-177-SSA1-2013 establece como criterio de aceptación que los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual al 20%

4.2.1.4. Precisión y Exactitud

La precisión y exactitud juntas determinan el error de la medición analítica y es el primer criterio cuando se juzga la calidad de un método analítico. La exactitud es generalmente reconocida como la diferencia entre la media de un conjunto de resultados y el “valor verdadero”, mientras que la precisión se refiere a la variabilidad de las mediciones dentro de un conjunto. La precisión se determina con la repetibilidad y la reproducibilidad; siendo que la repetibilidad se refiere a la cercanía de las mediciones entre muestras sucesivas de la misma muestra, y la reproducibilidad se describe como la cercanía entre los resultados obtenidos con el mismo método bajo diferentes condiciones.

En el laboratorio, la repetibilidad se analizó en un mismo día por quintuplicado en las siguientes muestras control: Límite inferior de cuantificación (LIC) losartán 10 ng/ml, Glibenclamida 20 ng/ml, Muestra control baja (MCB) losartán 30 ng/ml, Glibenclamida 60 ng/ml), Muestra control media (MCM) losartán 200 ng/ml, Glibenclamida 200 ng/ml, Muestra control alta losartán 900 ng/ml, Glibenclamida 900 ng/ml. se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración, posteriormente se calculó el coeficiente de variación (Ecuación 1). En la reproducibilidad se utilizaron las mismas concentraciones que para la prueba de repetibilidad, pero en distintas condiciones. Para dar como aceptada la prueba tanto para la repetibilidad y la reproducibilidad, el CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual al 20%:

$$\% \text{ Coeficiente de Variación} = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

Siendo: σ la desviación estándar de los datos, \bar{x} la media de los datos

Ecuación 1 Fórmula de coeficiente de variación

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de desviación. Con los datos obtenidos durante la evaluación de la precisión, se calculó la exactitud comparando la concentración obtenida con respecto a la concentración nominal mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ desviación} = \frac{\hat{x} - x}{\hat{x}} * 100$$

Siendo: \hat{x} el valor nominal y x el valor obtenido

Ecuación 2 Fórmula para determinar el % de desviación

4.2.1.5. Estabilidad

En situaciones donde las muestras son almacenadas, se debe asegurar las condiciones y el periodo en donde las concentraciones de los fármacos no son afectadas.

En el laboratorio, se realizó un estudio de estabilidad almacenando muestras control por triplicado MCB y MCA durante 2 semanas a una temperatura de -20°C. Posterior a este periodo, se determinó la concentración y se calculó la concentración promedio de cada nivel y como criterio de aceptación cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.¹⁷

4.3. Animales y Administración

Para el análisis farmacocinético se utilizaron ratas Wistar macho de peso entre 250 y 300 g., que fueron distribuidas en tres grupos como se muestra a continuación:

Tabla 1 Distribución de los animales

Número de animales	Fármacos a administrar
6	Glibenclamida dosis (10 mg/kg) ¹⁸
6	Losartán dosis (10 mg/kg) ¹⁹
6	Glibenclamida (10 mg/kg) + Losartán (10 mg/kg)

Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas, los animales tenían libre acceso al agua y al alimento pero 12 horas antes del inicio del experimento se les restringió el alimento. Cada rata fue utilizada una sola vez, al término del experimento las ratas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical. El estudio fue aprobado por el comité de ética para el uso de animales Protocolo: 060-13, (Cinvestav-IPN, México, D.F.). Los animales fueron anestesiados con Isoflurano, mediante un equipo proporcionado por el Bioterio de Cinvestav-IPN (Figura 7), posteriormente, se les colocó un catéter (24G X0.75", 0.7 X 19 mm, 25 mL/min) de manera quirúrgica en la arteria caudal para la recolección de la muestra sanguínea.



Figura 7 Equipo para anestesiación animales.

Para la administración de los fármacos se prepararon soluciones de glibenclamida, sola, losartán solo y la combinación. Se pesaron 10 mg de los fármacos y fueron colocados en 10 ml de una solución de carboximetil celulosa al 0.5%. Una vez que los animales se recuperaron de la anestesia, se pesaron y se les administró la cantidad de solución de acuerdo a su peso por vía intragástrica, de acuerdo al grupo al que pertenecía.

4.4. Estudio Farmacocinético

Las muestras sanguíneas se obtuvieron a los tiempos 0 (Muestra control), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 12 horas posteriores a la administración, se obtuvieron

aproximadamente 200 μl de sangre que se colocaron en tubos eppendorf heparinizados de 1.5 ml., los tubos fueron centrifugados a 2500 r.p.m. durante 5 min, para la obtención de plasma, obteniéndose 100 μl de plasma que se colocaron en un congelador a una temperatura de -20°C , hasta su análisis.

4.4.1. Procesamiento de muestras

A los 100 μl obtenidos de plasma se les adicionó 100 μl del estándar interno (valsartán 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 100 μl de una solución de HCl 0.01 M., las muestras se agitaron vigorosamente durante 1 minuto, posteriormente se les adicionó 0.8 ml de metil terbutil éter y el tubo se colocó en un vortex durante 1 minuto, consecuentemente, se centrifugaron durante 5 min a 3000 r.p.m., obteniéndose la fase orgánica que se recolectó en tubos de vidrio perfectamente limpios y secos, realizándose este proceso por triplicado. La fase orgánica se evaporó mediante un flujo constante de nitrógeno. La muestra se reconstituyó con 100 μl de fase móvil inyectándose 50 μl al cromatógrafo. (Figura 8)

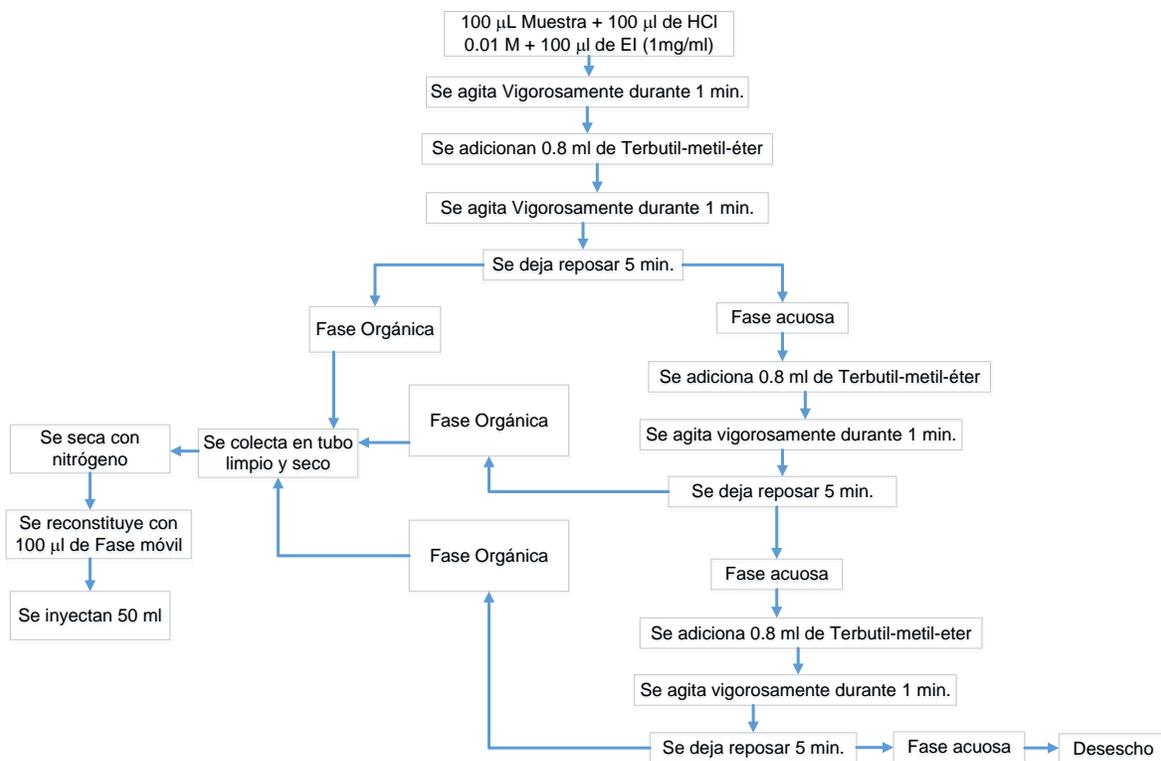


Figura 8 Diagrama de flujo para la recuperación de fármacos

4.4.2. Condiciones cromatográficas

Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo Agilent 1120 Compact LC, No Serie:G4286A con software Agilent EZ Chrom Elite Compact, versión 3.3.0B, se utilizó una columna C18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 μm , el cromatógrafo tiene acoplado a un detector UV/Vis, la longitud de onda para la detección de los fármacos fue de 225 nm. La fase móvil utilizada fue Acetonitrilo/Buffer de fosfatos 0.01 M pH 3.0/ Nonilamina (46:54:0.015) a un flujo de 1.5 ml/min. Los tiempos de retención mostrados por los fármacos fueron los siguientes: losartán 5.5 ± 0.3 min, valsartán 7.9 ± 0.2 min, glibenclamida 21.1 ± 0.5 min.

4.5. Farmacocinética y Análisis Estadístico

Con los datos de las concentraciones obtenidas se construyeron las curvas farmacocinéticas, y posteriormente los parámetros farmacocinéticos para losartán y glibenclamida, la constante de eliminación (K_e) fue calculada por regresión lineal del logaritmo natural de la concentración con respecto al tiempo de los últimos puntos de la curva, tomando la pendiente de la recta, reportando el valor absoluto de la pendiente. El cálculo del área bajo la curva de 0 a infinito ($ABC_{0-\infty}$) se llevó a cabo mediante dos pasos ($ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + ABC_{t-\infty}$), el ABC_{0-t} se calculó mediante el método de trapezoides, y el $ABC_{t-\infty}$ se calculó mediante la siguiente fórmula $ABC_{t-\infty} = C_p / K_e$, siendo C_p la última concentración del fármaco medida. La depuración se calculó $Dosis / ABC$, reportándose la Depuración/Biodisponibilidad. Tanto el tiempo de concentración máxima (T_{max}), como la concentración máxima (C_{max}) se determinaron directamente de la curva concentración-tiempo.

Posteriormente, se realizó una prueba de "t" de student tomando como diferencia significativa un valor $p < 0.05$.

5. Resultados y Discusión

5.1. Validación del método analítico

Los resultados obtenidos durante la validación se muestran a continuación:

5.1.1. Selectividad

Las siguientes figuras muestran que no existen interferencias cercanas capaces de ser confundidas con las respuestas de los analitos, por lo tanto, se puede decir que existe selectividad para el losartán, el valsartán (EI), la glibenclamida en el método desarrollado.

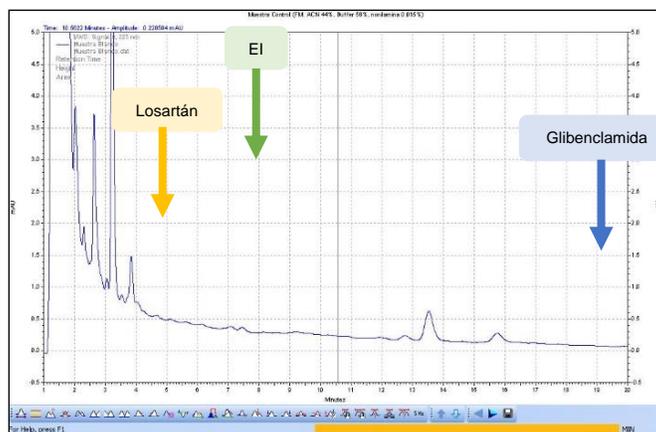


Figura 9 Cromatograma muestra blanco

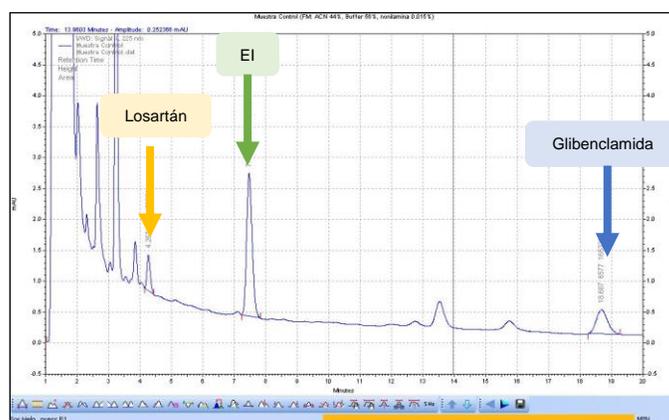


Figura 10 Cromatograma de LIC (Losartán 10 ng/ml, Valsartán 1 µg/ml, Glibenclamida 20 ng/ml)

De acuerdo a lo que se observa en la Figura 9 y Figura 10 se puede decir que no hay interferencias que se translapen con las señales de interés, además, se cumple la condición de que las interferencias cercanas sean menores del 20%

para los analitos y menor al 5 % para el Estándar Interno, cumpliéndose con esto la condición de especificidad. Si bien para el límite inferior de cuantificación la norma establece que debe ser del 5% de la concentración esperada, de acuerdo con Takashi Yoshitani¹⁹, se ha reportado una concentración máxima de $1.1 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ para losartán, utilizando una dosis de 10 mg/kg, de acuerdo a esto, el límite inferior de Cuantificación (LIC) se debe encontrar alrededor de 55 ng/ml, para la glibenclamida se han reportado concentraciones alrededor de 300 ng/ml²⁰, dando un LIC de 15 ng/ml. Sin embargo, en el laboratorio se realizaron diversas pruebas para verificar que el límite inferior de cuantificación, cumpla con el criterio que especificado en la linealidad, que se encuentre dentro del 20% del porcentaje de recuperación y porcentaje de desviación, dando como resultado un LIC de 10 ng/ml para losartán, y de 20 ng/ml para glibenclamida.

5.1.2. Curva de calibración

Para determinar la linealidad del método se prepararon muestras de plasma por triplicado a los que se les adicionó una concentración conocida de losartán y glibenclamida, los resultados obtenidos mediante el análisis cromatográfico se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2 Resultados de las curvas de calibración de losartán en plasma.

Curvas Tipo de losartán en plasma						
	Curva Tipo 1		Curva Tipo 2		Curva Tipo 3	
Concentración adicionada de Losartán	Concentración recuperada de losartán	Relación de Áreas (Losartán/EI)	Concentración recuperada de losartán	Relación de Áreas (Losartán/EI)	Concentración recuperada de losartán	Relación de Áreas (Losartán/EI)
10	11.67	0.022	9.54	0.018	10.23	0.017
20	22.53	0.035	22.16	0.032	17.40	0.025
40	46.02	0.061	44.82	0.057	35.05	0.044
80	89.64	0.111	70.83	0.086	69.95	0.083
160	181.41	0.215	181.14	0.207	145.38	0.167
320	276.35	0.323	275.59	0.311	349.68	0.393
640	707.33	0.812	704.35	0.783	727.21	0.812
1,280	1443.65	1.648	1166.82	1.292	1412.33	1.572

Tabla 3 Resultados de las curvas de calibración de glibenclamida en plasma.

Curvas Tipo de Glibenclamida en plasma						
	Curva Tipo 1		Curva Tipo 2		Curva Tipo 3	
Concentración adicionada de Glibenclamida	Concentración recuperada de Glibenclamida	Relación de Áreas (Gliben/EI)	Concentración recuperada de Glibenclamida	Relación de Áreas (Gliben/EI)	Concentración recuperada de Glibenclamida	Relación de Áreas (Gliben/EI)
20	18.36	0.018	22.81	0.023	23.25	0.027
40	43.00	0.037	35.33	0.036	45.94	0.051
80	88.64	0.073	69.19	0.069	69.96	0.076
160	150.48	0.122	175.71	0.173	146.56	0.156
320	348.94	0.278	285.09	0.281	355.10	0.373
640	564.74	0.448	715.77	0.703	702.36	0.735
1,280	1100.31	0.870	1433.05	1.406	1379.86	1.441

Las curvas tipo anteriores, dan lugar a gráficas como la que se muestra a continuación (Figura 10):

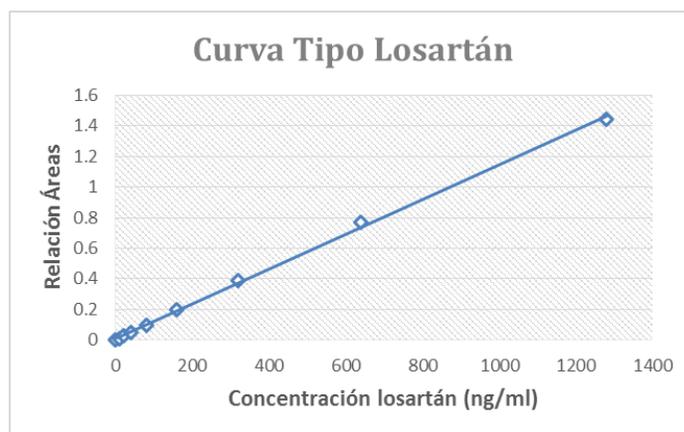


Figura 11 Curva tipo losartán

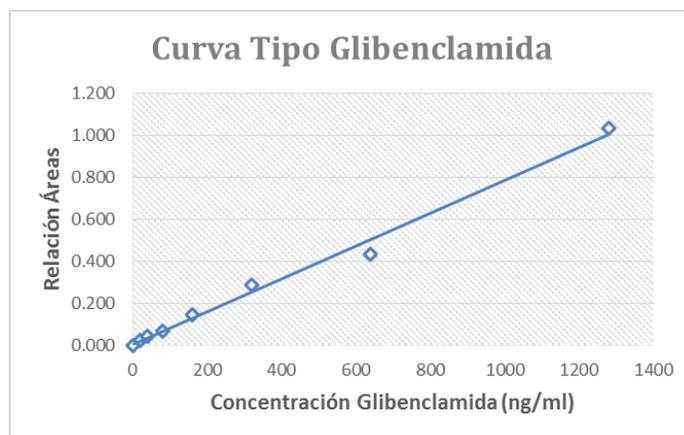


Figura 12 Curva tipo glibenclamida

Dando las ecuaciones de la recta y r^2 :

Losartán: $Y = (0.00112 \pm 0.00061)x + (0.0063 \pm 0.0015)$ y $r^2 = 0.9997$

Glibenclamida $Y = (0.00094 \pm 0.00013)x + (0.00205 \pm 0.00103)$ $r^2 = 0.9998$

Estas curvas de calibración obtenidas son aceptadas debido a que el valor obtenido de r^2 para ambos fármacos es muy cercano a 1, lo que muestra que hay una alta relación entre la concentración del fármaco y la respuesta obtenida, dando confiabilidad en el método usado.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, para que se cumpla la condición de linealidad se debe reportar el % de desviación y el % de recuperación, los cuales se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 4 Resultados obtenidos en la linealidad del método.

Losartán					
	% recuperación			% desviación	
Valor Nominal	media	desviación estandar	% recuperación	media	desviación estandar
10	10.48	1.09	4.77	7.86	7.75
20	20.69	2.86	3.47	12.15	1.19
40	41.96	6.02	4.91	13.16	1.64
80	76.80	11.12	4.00	12.03	0.55
160	169.31	20.72	5.82	11.91	2.40
320	300.54	42.56	6.08	12.27	2.59
640	712.96	12.43	11.40	11.40	1.94
1,280	1,340.93	151.60	4.76	10.66	1.99
glibenclamida					
	% recuperación			% desviación	
Valor Nominal	media	desviación estandar	% recuperación	media	desviación estandar
20	21.47	2.71	5.14	12.84	4.15
40	42.42	5.48	5.29	11.34	3.69
80	75.93	11.01	4.19	12.29	1.37
160	157.58	15.82	1.04	8.06	1.96
320	329.71	38.76	3.30	10.31	1.10
640	660.96	83.60	3.43	11.11	1.19
1280	1304.41	178.74	2.01	11.27	3.18

Siendo el criterio de aceptación que tanto el % de desviación, como el % de recuperación se encuentre dentro del 15%, a excepción del LIC que puede llegar a ser del 20%, se demuestra que bajo las condiciones en las que se realizó la curva de calibración se cumple este criterio, dando como aceptado el resultado de prueba, dando resultados confiables a las concentraciones establecidas.

5.1.3. Repetibilidad y Reproducibilidad

La siguiente tabla contiene los datos obtenidos en la determinación de la repetibilidad.

Tabla 5 Resultados obtenidos en la repetibilidad de losartán y glibenclamida.

Repetibilidad Muestras 1					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	concentración Losartán	concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	6982	3722	362614	11.60	22.42
MCB(20 y 60 ng/ml)	22722	18647	631594	26.58	67.78
MCM(200 ng/ml)	132668	40789	508524	228.11	187.14
MCA(900 ng/ml)	497059	225839	568690	777.51	933.42
Repetibilidad Muestras 2					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	concentración Losartán	concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	8968	4812	458741	11.86	22.95
MCB(20 y 60 ng/ml)	27451	18327	625479	33.67	67.25
MCM(200 ng/ml)	124879	50562	552147	197.00	213.89
MCA(900 ng/ml)	557841	225523	532147	933.64	996.24
Repetibilidad Muestras 3					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	concentración Losartán	concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	7696	3763	468741	9.06	17.16
MCB(20 y 60 ng/ml)	26896	17457	596345	34.76	67.19
MCM(200 ng/ml)	134787	41965	529874	222.27	184.75
MCA(900 ng/ml)	528213	205841	487859	964.49	991.83
Repetibilidad Muestras 4					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	concentración Losartán	concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	7563	4887	479657	8.47	22.24
MCB(20 y 60 ng/ml)	23896	12547	587412	30.80	48.55
MCM(200 ng/ml)	124865	44211	498765	218.66	206.99
MCA(900 ng/ml)	536347	196471	501211	953.19	921.34
Repetibilidad Muestras 5					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	concentración Losartán	concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	9256	3959	498574	10.98	16.95
MCB(20 y 60 ng/ml)	20143	13254	445236	34.88	68.35
MCM(200 ng/ml)	125698	43623	569932	191.96	178.49
MCA(900 ng/ml)	544794	175564	512007	947.75	805.72

Repetibilidad losartan				Repetibilidad glibenclamida			
	media	desviación	%CV		media	desviación	%CV
LIC(10 ng/ml)	10.39	1.53	14.77	LIC(20 ng/ml)	20.35	3.02	14.83
MCB(20 ng/ml)	32.14	3.52	10.94	MCB(60 ng/ml)	63.82	8.55	13.40
MCM(200 ng/ml)	211.60	16.09	7.60	MCM(200 ng/ml)	194.25	15.31	7.88
MCA(900 ng/ml)	915.31	77.83	8.50	MCA(900 ng/ml)	929.71	77.04	8.29

La siguiente tabla corresponde a los datos correspondientes a la reproducibilidad.

Tabla 6 Resultados obtenidos en la reproducibilidad de losartán y glibenclamida.

Reproducibilidad Muestras 1					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	7142	3789	364274	11.91	22.75
MCB(20 y 60 ng/ml)	21796	15893	596451	27.09	61.00
MCM(200 ng/ml)	140987	49547	514874	239.70	224.86
MCA(900 ng/ml)	506312	231030	526398	856.18	1031.77
Reproducibilidad Muestras 2					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	7596	4765	469878	8.83	22.13
MCB(20 y 60 ng/ml)	26547	18721	635458	31.78	67.63
MCM(200 ng/ml)	119521	41210	563214	184.49	170.55
MCA(900 ng/ml)	516321	248796	598652	767.14	976.92
Reproducibilidad Muestras 3					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	7546	5163	489654	8.15	23.08
MCB(20 y 60 ng/ml)	23164	12548	532487	33.32	53.74
MCM(200 ng/ml)	114872	47874	506398	197.60	220.88
MCA(900 ng/ml)	569874	176547	514896	986.05	805.68
Reproducibilidad Muestras 4					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	7962	4312	514563	8.21	17.99
MCB(20 y 60 ng/ml)	22698	15147	514878	33.85	67.53
MCM(200 ng/ml)	119520	46621	489648	213.06	222.47
MCA(900 ng/ml)	454852	206980	503285	804.14	966.71
Reproducibilidad Muestras 5					
	Área Losartán	Área glibenclamida	ÁreaEI	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	9635	5531	506932	11.38	23.94
MCB(20 y 60 ng/ml)	16561	13569	469574	25.95	66.30
MCM(200 ng/ml)	125365	39840	534178	204.63	173.88
MCA(900 ng/ml)	596147	195687	542230	979.47	848.10

Reproducibilidad losartán				Reproducibilidad glibenclamida			
	media	desviación	%CV		media	desviación	%CV
LIC(10 ng/ml)	9.70	1.81	18.64	LIC(20 ng/ml)	21.98	2.33	10.58
MCB(20 ng/ml)	30.40	3.64	11.99	MCB(60 ng/ml)	63.24	5.96	9.43
MCM(200 ng/ml)	207.90	20.63	9.92	MCM(200 ng/ml)	202.53	27.73	13.69
MCA(900 ng/ml)	878.60	100.23	11.41	MCA(900 ng/ml)	925.84	94.84	10.24

5.1.4. Exactitud

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la exactitud de losartán y glibenclamida.

Tabla 7 Resultados de Exactitud de glibenclamida y losartán.

Repetibilidad Muestras 1			Reproducibilidad Muestras 1		
	% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida		% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	15.99	12.11	LIC(10 y 20 ng/ml)	19.14	13.73
MCB(20 y 60 ng/ml)	11.40	12.96	MCB(20 y 60 ng/ml)	9.70	1.66
MCM(200 ng/ml)	14.05	6.43	MCM(200 ng/ml)	19.85	12.43
MCA(900 ng/ml)	13.61	3.71	MCA(900 ng/ml)	4.87	14.64
Repetibilidad Muestras 2			Reproducibilidad Muestras 2		
	% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida		% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	18.63	14.76	LIC(10 y 20 ng/ml)	11.69	10.66
MCB(20 y 60 ng/ml)	12.24	12.08	MCB(20 y 60 ng/ml)	5.93	12.71
MCM(200 ng/ml)	1.50	6.95	MCM(200 ng/ml)	7.75	14.72
MCA(900 ng/ml)	3.74	10.69	MCA(900 ng/ml)	14.76	8.55
Repetibilidad Muestras 3			Reproducibilidad Muestras 3		
	% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida		% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	9.42	14.22	LIC(10 y 20 ng/ml)	18.45	15.41
MCB(20 y 60 ng/ml)	15.86	11.98	MCB(20 y 60 ng/ml)	11.08	10.43
MCM(200 ng/ml)	11.14	7.62	MCM(200 ng/ml)	1.20	10.44
MCA(900 ng/ml)	7.17	10.20	MCA(900 ng/ml)	9.56	10.48
Repetibilidad Muestras 4			Reproducibilidad Muestras 4		
	% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida		% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	15.26	11.22	LIC(10 y 20 ng/ml)	17.89	10.07
MCB(20 y 60 ng/ml)	2.66	19.08	MCB(20 y 60 ng/ml)	12.82	12.55
MCM(200 ng/ml)	9.33	3.49	MCM(200 ng/ml)	6.53	11.23
MCA(900 ng/ml)	5.91	2.37	MCA(900 ng/ml)	10.65	7.41
Repetibilidad Muestras 5			Reproducibilidad Muestras 5		
	% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida		% desviación Losartán	% desviación Glibenclamida
LIC(10 y 20 ng/ml)	9.81	15.25	LIC(10 y 20 ng/ml)	13.77	19.72
MCB(20 y 60 ng/ml)	16.28	13.92	MCB(20 y 60 ng/ml)	13.51	10.50
MCM(200 ng/ml)	4.02	10.75	MCM(200 ng/ml)	2.32	13.06
MCA(900 ng/ml)	5.31	10.48	MCA(900 ng/ml)	8.83	5.77

Repetibilidad				Reproducibilidad			
Exactitud Losartán		Exactitud Glibenclamida		Exactitud Losartán		Exactitud Glibenclamida	
LIC(10 y 20 ng/ml)	13.82	LIC(10 y 20 ng/ml)	13.51	LIC(10 y 20 ng/ml)	15.45	LIC(10 y 20 ng/ml)	13.92
cc	11.69	MCB(20 y 60 ng/ml)	14.00	MCB(20 y 60 ng/ml)	10.84	MCB(20 y 60 ng/ml)	11.55
MCM(200 ng/ml)	8.01	MCM(200 ng/ml)	7.05	MCM(200 ng/ml)	4.45	MCM(200 ng/ml)	12.36
MCA(900 ng/ml)	7.15	MCA(900 ng/ml)	7.49	MCA(900 ng/ml)	10.95	MCA(900 ng/ml)	8.05

5.1.5. Estabilidad

Finalmente se muestran los resultados obtenidos para la estabilidad.

Tabla 8 Resultados de estabilidad de glibenclamida y losartán.

Estabilidad: 2 semanas a -20°C				
Muestras 1				
	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida	Exactitud Losartán	Exactitud Glibenclamida
MCB(20 y 60 ng/ml)	26.59	57.01	11.38	4.99
MCA(900 ng/ml)	857.91	972.65	4.68	8.07
Muestras 2				
	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida	Exactitud Losartán	Exactitud Glibenclamida
MCB(20 y 60 ng/ml)	33.96	55.49	13.20	7.51
MCA(900 ng/ml)	799.21	953.00	11.20	5.89
Muestras 3				
	Concentración Losartán	Concentración glibenclamida	Exactitud Losartán	Exactitud Glibenclamida
MCB(20 y 60 ng/ml)	34.91	66.29	16.38	10.49
MCA(900 ng/ml)	850.52	944.34	5.50	4.93

De acuerdo con los resultados, para la determinación de la precisión (repetibilidad y reproducibilidad), se observa que el coeficiente de variación entre los datos, es menor al 15%, cumpliendo con esto el criterio de aceptación establecido por la NOM-177-SSA1-2013, se puede decir que bajo las condiciones establecidas es posible reproducir los datos con el método establecido.

Con respecto a la exactitud, el % de desviación obtenido en las muestras fue menor al 15% que se establece como criterio de aceptación, teniendo como resultado que las concentraciones obtenidas se desvían una distancia aceptable con respecto al valor nominal.

Finalmente, la estabilidad a 2 semanas a una temperatura de -20°C , fue aceptable ya que el % de desviación encontrado se encuentra dentro del 15%, mostrando que la muestra se puede almacenar bajo estas condiciones el tiempo establecido, sin alterar la concentración del losartán y glibenclamida.

5.2. Farmacocinética

Los siguientes datos corresponden a los encontrados en el análisis de las muestras de plasma, en las siguientes gráficas se muestra la media±desviación estándar, y se toma como una diferencia significativa un valor de $p \leq 0.05$.

5.2.1. Curvas Farmacocinéticas

En la Figura 13 se observan los cambios que sufren las concentraciones de losartán al administrarse en conjunto con la glibenclamida, claramente se observa que al ser administrado losartán en conjunto con la glibenclamida (línea roja), se aumenta la concentración plásmatica, con respecto a su control (línea verde), los datos obtenidos de la concentración máxima de losartán solo es de 1272.30 ± 586.5 ng/ml coincidiendo con lo reportado por Takashi Yoshitani et al¹⁹(tabla 12), con respecto a los datos obtenidos del losartán combinado, la C_{max} alcanzada es de 3508.23 ± 1091.52 ng/ml, aumentando significativamente(valor $p = 0.015$).

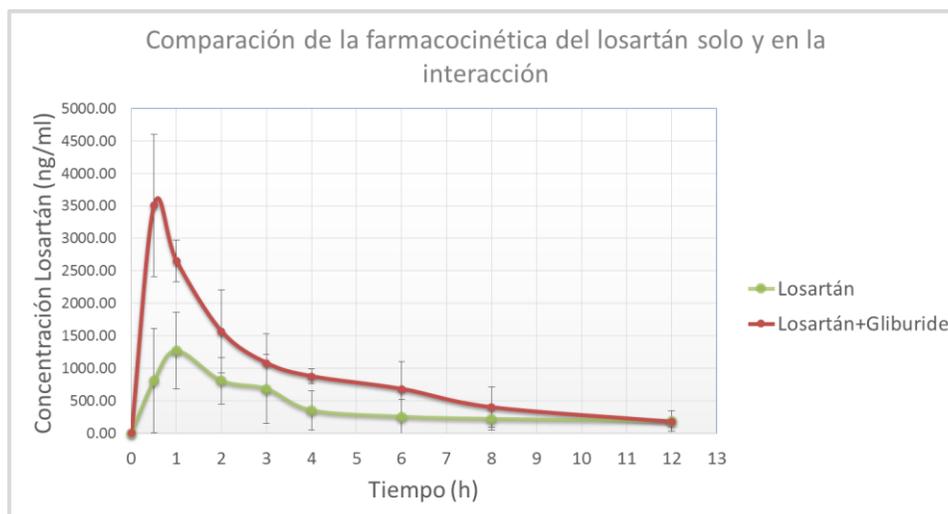


Figura 13 Curva farmacocinética losartán.

El losartán al ser un fármaco muy soluble se absorbe rápidamente y eso se observa en ambos casos, sin embargo, al ser administrado en conjunto con la glibenclamida aumenta rápidamente la concentración plasmática llegando a la concentración máxima (C_{max}) en 30 min con respecto a su control (1 hora), esto puede deberse a que se está alterando el proceso de absorción y la biodisponibilidad, como se mencionó en la introducción, uno de los componentes

más importantes en la absorción es la glicoproteína-P, interacciones en esta proteína acarreadora, pueden llevar a cabo alteraciones en las concentraciones plasmáticas de los fármacos. Golstein et al.²¹ reportó en el año 1999 que la glibenclamida es capaz de inhibir a la glicoproteína-P, además se ha reportado que tanto el losartán como la glibenclamida son sustratos de este acarreador²², por lo tanto, es muy probable que exista interacción entre el losartán y la glibenclamida a nivel de la absorción, explicando con esto el aumento del losartán al administrarse con la glibenclamida, ya el acarreador al estar inhibido por la acción de la glibenclamida, no será capaz de llevar al losartán hacia afuera de la célula, llevando a un aumento en la concentración de losartán en sangre.

Con respecto a las concentraciones obtenidas de glibenclamida (Figura 14 Curva farmacocinética de glibenclamida estas también se ven alteradas al administrarse con el losartán, observando un aumento de las concentraciones plasmáticas, la concentración de la glibenclamida cuando es administrada sola (línea azul) alcanza una concentración máxima a las 3 horas, con un valor de 554.9 ± 92.03 ng/ml, estos resultados se encuentran un poco elevados de acuerdo a los reportados por Ning Li et al¹⁸, la concentración de glibenclamida al estar combinada con losartán (línea roja) tiende a aumentar aunque no significativamente, encontrando una concentración máxima de 947.72 ± 443.75 ng/ml (valor $p=0.08$).

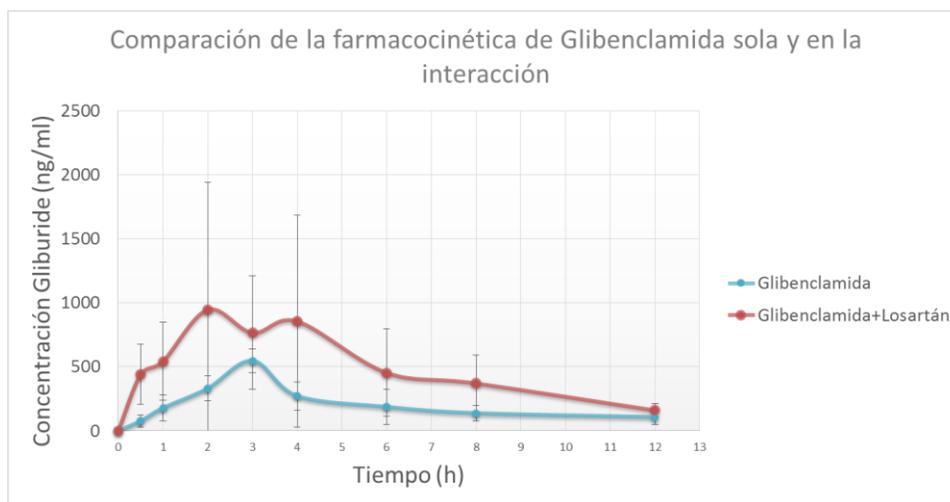


Figura 14 Curva farmacocinética de glibenclamida

Estos resultados indican que la glibenclamida es capaz de alterar la concentración plasmática del losartán de manera significativa, sin embargo, el losartán no altera de manera significativa la concentración plasmática de la glibenclamida.

A continuación en la tabla 9 se muestran los datos de distintos autores que han trabajado con losartán y glibenclamida, para poder comparar algunos de los datos farmacocinéticos en el presente estudio.

Tabla 9 Datos reportados para losartán y glibenclamida en ratas.

Datos reportados Losartán (control)		
Autor	Yang Si-hyung ²³	Yoshitani Takashi ¹⁹
ratas usadas	Sprague-Dawley macho	Wistar Macho
Dosis (mg/kg)	9	10
Cmax(ng/ml)	15.6±2.2	1110±380
Tmax(h)	1±0.55	1.9±0.9
AUC inf (ng.h/ml)	143.1±33.2	14930±4820
Datos reportados Glibenclamida (control)		
Autor	Ning Li ¹⁸	Neerati Prasad. ²⁴
ratas usadas	Wistar Macho	Wistar Macho
Dosis (mg/kg)	10	10
Cmax (ng/ml)	214.0±49.1	12780.0±3390
Tmax(h)	3.0±0.63	4.0±0
AUC 0-t (ng.h/ml)	1568±470	65840±9640

5.2.2. Parametros farmacocinéticos

Con los datos de las concentraciones obtenidas se calcularon las áreas bajo la curva de 0 a 12 h y de 0 a infinito tanto del losartán como de la glibenclamida. Con respecto al losartán se observa en las siguientes gráficas (Figura 15 y Figura 16) que el área bajo la curva tanto de 0 a 12 h como de 0 a infinito aumentaron significativamente, este resultado concuerda con los resultados presentados en la gráfica de concentración plasmática-tiempo; el área bajo la curva de 0 a 12 h de losartán al administrarse solo fue de 4094.01 ± 2479 ng*h/ml y de 0 a infinito fue de 4587.61 ± 2387.32 ng*h/ml. Los resultados del área bajo la curva al estar combinado dio los siguientes resultados: el área bajo la curva de 0 a 12 h. fue de 10152.09 ± 2494.30 ng*h/ml y el área bajo la curva de 0 a infinito fue de 11976.62 ± 2370.98 ng*h/ml dando un valor $p=0.0054$ y 0.0013 , respectivamente.

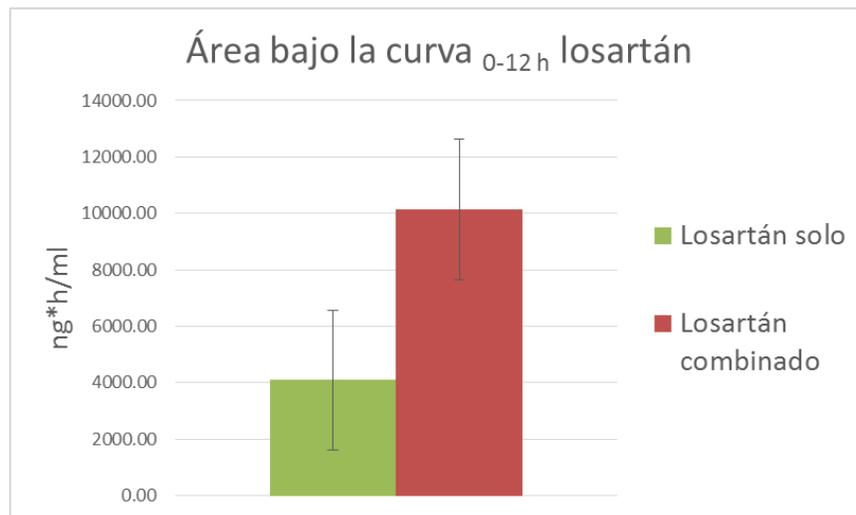


Figura 15 Comparación de las áreas bajo la curva 0-12 h de de losartán solo y combinado con glibenclamida, valor $p= 0.0054$.

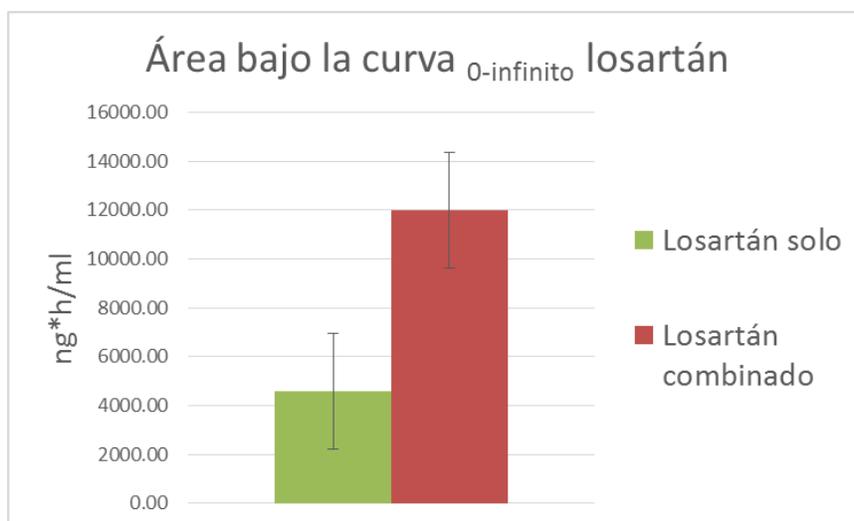


Figura 16 Comparación de las áreas bajo la curva 0-inf de losartán solo y combinado con glibenclamida, valor $p=0.0013$.

El aumento del área bajo la curva puede deberse al aumento tan marcado que hubo durante la absorción del fármaco, ya que se toma en cuenta que el área bajo la curva y la biodisponibilidad (F) son directamente proporcionales, siendo que el total de fármaco absorbido debe ser igual al fármaco eliminado, lo que da lugar a la siguiente ecuación:

$$F * Dosis = Depuración * \text{Área bajo la curva}$$

Siendo $F * Dosis$ la cantidad de fármaco absorbida y la $Depuración * \text{área bajo la curva}$ la cantidad de fármaco excretada.

La dosis al mantenerse constante durante el experimento (10 mg/kg), y las áreas bajo la curva de losartán aumentan al administrarse de manera conjunta con glibenclamida, indican que para mantenerse la igualdad, la biodisponibilidad del losartán aumenta de manera proporcional al área bajo la curva.

Con respecto a los datos de glibenclamida, el área bajo la curva de 0 a 12 h. fue de 2090.04 ± 915.79 ng*h/ml y de 0 a infinito de 5969.18 ± 2775.73 ng*h/ml y la glibenclamida al estar combinada con losartán tuvo los siguientes resultados: área bajo la curva de 0 a 12 h. fue de 3722.24 ± 1196.01 ng*h/ml y el área bajo la curva de 0 a infinito fue de 6815.37 ± 2350.83 ng*h/ml (Figura 17 y Figura 18).

El área bajo la curva de la glibenclamida al estar combinada, tiende a aumentar, sin embargo, este aumento no es significativo, esta tendencia al aumento en el área bajo la curva de la glibenclamida no se puede atribuir al efecto del losartán, pudiendo ser debido a la variabilidad de los animales.

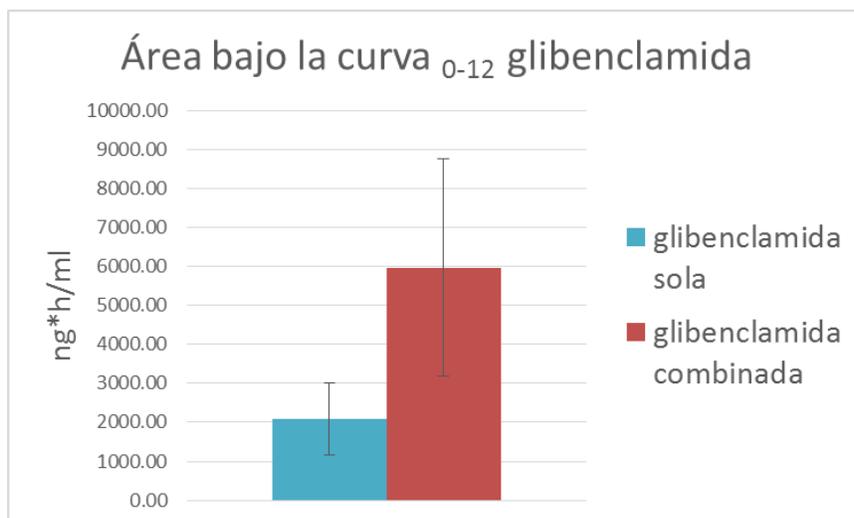


Figura 17 Comparación de las áreas bajo la curva 0-12 h de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.065$.

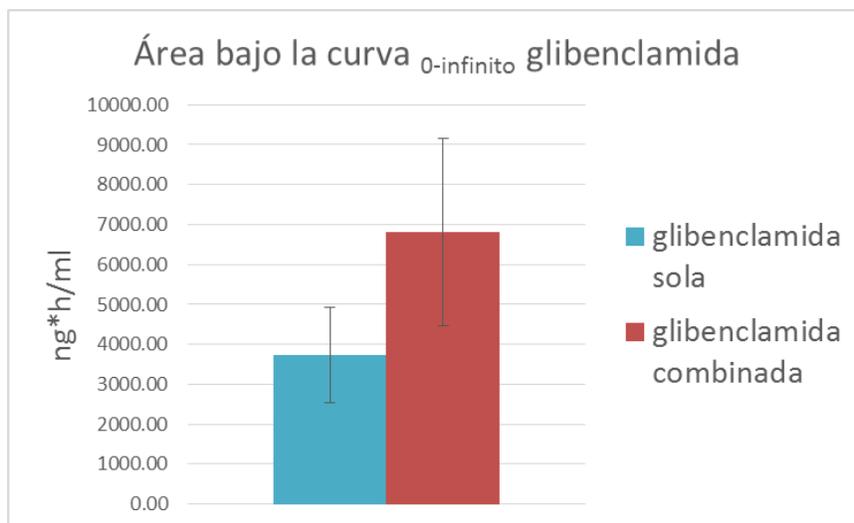


Figura 18 Comparación de las áreas bajo la curva 0-infinito de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.088$.

La depuración (Cl) es el parámetro farmacocinético más importante debido a que es el parámetro que indica la cantidad de sangre que se encuentra libre de fármaco por unidad de tiempo.

Tomando la ecuación anterior, se puede despejar la depuración, obteniendo:

$$\frac{\text{Depuración}}{\text{Biodisponibilidad}} = \frac{\text{Dosis}}{\text{área bajo la curva}}$$

Sin embargo, al no conocer el valor de la biodisponibilidad, se reporta el valor correspondiente a la relación depuración/biodisponibilidad (Cl/F), por lo tanto, al tener el valor de la dosis y del área bajo la curva, se calculó el valor Cl/F, dando valores para el losartán solo de 0.0036 ± 0.0024 ml/h/kg, y el valor para el losartán combinado fue de 0.0010 ± 0.0002 ml/h/kg. (Figura 19), dando un valor $p=0.048$, lo que se traduce en una disminución significativa de la depuración/biodisponibilidad de losartán cuando se encuentra en combinación con la glibenclamida. Con respecto a la glibenclamida sola, la Cl/F fue de 0.0058 ± 0.0044 ml/h/kg, y los valores para glibenclamida combinada fue de 0.0020 ± 0.0009 ml/h/kg (Figura 20) observándose una tendencia a disminuir, aunque este cambio no es significativo.

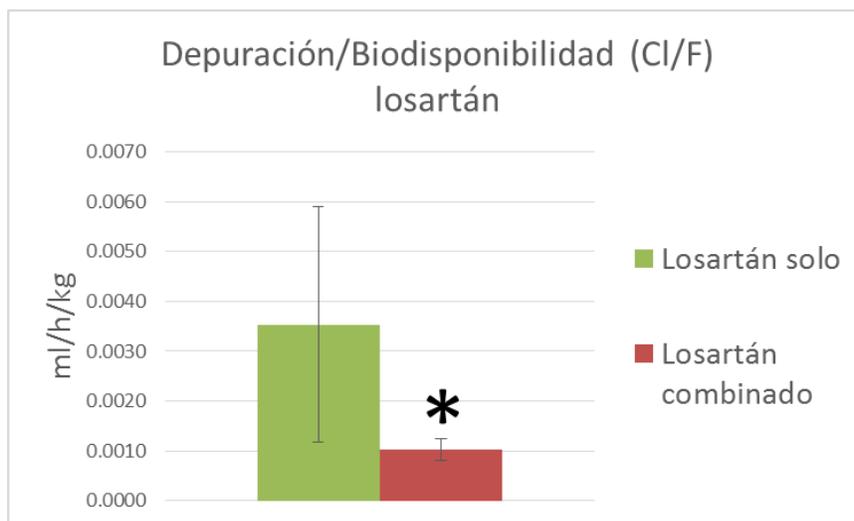


Figura 19 Comparación de la depuración de losartán solo y combinado con la glibenclamida, valor $p= 0.04$

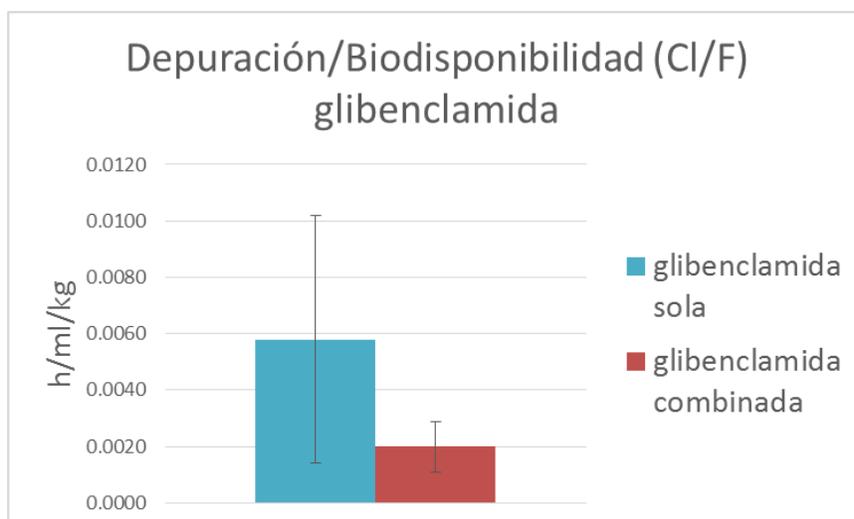


Figura 20 Comparación de la depuración de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.088$

La depuración depende de 2 variables: del flujo sanguíneo que pasa por el órgano y de la extracción del fármaco que exista en el órgano, esto puede reflejarse con la siguiente ecuación:

$$\text{Depuración} = \frac{Q(CA - CB)}{CA}$$

Siendo Q el flujo sanguíneo, CA la concentración de fármaco en el lado arterial y CB la concentración del lado venoso.

El losartán es un fármaco hipotensor que pudiera modificar el flujo sanguíneo que llega al órgano, sin embargo, al usar ratas sanas, su sistema tiene la capacidad de regular esta disminución de presión arterial que provoca el losartán, por otro lado este fármaco es considerado de alta extracción, es decir, que la concentración que sale del órgano metabolizador es mucho menor que la concentración que entra, la depuración pudo haber disminuido por una interacción en este nivel, siendo posible que tanto el losartán como la glibenclamida compitan por los citocromos, disminuyendo la depuración del losartán. Por lo tanto, se puede decir que en el caso del losartán, el valor de Cl/F disminuyó significativamente por un aumento en el valor de la biodisponibilidad, y posiblemente por una disminución del valor de la depuración por la competencia por los citocromos entre los fármacos.

Con respecto a la constante de eliminación, esta no se vio afectada en ambos casos, tanto para el losartán como para la glibenclamida (Figura 21 y Figura 22), por lo que los fármacos se eliminan al mismo ritmo en ambas condiciones.

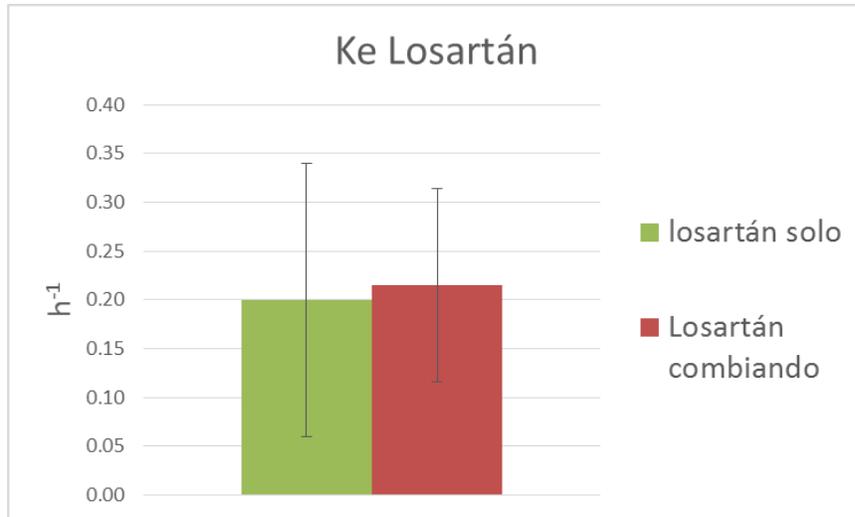


Figura 21 Comparación de las constantes de eliminación de losartán solo y combinado con la glibenclamida, valor $p= 0.76$

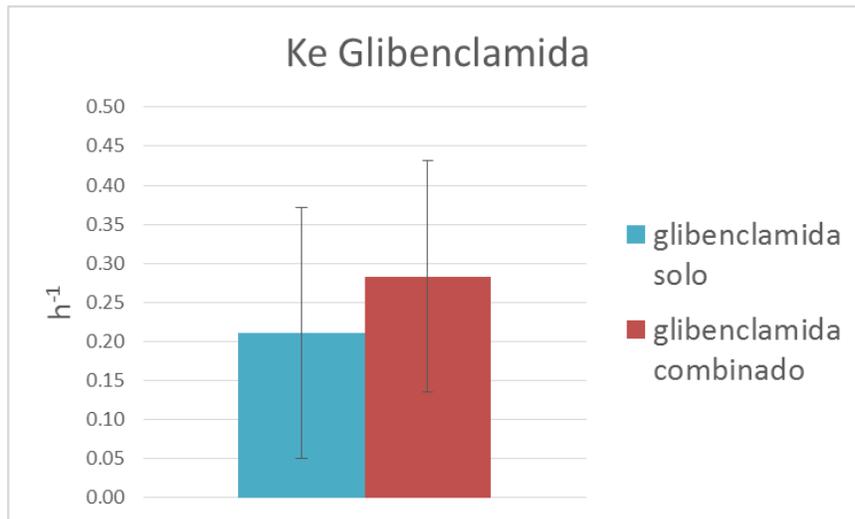


Figura 22 Comparación de las constante de eliminación de glibenclamida sola y combinado con losartán, valor $p= 0.49$

Por lo tanto, se puede decir que los parámetros farmacocinéticos que se vieron afectados significativamente, se debió a una interacción a nivel de la absorción, ya que se vio alterada la biodisponibilidad del losartán por acción de la glibenclamida, y posiblemente por la competencia que existe entre los fármacos por los citocromos P450.

6. Conclusiones

- El método establecido en el laboratorio para la determinación conjunta de glibenclamida y losartán en plasma de rata, cumplió con los criterios que establece la normatividad vigente, siendo capaz de dar datos confiables bajo las condiciones establecidas.
- Tanto la C_{max} como la T_{max} del losartán se vieron alterados por la acción de la glibenclamida.
- El área bajo la curva del losartán aumentó significativamente por acción de la glibenclamida.
- La depuración/biodisponibilidad del losartán disminuyó significativamente por la acción de la glibenclamida.
- La farmacocinética de la glibenclamida no fue afectada por el losartán.

7. Bibliografía

- 1 Byrne E. Drug interactions: A review and update. *Endodontic Topics* 4, 9-21 (2003).
- 2 Manzi S., Shannon. M. Drug Interactions—A Review. *Clinical Pediatric Emergency Medicine* 6, 93-102 (2005).
- 3 Van den Berg E., Kessels R., Kappelle L., Biessels G. Type 2 diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia and obesity: A systematic comparison of their impact on cognition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1792, 470–481470–481470–481481 (2009).
- 4 Ferrannini E. Diabetes and hypertension: the bad companions. *Lancet* 380, 601-610 (2012).
- 5 Ribeiro-Oliveira A., Pereira R., Vilas W., Souza R., Simões A. The renin–angiotensin system and diabetes: An update. *Vascular Health and Risk Management* 4, 787–803 (2008).
- 6 Altagracia-Martínez M., Moreno-Santamaría M., Rubio-Poo C., Skromne-Kadlubik D., Rivas-Cornejo M., Vázquez-Moreno E. Diabetes mellitus tipo 2: ventas de los hipoglucemiantes orales y costos de los tratamientos farmacológicos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 38, 23-33 (2006).
- 7 Lacourciere Y., Godin C., Halle J., Ross S., Wright N., Marion J. Long-term comparison of losartán and enalapril on kidney function in hypertensive type 2 diabetics with early nephropathy. *Kidney International* 58, 762–769 (2000).
- 8 Luzi L. Glibenclamide: An old drug with a novel mechanism of action? *Acta Diabetologica*, 239–244 (1997).
- 9 García R. Sulfonilureas....más allá del control metabólico. *Unidad de Diabetes, Hospital de Carúpano*,
- 10 Goa K., Losartán Potassium. *Drugs* 51, 820-845 (1996).
- 11 FID. Atlas de la DIABETES de la Federación Internacional de la Diabetes, sexta edición. 29-69 (2013).
- 12 Shah V., Findlay J., Hill H., Hulse J., McGilveray I., McKay G., Miller K., Patnaik R., Powell M., Tonelli A. Bioanalytical Method Validation—A Revisit

- with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research* 17, 1551-1557 (2000).
- 13 Zarghi A., Shafaati A. A rapid HPLC method for the determination of losartan in human plasma using a monolithic column. *Arzneimittelforschung* 55, 569–572 (2005).
 - 14 Emilsson H., Sjoberg. S. High-Performance liquid chromatographic determination of glibenclamide in human plasma and urine. *Journal of chromatography* 383, 93-102 (1986).
 - 15 Shah V. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. *The American Association of Pharmaceutical Science Journal* 9, 43-47 (2007).
 - 16 Karnes T., Shah V. Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutical Research* 8, 421-426 (1991).
 - 17 NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
 - 18 Ning L., Dan W., Ying Q., Famei L. Determination of glibenclamide and puerarin in rat plasma by UPLC–MS/MS: Application to their pharmacokinetic interaction study. *Talanta* 104, 109–115 (2013).
 - 19 Yoshitani T., Inotsume N., Yasuhara M. Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25, 1077—1083 (2002).
 - 20 Yuqing L., Fan Z., Dan W., Xinan W., Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2, 198-204 (2012).
 - 21 Golstein P.E., Van-Geffeñ J.P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflügers Archive-European Journal of Physiology* 437, 652-660 (1999).

- 22 Marzolini C., Buclin T. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 75, 13-33 (2004).
- 23 Si-hyung Y., Jun-shik C. Effects of ticlopidine on pharmacokinetics of losartan and its main metabolite EXP-3174 in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 32, 967–972 (2011).
- 24 Neerati P. Influence of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in normal and diabetic rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42, 285-289 (2011).