

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO DE AMITRIPTILINA
ADMINISTRADA POR VIA ORAL EN EQUINOS**

POR

RECCHI RIBEIRO, Lucciana Paola

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2019**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

Dra. Rita Rocca

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Silvana Alvariza

Tercer miembro:

Dra. Alicia Dib

Cuarto miembro (Co-tutor)

Dra. Nadia Crosignani

Fecha:

Autor:

Br. Lucciana Recchi Ribeiro

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional durante toda la carrera, sin ellos nada de esto sería posible.

A mi tutora Dra. Silvana Alvariza por aceptar guiarme durante el desarrollo de este proyecto, por su disposición y por dedicarme tanto tiempo. Por compartir su conocimiento sin límites.

A mi co-tutora Dra. Nadia Crosignani, por recibirme en su equipo desde el día que “toqué a su puerta”, por permitirme desarrollar este proyecto y por transmitirme todo su conocimiento y apoyo incondicional. Por ser una inspiración para los estudiantes y médicos veterinarios.

A CIDEC por la oportunidad de llevar adelante este proyecto como Ayudante de Investigación CIDEC.

Al Área de Farmacología de la Facultad de Veterinaria por permitirme trabajar en el laboratorio y aportarme el conocimiento necesario para ello.

Al Ejército Nacional por hacer posible la fase experimental, al facilitar sus instalaciones y los equinos para el experimento.

A mis profesores: Dr. Gonzalo Suarez, Dr. Alejandro Benech, Dra. Natalie Ruiz; Dra. Ma. José Estradé; y a mis compañeros de carrera: Joaquin Badia, Florencia Pereyra, Gastón Perez, por su apoyo y colaboración para llevar adelante el trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. El dolor y su importancia en medicina veterinaria.....	9
2.1.1. Fisiología y clasificación de dolor	10
2.1.2. Manejo y control del dolor.....	12
2.2. Estudios experimentales de los fármacos.....	15
2.2.1. Farmacocinética	15
2.2.2. Farmacodinamia	17
2.3. Amitriptilina	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo General	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Animales	22
4.2. Diseño Experimental	22
4.3. Análisis de laboratorio	23
4.4. Tratamiento de datos	23
4.5. Análisis Estadístico.....	24
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIÓN.....	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33
9. ANEXOS	39

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Vías del dolor (Guedes, 2017).....	11
Figura 2. Diversas clases de fármacos, su mecanismo de acción y aplicación (Fox, 2009).....	14
Figura 3. Mecanismos de acción de los antidepresivos (Verdu y col., 2008).	17
Figura 4. Principales vías metabólicas de la amitriptilina (Linden y col., 2008).....	19
Figura 5. Concentraciones plasmáticas de amitriptilina (media \pm rango) luego de administración de 1mg/kg amitriptilina por vía oral (n=5). VTL: vena torácica lateral, VY: vena yugular.	25
Figura 6. a) Frecuencia cardíaca expresada en latidos por minuto, b) score de motilidad intestinal, c) frecuencia respiratoria expresada en movimientos respiratorios por minuto; (media \pm rango) luego de administración de 1mg/kg amitriptilina oral en equinos (n=6).	27
Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos (media y CV) obtenidos de vena torácica lateral (VTL) y vena yugular (VY) de cinco equinos adultos luego de la administración oral de 1 mg/kg de amitriptilina.....	26
Tabla 2. Tipos de ritmo cardíaco obtenidos a partir de los registros electrocardiográficos en seis equinos, antes y después de la administración de 1mg/kg de amitriptilina por vía oral.....	28

RESUMEN

En los últimos años se ha visto un creciente interés en el conocimiento sobre la fisiología y el tratamiento del dolor en medicina veterinaria. En la especie equina en particular, las investigaciones han ido progresando lentamente, surgiendo nuevos estudios sobre fármacos antiguos, que han sido tradicionalmente utilizados en otras especies. El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación del comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de amitriptilina administrada por vía oral en equinos. Se trata de una droga utilizada desde los años 60 para el tratamiento de personas con depresión y dolor crónico. En este estudio, se administró 1 mg/kg de amitriptilina vía oral a seis caballos sanos. Fueron colectadas muestras de sangre de vena yugular y vena torácica lateral en tiempos predeterminados desde 0 a 24 horas luego de la administración. Las concentraciones plasmáticas fueron determinadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y el comportamiento farmacocinético de la droga se estudió mediante análisis no compartimental. Se evaluaron parámetros farmacodinámicos incluyendo frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y motilidad intestinal y además se realizaron exámenes electrocardiográficos en todos los sujetos. Las muestras de vena torácica lateral arrojaron los siguientes datos: concentración máxima de amitriptilina 30,7 ng/mL, tiempo de concentración máxima 1 a 2 h, vida media de eliminación 17,2 h, área bajo la curva de concentración vs tiempo 487,4 ng/mL/h, clearance aparente 2,6 L/h/kg, volumen de distribución aparente 60,1 L/kg. Las muestras de vena yugular sobreestimaron la cantidad de amitriptilina circulante y no deberían ser usadas para el análisis farmacocinético cuando la administración se realiza por vía oral depositando la dosis en la boca del animal. La frecuencia cardíaca y la motilidad intestinal presentaron disminuciones significativas, pero carecen de relevancia clínica ya que todos los valores se mantuvieron dentro del rango normal para la especie. Los resultados electrocardiográficos obtenidos no fueron concluyentes. Futuros estudios son necesarios para determinar si un tratamiento de dosis múltiple llevaría a la droga a un estado estacionario con concentraciones plasmáticas seguras y eficaces.

SUMMARY

In the last few years, there has been an increasing interest in pain physiology and treatment in veterinary medicine. Research in equine medicine has showed slow progress. However, old drugs traditionally used in other species are being studied for the first time in horses. The purpose of the study was to evaluate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral amitriptyline in horses, which has been used since the 1960s to treat people with depression and chronic pain. Oral amitriptyline (1 mg/kg) was administered to six healthy horses. Blood samples were collected from jugular and lateral thoracic vein at predetermined times from 0 to 24 hours after administration. Plasma concentrations were determined by HPLC and analyzed using noncompartmental methods. Pharmacodynamic parameters including heart rate, respiration rate and intestinal motility were also evaluated and electrocardiographic exams were performed in all subjects. Samples from lateral thoracic vein showed the following data: mean maximum plasma concentration of amitriptyline 30.7 ng/mL, time to maximum plasma concentration 1 - 2 h, elimination half-life 17.2 h, area under the plasma concentration–time curve 487.4 ng/mL/h, apparent clearance 2.6 L/h/kg, apparent volume of distribution 60.1 L/kg. Jugular vein sampling overestimated the amount of amitriptyline absorbed and should not be used to study uptake following oral administration. Heart rate and intestinal motility showed significant variation, but this was not considered clinically relevant since they both remained within normal limits for the species. Electrocardiography did not provide conclusive results. Further studies are required to discern if multiple dose treatment would take the drug to steady state as expected, with effective and safe concentrations.

1. INTRODUCCIÓN

Los equinos han acompañado al ser humano a lo largo de la historia. Inicialmente fueron utilizados como medio de transporte y herramienta de trabajo en el medio rural. En la actualidad, se destaca sobre las demás categorías el equino deportivo (Hausberger y col., 2008).

El equino destinado a la actividad deportiva es sometido a actividades de entrenamiento y competencia que lo exponen a sufrir lesiones músculo-esqueléticas, siendo una manifestación típica de las mismas la claudicación de uno o más miembros como expresión de dolor. La presentación de dichas lesiones se ve influenciada además por la conformación del paciente, el tipo de deporte que realiza y la categoría en la que participa o nivel de exigencia del mismo (Dyson, 2000; Murray y col., 2006). El papel del veterinario en estos casos no abarca simplemente el tratamiento de la lesión presente sino también del dolor causado por la misma. En las últimas décadas se ha visto un avance considerable en el estudio de la fisiología y farmacología del dolor en los animales, haciendo posible un mejor manejo del mismo (Crook, 2014).

Sin embargo, aún existe la necesidad de ampliar el conocimiento en esta área, por lo cual, la presente investigación se basa en el estudio del comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de amitriptilina, un antidepresivo tricíclico que ha sido utilizado para tratamiento de dolor crónico y neuropático en humanos y otras especies (McQuay y col., 1993; Cashmore y col., 2009). No obstante, no se han encontrado registros de estudios con dicho fármaco en equinos.

A tales efectos, es de relevancia académica y profesional, profundizar en el estudio de fármacos que podrían ser utilizados como herramientas para colaborar en la terapia multimodal como tratamiento de dolor.

“La ausencia de dolor, lesión o enfermedad (por medio de prevención, o diagnóstico rápido y tratamiento)” es una de las 5 libertades aceptadas como componentes del bienestar animal (Farm Animal Welfare Council, 2009). Por lo cual los veterinarios deben profundizar su conocimiento sobre el tema y mantenerse actualizados para brindarles a los pacientes el mejor cuidado posible.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El dolor y su importancia en medicina veterinaria

Se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicha lesión. Es la percepción de una sensación no deseada, resultante de una lesión o enfermedad, evidenciada en el paciente por alteraciones en parámetros fisiológicos, comportamentales o ambos (Hellyer y col., 2007).

Es ampliamente aceptado el hecho de que los vertebrados poseen complejos mecanismos sensitivos que permiten la detección de estímulos dolorosos, por lo tanto, se debe asumir que aquellos procedimientos que causan dolor en el ser humano también lo hacen en los animales (Flecknell, 2008).

Sin embargo, la subjetividad de dicho fenómeno le concede cierta dificultad a la hora de determinar la presencia de dolor, o clasificarlo según su magnitud ya sea un dolor mínimo o casi imperceptible, un dolor máximo o intolerable, y los niveles entre ambos extremos. A diferencia del ser humano, los animales son incapaces de expresar verbalmente la localización, la intensidad y características de dicho dolor (Gleerup y Lindegaard, 2016). Hellyer y col. (2007) resaltan que la imposibilidad de comunicación verbal no implica que el paciente no perciba dolor y requiera tratamiento adecuado para su alivio.

Además, las reacciones de cada especie ante un estímulo doloroso varían marcadamente y en algunas ocasiones dicha respuesta puede verse extremadamente afectada por la presencia de un observador. Las especies que son naturalmente presas, son capaces de minimizar la expresión de dolor para no convertirse en una presa fácil para los predadores (Taylor, 2002). Según Wagner (2010) también deben ser consideradas las posibles interferencias raciales e interindividuales en la expresión de dolor.

Estos obstáculos hacen aún más difícil la labor del veterinario en la detección y tratamiento del dolor (Flecknell, 2008). Consecuentemente dependerá de la habilidad del observador y su capacidad de detectar cambios fisiológicos y

comportamentales en el animal, posiblemente presentes como consecuencia de un estímulo doloroso (Gleerup y Lindegaard 2016).

El reconocimiento y el tratamiento del dolor es fundamental para el bienestar animal (Rutherford, 2002). Además se reconoce que el dolor en los animales, al igual que en los humanos, trae ciertas desventajas, como ser aumento del estrés en respuesta a un procedimiento quirúrgico, alteración del funcionamiento normal del tracto intestinal y función renal, y cambios en el comportamiento normal para la especie (alimentación, hidratación, descanso, aseo). Taylor (2002) resalta que una buena analgesia promueve el apetito del paciente y contribuye en su recuperación; principalmente luego de lesiones traumáticas o procedimientos quirúrgicos, los cuales implican cierto estrés y requerimientos de energía para reparación de tejidos y correcto funcionamiento del sistema inmunitario.

2.1.1. Fisiología y clasificación de dolor

El dolor surge a partir de un estímulo doloroso (mecánico, químico o térmico) que activa receptores (nociceptores) ubicados en las porciones terminales de neuronas aferentes primarias, las cuales se encuentran distribuidas periféricamente por todo el cuerpo del animal. Ocurre la transducción: transformación de un estímulo doloroso en potenciales de acción, que serán transmitidos por vías neuronales hacia el cuerno dorsal de la médula espinal. Allí, ocurren sinapsis interneuronales excitatorias o inhibitorias que modulan la señal dolorosa, para luego ser proyectada hacia tronco encefálico y tálamo, seguido de córtex cerebral, donde será percibida como tal, siendo identificadas la localización e intensidad del dolor (Shilo y Pascoe, 2014). Es activada entonces la vía descendente de modulación del dolor, partiendo del tronco encefálico ejerciendo su acción en medula espinal a través de la liberación de neurotransmisores como serotonina, norepinefrina y dopamina. El mal funcionamiento de este sistema inhibitorio descendente puede desencadenar un estado de dolor persistente (Guedes, 2017).

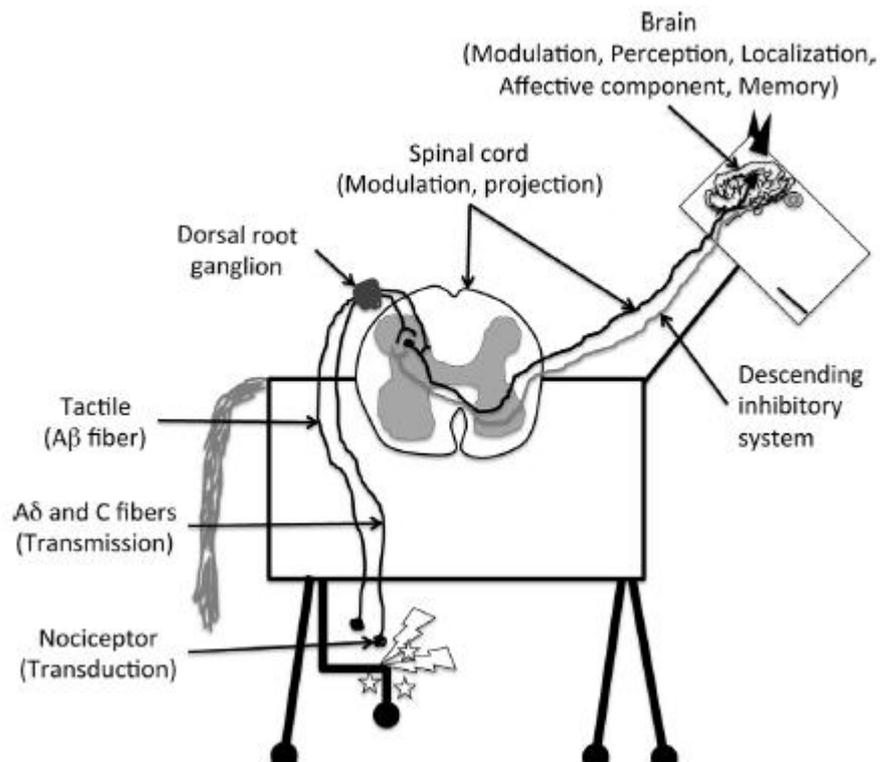


Figura 1. Vías del dolor (Guedes, 2017).

Según Guedes (2017) se han planteado diferentes clasificaciones para el dolor basadas en su ubicación anatómica (superficial, profundo, visceral, somático, musculoesquelético), en su intensidad (leve, moderado, severo) o en su mecanismo de acción (nociceptivo, inflamatorio, neuropático). Además, se puede clasificar según su duración (agudo, crónico).

El dolor agudo se caracteriza por iniciar de forma abrupta y presentar corta duración, comúnmente producido como resultado de un evento traumático o infeccioso. Generalmente es tratado con drogas analgésicas obteniendo buenos resultados. El dolor crónico se extiende en el tiempo, más allá de la resolución del cuadro agudo. Este puede estar asociado a procesos patológicos crónicos, como por ejemplo la osteoartritis. Por la complejidad de su fisiopatología, debe ser abordado con terapias multimodales, debiendo combinar muchas veces analgésicos con otros fármacos clasificados como tranquilizantes o psicotrópicos, y considerar la adición de fisioterapia, y cambios en el entorno y rutina del animal (Hellyer y col., 2007).

El dolor siempre ha sido considerado como un síntoma subyacente a un cuadro patológico (dolor agudo), con función biológica de alertar sobre la existencia de un problema y desencadenar conductas protectoras. Sin embargo, algunos autores sostienen que el dolor persistente (dolor crónico) se trata de una enfermedad por sí misma. En el dolor agudo, la liberación de mediadores inflamatorios contribuye en la disminución de umbrales de dolor y causa hiperalgesia primaria o periférica. Se define hiperalgesia como una mayor intensidad en la percepción dolorosa de estímulos que por sí solos ya causarían dolor. Cuando esta situación periférica persiste en el tiempo, las despolarizaciones sostenidas de las fibras nerviosas llevan a la neuromodulación central (hiperalgesia secundaria), y a un aumento de sensibilidad a estímulos inocuos (alodinia) (Siddall y Cousins, 2004; Guedes, 2017).

El dolor neuropático, es un tipo de dolor crónico patológico, que surge como consecuencia de una lesión o disfunción a nivel del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) (Scholz y Woolf, 2002). Zylicz (2019) sostiene que el dolor neuropático hace referencia a diversos síndromes de origen común, causados por el daño de un nervio, medula espinal o menos frecuentemente centros cerebrales. El denominador común en estos pacientes es el estado de desensibilización, donde las vías inhibitorias del dolor no funcionan correctamente y hay menos participación de la serotonina en la analgesia endógena. El problema puede ser reversible, cuando inicia como una neuropatía por compresión, llegando a ser irreversible cuando el daño es severo.

Pacientes con cuadros de artritis, laminitis y aquellos que son sometidos a procedimientos quirúrgicos pueden desarrollar neuromodulación central y/o periférica, y consecuentemente dolor neuropático (Jones y col., 2007; Schaible, 2012; Borsook y col., 2013).

2.1.2. Manejo y control del dolor

Según Hellyer y col. (2007) el término analgesia se define como la ausencia completa de dolor, pero clínicamente se refiere a la reducción de su intensidad, haciéndolo tolerable, ya que el mismo presenta en parte una función fisiológica como se describió previamente.

Los mismos autores sostienen que la acción farmacológica sobre los procesos nociceptivos es variable y dependerá de la etapa en la que actúen los diversos fármacos (Figura 1). Se pueden utilizar anestésicos locales para impedir la transducción, generalmente son infiltrados en el local implicado o también inyectados por vía intravenosa. Los AINES (antiinflamatorios no esteroideos) inhiben la transducción y la liberación de mediadores inflamatorios en el sitio afectado. La transmisión puede ser impedida por bloqueos anestésicos de nervios periféricos, plexos nerviosos o aplicaciones epidurales. La modulación puede ser modificada por administración vía epidural de distintas familias de fármacos como los opioides y α 2-agonistas entre otros, y la percepción disminuida por anestésicos generales, opioides, α 2-agonistas y/o diversos sedativos o tranquilizantes.

En la bibliografía relacionada, se describen también los analgésicos adyuvantes. Son fármacos que han surgido en las últimas décadas, con propiedades analgésicas y mecanismos de acción diversos, siendo centro de atención de investigaciones recientes. La mayoría de estas drogas son utilizadas en tratamientos de dolor crónico y neuropático (Love y Thompson, 2014). Se pueden clasificar según la función principal que ejercen:

- Drogas antiepilépticas → Gabapentina, Pregabalina. Actúan principalmente en canales de calcio, alterando varios procesos celulares, liberación de neurotransmisores y excitabilidad celular (Cao, 2006).
- Antagonistas de receptores NMDA → Ketamina, Amantadina. Los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) se encuentran distribuidos en todo el SNC y participan en muchos procesos fisiológicos. La activación de los mismos promueve la hiperalgesia y el dolor crónico (Visser y Schug, 2006; Corlew y col., 2008).
- Inhibidores de recaptación de serotonina y norepinefrina → Antidepresivos tricíclicos (TCA) Ej. Amitriptilina. Los TCA provocan un aumento de concentración de serotonina y norepinefrina en el SNC, siendo estos neurotransmisores fundamentales en la vía descendente de modulación del dolor (Dharmshaktu y col., 2012).

Drug class	Mechanism	Acute	Tissue injury	Nerve injury
Opioid (morphine)	Opioid receptors on high threshold C fibers	X	X	X
NMDA antagonist (ketamine)	Blocks glutamate-spinal facilitation	0	X	X
NSAID	Inhibits PG synthesis at injury site and spinal cord	0	X	0
IV lidocaine	Blocks sodium channels	0	0	X
Anticonvulsant (gabapentin)	Reduces spontaneously active neurons	0	0	X
TCA (amitriptyline)	Increases catecholamine levels	0	0	X

Figura 2. Diversas clases de fármacos, su mecanismo de acción y aplicación (Fox, 2009).

Existe poca literatura en lo que se refiere al tratamiento antiálgico crónico en equinos, con evidente falta de investigación en el área (Sanchez y Robertson, 2014).

Esto se debe a diversos motivos, incluyendo falta de conocimiento sobre las ventajas del tratamiento antiálgico o sobre la fisiología del dolor y los procesos fisiopatológicos del dolor persistente, dificultades en la evaluación de duración e intensidad de nocicepción/dolor en los animales, y la carencia de drogas analgésicas disponibles o técnicas efectivas para tratar el dolor sin causar efectos adversos que pongan en riesgo la salud del paciente. Por lo tanto, el manejo de dolor en el equino ha sido mayormente empírico, una combinación entre la escasa información científica disponible y la experiencia del médico veterinario. Afortunadamente, esto ha comenzado a cambiar al surgir un creciente interés en el desarrollo de nuevos conocimientos y métodos diagnósticos y terapéuticos para los pacientes (Taylor, 2002).

En los últimos años, junto a un mejor entendimiento de la temática, surge la analgesia multimodal. Esta estrategia consiste en la combinación de dos o más fármacos con mecanismos de acción diferentes, con el objetivo de lograr una analgesia más potente y muchas veces permitir una elección de dosis menores, para disminuir de esta forma los posibles efectos adversos. Surge la integración de otras

terapias físicas como la fisioterapia, acupuntura y quiropraxia, entre otras (Driessen y Zarucco, 2014).

Muir (2005) defiende la importancia de la terapia multimodal, y también sostiene que de ser posible se deberá instaurar tratamiento antiálgico preventivo, antes de que se desencadene el proceso doloroso. De esta forma ayudaría a controlar el dolor agudo provocado, disminuyendo las probabilidades de sensibilización central y desarrollo de dolor crónico.

2.2. Estudios experimentales de los fármacos

La mayoría de la información sobre el dolor en animales ha sido extrapolada de experimentos conducidos en animales de laboratorio, principalmente ratones. Generalmente, los datos de relevancia clínica derivan de estudios realizados en humanos, por ser capaces de expresar verbalmente la mejoría o la ausencia completa de dolor luego de un tratamiento antiálgico. Sin embargo, no es posible afirmar que terapias efectivas en ratones, perros o humanos, funcionarían de igual forma en caballos (Muir, 2010).

Afortunadamente, el conocimiento acerca de dolor en equinos se encuentra en continuo desarrollo. Es importante destacar que recientemente se han comenzado a generar datos sobre farmacocinética y farmacodinamia, necesarios para tener un mejor entendimiento sobre los fármacos antes utilizados empíricamente. (Taylor, 2002; Muir, 2010).

2.2.1. Farmacocinética

Es el estudio del movimiento de un fármaco en el organismo, incluyendo procesos de liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción. Es importante contar inicialmente con esta información, para luego proceder a realizar estudios que relacionen la concentración plasmática alcanzada de la droga en cuestión y la concentración necesaria para producir el efecto deseado (Pypendop, 2014).

La absorción es el pasaje de un fármaco desde el sitio de administración hacia la circulación sistémica, para ello el mismo deberá atravesar diversas membranas biológicas. En algunos casos, precede a esta etapa, la fase de liberación (por ejemplo, en presentaciones solidas que luego de ser administradas por vía oral

deben disolverse para liberar el fármaco y que este pueda ser absorbido). La biodisponibilidad es el parámetro que cuantifica la absorción de un fármaco y hace referencia al porcentaje del mismo que alcanza la circulación sistémica respecto a la dosis administrada. Para ejemplificar, un medicamento administrado por vía intravenosa tendrá una biodisponibilidad del 100 % ya que la totalidad de la dosis administrada alcanzará la circulación sistémica y estará disponible para distribuirse por el cuerpo del animal, mientras que un medicamento administrado por vía oral debe absorberse en tracto gastrointestinal (lo cual puede verse limitado por las características del producto y propiedades fisicoquímicas tanto de la droga como del tracto digestivo del animal). A su vez en su pasaje por intestino e hígado podrá sufrir transformaciones metabólicas o bien ser excretado por bilis, alterando la fracción del fármaco que alcanzará la circulación general. Se define distribución como el proceso a través del cual, un fármaco, luego de ser absorbido (o administrado por vía intravenosa) es transportado por el organismo, teniendo como objetivo alcanzar su sitio de acción. Algunos fármacos podrán ser metabolizados, sufriendo modificaciones químicas con el objetivo de favorecer la posterior eliminación de sus metabolitos. Los metabolitos formados pueden ser inactivos, pueden ser más activos que la molécula original, pueden provocar efectos diferentes o incluso efectos tóxicos. Los principales órganos encargados de este proceso son el hígado e intestino. Finalmente, el fármaco y/o sus metabolitos serán eliminados mediante excreción. Los principales órganos excretores son los riñones (excreción de compuestos hidrosolubles), el hígado (excreción del fármaco y/o sus metabolitos a través de la bilis) y los pulmones (responsables de eliminar compuestos volátiles) (Flório y de Sousa, 2011; Buxton y Benet, 2012).

Pypendop (2014) considera que el análisis farmacocinético constituye una herramienta valiosa, cuyas ecuaciones pueden ser sustituidas por valores obtenidos experimentalmente a partir de la administración de un cierto fármaco para estudiar los diferentes parámetros relacionados. Algunos de estos parámetros se citan a continuación. El volumen de distribución es el volumen corporal en el cual aparentemente se disuelve la droga luego de su administración. El clearance refiere al volumen de plasma que es depurado del fármaco por unidad de tiempo. La semivida de eliminación es el tiempo necesario para que la concentración plasmática de una droga caiga en un 50%.

2.2.2. Farmacodinamia

Estudia la acción de los fármacos y los efectos bioquímicos y fisiológicos en el organismo. El buen entendimiento de las propiedades farmacodinámicas de una droga permite aplicar una terapia adecuada y muchas veces se utiliza para estudiar los efectos adversos implicados (Blumenthal y Garrison, 2012).

De esta manera el conocimiento sobre las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de un fármaco permiten un mejor entendimiento sobre el tema y hacen posible la instauración de tratamientos efectivos y seguros.

2.3. Amitriptilina

La amitriptilina pertenece a la familia de los TCA. Fue introducida alrededor del año 1960 para el tratamiento de pacientes con depresión (Shen y col., 2010). Actualmente su uso como antidepresivo ha disminuido significativamente ante la aparición de fármacos con menos efectos adversos, como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, pero forman parte importante del arsenal terapéutico para el tratamiento de dolor crónico y neuropático (Ferguson, 2001).

Mechanism of action	Site of action	TCA	SNRI	SRI
Reuptake inhibition of monoamine	Serotonin	+	+	+
	Noradrenaline	+	+	-
Receptor antagonism	α -Adrenergic	+	-	-
	NMDA	+	(+) milnacipran	-
Blocker or activator of ion channels	Sodium channel blocker	+	(+) venlafaxine - duloxetine	(+) only fluoxetine
	Calcium channel blocker	+	?	(+) citalopram fluoxetine
	Potassium channel activator	+	?	-
GABA _B receptor	Increase of receptor function	+ amitriptyline desipramine	?	+ fluoxetine
Opioid receptor binding/ opioid-mediated effect	μ - and δ -Opioid receptor	(+)	(+) venlafaxine	(+) paroxetine
Inflammation	Decrease of PGE ₂ production	+	?	+ fluoxetine
	Decrease of TNF α production	+	?	?

PGE₂ = prostaglandin E₂; SNRI = serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor; SRI = selective serotonin reuptake inhibitor; TCA = tricyclic antidepressant; TNF α = tumour necrosis factor- α ; + indicates mechanism of action documented *in vitro* and/or *in vivo*; (+) indicates mechanism of action documented *in vitro* and/or *in vivo* at high concentration; - indicates no known mechanism of action; ? indicates not investigated/not known.

Figura 3. Mecanismos de acción de los antidepresivos (Verdu y col., 2008).

La amitriptilina posee diversos mecanismos de acción (Figura 3), siendo el principal, su capacidad de inhibir la recaptación de serotonina y norepinefrina, aumentando la

concentración de ambos neurotransmisores en la hendidura sináptica a nivel espinal y supra-espinal, estimulando la vía descendente inhibitoria del dolor. También actúa en otros sitios: como antagonista de receptores NMDA, receptores α -adrenérgicos, agonistas de receptores opioides (especialmente receptor δ , inhibiendo la alodinia) y receptores GABA. Actúa en canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ , adquiriendo gran importancia por bloquear canales de Na^+ ya que estos participan en la excitabilidad neuronal. Contribuye en la disminución de producción de prostaglandina E2 y factor de necrosis tumoral (Yaron y col., 1999; Krystal y col., 2002; Wang y col., 2004; Ignatowski y col., 2005; McCarson y col., 2006; Benbouzid y col., 2008; Verdu y col., 2008; Dharmshaktu y col., 2012).

Está comprobado que existe una alta relación entre la depresión mayor y el dolor crónico en pacientes humanos. Se cree que esto puede estar asociado al hecho de que las personas que padecen un cuadro depresivo presentan una disminución de los niveles de serotonina y norepinefrina y consecuentemente los TCA serían beneficiosos en ambos cuadros (Verdu y col., 2008).

Attal (2019) presenta los resultados de las pautas para el tratamiento del dolor neuropático establecido por Neuropathic Pain Special Interest group (NeuPSIG) como parte de International Association for the Study of Pain (IASP). Según este trabajo los TCA (principalmente amitriptilina) y los inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (principalmente duloxetina) son recomendados como drogas de primera línea.

Los principales efectos adversos asociados a los TCA se relacionan con su acción anticolinérgica, como sequedad de boca y constipación o dificultad de evacuación, tanto de vejiga como de intestino. Por su efecto antihistamínico y antagonista de receptores α -adrenérgicos puede causar sedación, somnolencia e hipotensión (Verdu y col., 2008; Zylicz, 2019). Se describe también la predisposición a presentar arritmias, lo cual se asocia con una prolongación del intervalo QT. Por tal motivo, es importante tener especial cuidado con esta medicación en pacientes geriátricos o personas de cualquier edad que presenten patologías cardíacas. (Witchel y col., 2003). En 2018 Sutayatram y col. describieron efectos similares en caninos.

Verdu y col. (2008) no recomienda la coadministración con inhibidores de recaptación de serotonina (como por ejemplo opioides), ya que combinados con TCA pueden provocar un síndrome serotoninérgico.

Linden y col. (2008) reportan el pasaje de amitriptilina a nortriptilina (su principal metabolito activo) por desmetilación y la formación de E-10-hidroxi (EHAT) y Z-10 hidroxiamitriptilina (ZHAT) por hidroxilación. Además, de CYP 2D6, también menciona el papel de CYP 2C19 en estos procesos (Figura 4).

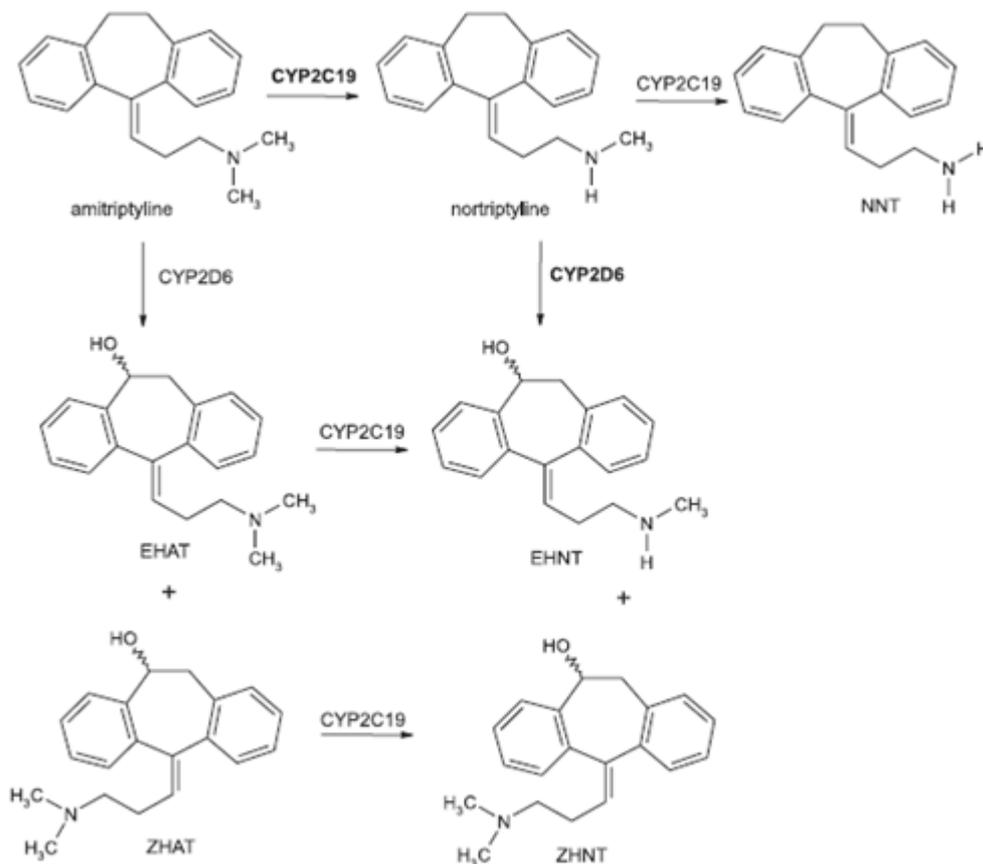


Figura 4. Principales vías metabólicas de la amitriptilina (Linden y col., 2008).

Kukes y col. (2008) realizaron un estudio comparativo sobre la farmacocinética de amitriptilina oral en humanos y perros. El mismo muestra un elevado volumen de distribución y clearance aparente: $(20,3 \pm 2,4 \text{ vs } 40,2 \pm 3,7) \text{ L/kg}$ y $(1,31 \pm 0,19 \text{ vs } 5,3 \pm 0,83) \text{ L/h/kg}$ en humanos y perros respectivamente. Las áreas bajo la curva de concentraciones plasmáticas normalizadas por la dosis en este experimento muestran una diferencia significativa en la exposición al fármaco entre estas especies. Norkus y col. (2015) reportan una biodisponibilidad oral del 6% en perros

mientras que para humanos se referencian valores promedio de 45% (Bryson y Wilde, 1996), evidenciando una amplia variabilidad interespecie.

Las diferencias farmacocinéticas mostradas probablemente se deban a diferencias en el metabolismo, tanto sistémico como presistémico en cada especie, así como a diferencias en las composiciones corporales que determinan el volumen de distribución. En el hombre, el metabolismo de la amitriptilina está relacionado con varias enzimas citocromo P450 (CYP). La acción de CYP 2D6 involucrada en el humano, puede ser comparada con la de CYP 2D15 en el perro (Kukes y col., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Describir el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico tras una administración oral única de amitriptilina en equinos sanos.

3.2. Objetivos Específicos

Comparar datos farmacocinéticos de muestras provenientes de vena yugular y vena torácica lateral de un mismo individuo luego de administración oral de un fármaco.

Detectar posibles efectos adversos de importancia para la especie a través del estudio farmacodinámico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

El estudio fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) – Protocolo número 853.

Fueron utilizados seis equinos deportivos pertenecientes al Ejército Nacional, tres hembras provenientes del Haras Militar Gral. Fausto Aguilar y tres machos castrados pertenecientes al Grupo de Artillería N° 5. Se seleccionaron animales adultos de entre 5 - 18 años de edad y un peso de entre 461 - 564 kg. Previo al inicio de la fase experimental se realizó examen físico y análisis paraclínicos, incluyendo hemograma completo, perfil hepático y renal, para comprobar que eran sujetos sanos.

4.2. Diseño Experimental

Los animales fueron sometidos a 12 horas de ayuno, sin tener acceso a forraje o concentrado antes de la administración del fármaco, recibiendo alimento y agua a partir de dos horas post-administración.

Se realizó tricotomía para colocación de un catéter en vena yugular izquierda y vena torácica lateral izquierda. Luego de una adecuada antisepsia y bloqueo subcutáneo con 1 mL de lidocaína 2%, se procedió a la cateterización de las venas mencionadas para la posterior obtención de muestras.

Todos los caballos recibieron una dosis única de 1 mg/kg de amitriptilina en una presentación semisólida por vía oral.

A través de los catéteres posicionados inicialmente, fueron obtenidas muestras de sangre de 10 mL, descartando los primeros 5 mL extraídos antes de cada muestra y administrando 10 mL de solución salina luego de cada extracción con el objetivo de mantener la permeabilidad de los mismos durante todo el experimento. Se obtuvo una muestra previa a la administración del fármaco (T0) y luego se repitió el procedimiento a los 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 24 horas.

Inmediatamente luego de cada colecta la sangre de cada animal fue depositada en tubos con heparina y estos fueron centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos. El

plasma obtenido fue transferido a criotubos, siendo estos últimos identificados y almacenados a -80 °C hasta el momento del análisis.

Durante los mismos tiempos de muestreo, excepto en 2 y 5 minutos, se registraron los siguientes parámetros farmacodinámicos: frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria, por medio de auscultación, y motilidad intestinal, basada en la misma escala utilizada por Gozalo-Marcilla y col. (2017) (Anexo 1).

Además, se realizaron registros electrocardiográficos de todos los sujetos en los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. Para ello se utilizó un equipo digital Fukuda, modelo CardiMax, con registro en papel termosensible a una velocidad de 25 mm por segundo. Como derivada de registro se utilizó el sistema base-apex, como fue recomendado por Verheyen y col. (2010) para estudios en reposo. Sobre los registros se obtuvieron mediciones de intervalo QT (media de 5 ciclos cardíacos para cada tiempo).

4.3. Análisis de laboratorio

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (LAFAVET) del Área de Farmacología con el objetivo de analizar las muestras obtenidas en la etapa previa.

Las concentraciones plasmáticas de amitriptilina fueron determinadas por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) mediante la técnica descrita por Linden y col. (2008) con modificaciones menores (Anexo 2).

La técnica analítica resultó lineal entre 10 y 500 ng/mL de amitriptilina. Los coeficientes de variación para la precisión inter e intradía fueron menores al 15% y la exactitud de la técnica estuvo entre 85 y 115% en todo el rango lineal de acuerdo con la Guía de la FDA para la validación de métodos analíticos (2018).

4.4. Tratamiento de datos

Los datos farmacocinéticos fueron sometidos a un análisis no compartimental. Los parámetros determinados fueron concentración máxima (C_{max}), tiempo máximo (T_{max}), área bajo la curva (AUC_0^{∞}), semivida de eliminación ($t_{1/2}$), clearance aparente (CL/F), y volumen de distribución aparente (Vd/F). Los valores de C_{max} y T_{max} fueron obtenidos directamente de la información proyectada por las lecturas en HPLC. Los

valores de AUC_0^∞ fueron calculados por el método de los trapecios desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo y extrapolados a infinito, sumándole el término C_{last}/β , siendo C_{last} la última concentración plasmática cuantificable de amitriptilina y β la constante de eliminación, calculada como la pendiente de la regresión lineal del logaritmo neperiano de la concentración versus tiempo ($\ln(C)$ vs t). El valor de $t_{1/2}$ fue calculado como $\ln(2)/\beta$. Únicamente las concentraciones obtenidas de la vena torácica lateral fueron utilizadas para el cálculo de CL/F , como $dosis/AUC_0^\infty$, y Vd/F como $CL/F/\beta$. Por último, se calculó la relación entre las AUC_0^∞ para vena torácica lateral y la vena yugular (T/Y).

4.5. Análisis Estadístico

La comparación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos de vena yugular y vena torácica lateral fue realizada por medio de prueba T de Student. Previamente se realizó Test de Fisher para verificación de homocedasticidad de varianzas.

Para el análisis de parámetros farmacodinámicos se aplicó ANOVA para medidas repetidas con posttest de Dunnett's comparando cada tiempo con su tiempo basal (T0). La variable estudiada fue el efecto tiempo. Fueron consideradas diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Fueron excluidos los datos farmacocinéticos de uno de los sujetos porque que las concentraciones plasmáticas de amitriptilina obtenidas de vena torácica lateral fueron indetectables para la mayoría de los tiempos de muestreo.

Los valores de AUC_0^∞ obtenidos de vena yugular presentaron diferencia significativa respecto a los obtenidos de vena torácica lateral ($p=0,00016$). Lo mismo ocurrió con C_{max} , presentando un rango de 144,5 a 329,4 ng/mL en vena yugular, comparado a un rango de 10,0 a 77,5 ng/mL en vena torácica lateral (Figura 4).

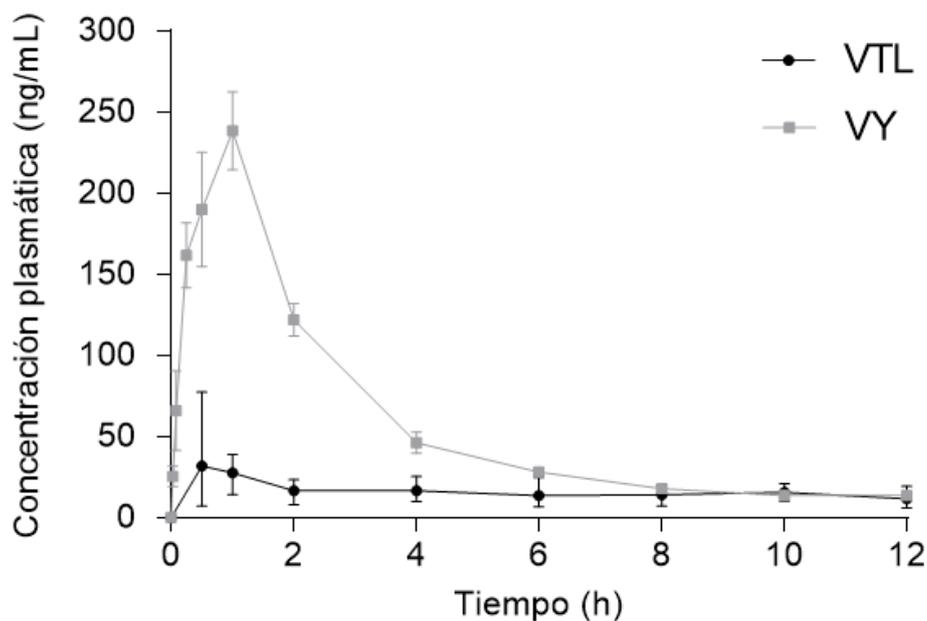


Figura 5. Concentraciones plasmáticas de amitriptilina (media \pm rango) luego de administración de 1mg/kg amitriptilina por vía oral (n=5). VTL: vena torácica lateral, VY: vena yugular.

A pesar de presentar una $t_{1/2}$ prolongada (Tabla 1) no se detectaron concentraciones de amitriptilina en las muestras obtenidas 24 horas luego de la administración del fármaco. La constante de velocidad de eliminación no mostró diferencias significativas entre ambas venas.

El cociente de AUC_0^∞ provenientes de la vena torácica lateral y vena yugular (T/Y) fue de $0,44 \pm 43,0\%$.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos (media y CV) obtenidos de vena torácica lateral (VTL) y vena yugular (VY) de cinco equinos adultos luego de la administración oral de 1 mg/kg de amitriptilina.

Parámetros	Media VTL	CV (%) VTL	Media VY	CV (%) VY
C_{max} (ng/mL)*	30,7	88,7	250,5	29,6
T_{max} (h)	1 - 2	-	0,5 – 1	-
AUC_0^{∞} (ng/mL/h)*	487,4	50,4	1095	12,6
$t_{1/2}$ (h)	17,2	14,8	18,6	14,9
CL/F (L/h/kg)	2,6	56,5	-	-
Vd/F (L/kg)	60,1	41,6	-	-

C_{max} : concentración máxima; T_{max} : tiempo máximo; AUC_0^{∞} : área bajo la curva; $t_{1/2}$: semivida de eliminación; CL/F: clearance aparente; Vd/F: volumen de distribución aparente; CV: coeficiente de variación. * Diferencia significativa.

Entre los datos farmacodinámicos obtenidos, frecuencia cardíaca y motilidad intestinal mostraron diferencias significativas. Se observó una disminución en la frecuencia cardíaca ($p=0,02$) con una duración de 12 horas post-administración (Figura 5a). La motilidad intestinal disminuyó durante las dos primeras horas seguidas a la administración del fármaco ($p=0,01$) (Figura 5b). La frecuencia respiratoria no mostró cambios significativos (Figura 5c).

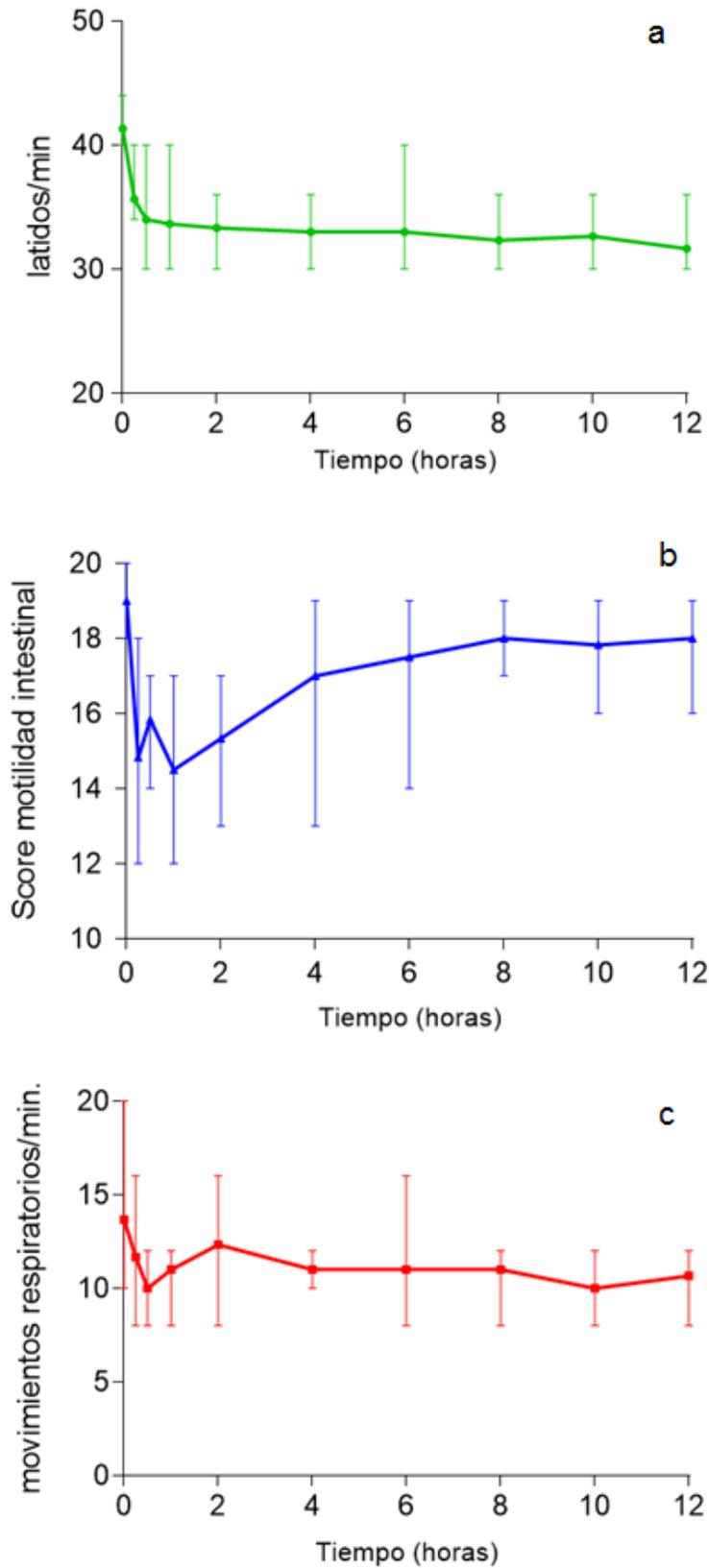


Figura 6. a) Frecuencia cardíaca expresada en latidos por minuto, **b)** score de motilidad intestinal, **c)** frecuencia respiratoria expresada en movimientos respiratorios por minuto; (media \pm rango) luego de administración de 1mg/kg amitriptilina oral en equinos (n=6).

Ningún animal presentó, en los registros electrocardiográficos, alteraciones de forma, amplitud o duración; ni cambios en la polaridad de las ondas. Se observaron bloqueos en la conducción atrio-ventricular (A-V) y arritmias que se detallan en la Tabla 2. La duración del intervalo QT en el registro basal fue de 543 ± 18 ms. En los sucesivos registros, la duración de dicho intervalo no mostró variaciones significativas.

Tabla 2. Tipos de ritmo cardíaco obtenidos a partir de los registros electrocardiográficos en seis equinos, antes y después de la administración de 1mg/kg de amitriptilina por vía oral.

Tiempo (min)	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0			BAV M2	BAV M1	BAV M1	BAV M2
	S normal	S normal	(1/min)	(8/min)	(5/min)	(5/min)
15			BAV M2	BAV M1	BAV M1	BAV M2
	S normal	S normal	(4/min)	(14/min)	(5/min)	(3/min)
30	BAV M2	VPC	BAV M2	BAV M1	BAV M1	BAV M2
	(3/min)	(1/min)	(4/min)	(9/min)	(5/min)	(1/min)
60	BAV M2		BAV M2	BAV M1	BAV M1	
	(1/min)	S normal	(3/min)	(10/min)	(3/min)	S normal
120			BAV M2	BAV M1		
	S normal	S normal	(2/min)	(16/min)	S normal	S normal

C: caballo; S normal: Sinusal normal; BAV M1: Bloqueo Atrio-Ventricular Mobitz tipo 1; BAV M2: Bloqueo Atrio-Ventricular Mobitz tipo 2; VPC: Complejo Ventricular Prematuro.

6. DISCUSIÓN

En este estudio fue utilizada una dosis de 1 mg/kg de acuerdo con el uso empírico que se hace de este fármaco para el tratamiento de dolor crónico en equinos en la región.

Todos los parámetros farmacocinéticos analizados muestran una gran variabilidad interindividual. Se detectaron un elevado clearance y volumen de distribución aparentes. El término aparente hace referencia a la imposibilidad de disociar los parámetros clearance y volumen de distribución del factor de biodisponibilidad (F) al carecer de la administración de una dosis intravenosa de referencia:

$$AUC_0^\infty = \frac{F \cdot Dosis}{CL}$$

Respecto a la significativa diferencia observada entre las concentraciones obtenidas de la vena torácica lateral y yugular podemos afirmar que el protocolo utilizado en el presente estudio permitió resaltar la importancia del sitio de muestreo cuando se busca estudiar la farmacocinética de una droga administrada por vía oral mediante el depósito en la boca del animal, como ya fue descrito por Messenger y col. (2011). Las altas concentraciones detectadas en muestras provenientes de vena yugular sugieren que la absorción transcurre al menos parcialmente por vía sublingual, que vierte el fármaco directamente hacia la circulación sistémica, evidenciando una sobrestimación de la concentración real de amitriptilina circulante.

Hasta el momento, no se cuenta con estudios concluyentes que determinen la ventana terapéutica para el tratamiento del dolor crónico con amitriptilina en ninguna especie, sin embargo existen reportes que sugieren un rango terapéutico de 50–250 ng/mL (Scott y col., 1999). Estos y otros autores suelen reportar un rango como la suma de amitriptilina y nortriptilina, su principal metabolito activo, el cual se desconoce si es producido o no en equinos. Los datos farmacocinéticos obtenidos sugieren que, si en esta especie la farmacocinética de la amitriptilina se comportara de forma lineal, los tratamientos empíricos, como los que se implementan actualmente con ésta droga, alcanzarían concentraciones medias de estado estacionario de aproximadamente 38.5 ng/mL. Dicho valor se ubica por debajo de las concentraciones efectivas reportadas en seres humanos.

A pesar de presentar una semivida de eliminación prolongada no se detectaron concentraciones de amitriptilina a las 24 horas post-administración en ningún animal. Esto podría deberse a la existencia de un sistema flip-flop, el cual refiere a una droga cuya velocidad de absorción es menor que la de eliminación. En estos casos, la persistencia del compuesto en el organismo depende del proceso de absorción y no de eliminación (Yáñez y col., 2011).

Como limitación del proyecto se puede mencionar la falta de una formulación de amitriptilina para administración intravenosa, que permitiría obtener información sobre la biodisponibilidad de la formulación oral utilizada, así como también verificar si se trata efectivamente de un sistema flip-flop.

Si bien la disminución en frecuencia cardíaca y motilidad intestinal resultó estadísticamente significativa, las mismas carecen de relevancia clínica ya que se mantuvieron en todo momento dentro de valores normales para la especie.

Según Witchel y col. (2003) la administración de antidepresivos tricíclicos puede causar arritmia en humanos. La medición del intervalo QT realizada sobre los registros de electrocardiografía, se utiliza frecuentemente para determinar la repolarización ventricular. Las alteraciones en dicho intervalo han mostrado relación con un aumento en la predisposición a presentar arritmias en pacientes humanos (Pedersen y col., 2013). En este estudio no se detectaron variaciones significativas entre los intervalos QT. En los equinos, las bradiarritmias son comúnmente atribuidas al alto tono vagal que presentan estos animales en reposo. Se describen como arritmias fisiológicas, que deberían desaparecer con el ejercicio, debido a un aumento de tono simpático. El bloqueo A-V de 2º grado es la bradiarritmia detectada con mayor frecuencia en los caballos (Menzies-Gow, 2001). En el presente trabajo un sujeto desarrolló bloqueos A-V de 2º grado luego de la administración de amitriptilina, pero cuatro sujetos exhibieron dicha arritmia en estado basal, antes de recibir el medicamento, por lo tanto, los efectos a nivel cardíaco no son concluyentes.

Se consideró la posibilidad de evaluar sedación luego de la administración del fármaco, pero los datos obtenidos no serían válidos ya que el ambiente en el que se

llevó a cabo la fase experimental no se mantuvo constante, pudiendo influir en la evaluación de los sujetos el intermitente movimiento de personas y animales.

7. CONCLUSIÓN

No existe hasta el momento información publicada sobre el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de amitriptilina oral en equinos, por lo que este trabajo constituye una primera aproximación al tema.

La administración de 1 mg/kg de amitriptilina oral en equinos no presentó efectos adversos relacionados a la droga.

Se comprobó la importancia del sitio de muestreo cuando se administran fármacos por vía oral, ya que las concentraciones de amitriptilina halladas en vena yugular sobreestimaron las concentraciones sistémicas, las cuales se corresponden con las obtenidas de la vena torácica lateral.

A pesar de las proyecciones discutidas previamente sobre las posibles concentraciones que serían alcanzadas en estado estacionario, son necesarios estudios que analicen el comportamiento farmacocinético de la amitriptilina en dosis múltiple, que verifiquen las concentraciones alcanzadas tras la instauración de un tratamiento crónico, y ensayos clínicos controlados que determinen la seguridad y eficacia analgésica de esta droga para esta especie.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Attal N (2019). Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. *Revue Neurologique*, 175(1-2): 46-50.
2. Benbouzid M, Gavériaux-Ruff C, Yalcin I, Waltisperger E, Tessier LH, Muller A, Kieffer BL, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2008). Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. *Biological Psychiatry*, 63(6): 633-636.
3. Blumenthal DK, Garrison JC (2012). Farmacodinámica: mecanismos moleculares de acción de los fármacos. En: Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. México, Ed. McGraw-Hill Interamericana, pp 41-71.
4. Borsook D, Kussman BD, George E, Becerra LR, Burke DW (2013). Surgically-induced neuropathic pain (SNPP): understanding the perioperative process. *Annals of Surgery*, 257(3): 403-412.
5. Bryson HM, Wilde MI (1996). Amitriptyline. *Drugs & Aging*, 8(6): 459-476.
6. Buxton I, Benet L (2012). Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. En: Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. México, McGraw-Hill Interamericana, pp 17-39.
7. Cao YQ (2006). Voltage-gated calcium channels and pain. *Pain*, 126(1): 5-9.
8. Cashmore RG, Harcourt-Brown TR, Freeman PM, Jeffery ND, Granger N (2009). Clinical diagnosis and treatment of suspected neuropathic pain in three dogs. *Australian Veterinary Journal*, 87(1-2): 45-50.
9. Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD (2008). Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *The Neuroscientist*, 14(6): 609-625.

10. Council, FAW (2009). Farm animal welfare in Great Britain: Past, present and future. Farm Animal Welfare Council. Disponible en: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/319292/Farm Animal Welfare in Great Britain - Past Present and Future.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/319292/Farm_Animal_Welfare_in_Great_Britain_-_Past_Present_and_Future.pdf) Fecha de consulta: 18/11/19.
11. Crook A (2014). Pain: An Issue of Animal Welfare. En: Egger CM, Love L, Doherty T. Pain management in veterinary practice. Ames, Wiley, pp 3-8.
12. Dharmshaktu P, Tayal V, Kalra BS (2012). Efficacy of antidepressants as analgesics: a review. The Journal of Clinical Pharmacology, 52(1): 6-17.
13. Driessen B, Zarucco L (2014). Treatment of Acute and Chronic Pain in Horses. En: Egger CM, Love L, Doherty T. Pain management in veterinary practice. Ames, Wiley, pp 323- 348.
14. Dyson S (2000). Lameness and poor performance in the sports horse: dressage, show jumping and horse trials (eventing). Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, 46: 308-315.
15. FDA (2018). US FDA Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. New Hampshire, Department of Health and Human Services, 41 p.
16. Ferguson JM (2001). SSRI antidepressant medications: adverse effects and tolerability. Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry, 3(1): 22-27.
17. Flecknell P (2008). Analgesia from a veterinary perspective. British Journal of Anaesthesia, 101(1): 121-124.
18. Flório JC, de Sousa AB (2011). Farmacocinética. En: Spinosa H, Lima S, Bernardi M. Farmacología aplicada a medicina veterinaria. 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp 17-46.
19. Fox SM (2010). Chronic pain in small animal medicine. London, Manson, 256 p.
20. Glerup KB, Lindegaard C (2016). Recognition and quantification of pain in horses: A tutorial review. Equine Veterinary Education, 28(1): 47-57.

21. Gozalo-Marcilla M, Luna SP, Crosignani N, Puoli Filho JN, Possebon FS, Pelligand L, Taylor PM (2017). Sedative and antinociceptive effects of different combinations of detomidine and methadone in standing horses. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 44(5): 1116-1127.
22. Guedes A (2017). Pain management in horses. *Veterinary Clinics of North American: Equine Practice*, 33(1): 181-211.
23. Hausberger M, Roche H, Henry S, Visser EK (2008). A review of the human–horse relationship. *Applied Animal Behaviour Science*, 109(1): 1-24.
24. Hellyer PW, Robertson SA, Fails AD (2007). Pain and Its Management. En: Thurmon JC, Tranquilli WJ, Grimm KA. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4^a ed. Ames, Blackwell, pp 31-57.
25. Ignatowski TA, Sud R, Reynolds JL, Knight PR, Spengler RN (2005). The dissipation of neuropathic pain paradoxically involves the presence of tumor necrosis factor- α (TNF). *Neuropharmacology*, 48(3): 448-460.
26. Jones E, Viñuela-Fernandez I, Eager RA, Delaney A, Anderson H, Patel A, Robertson DC, Allchorne A, Sirinathsinghji EC, Milne EM, MacIntyre N, Shaw DJ, Waran NK, Mayhew J, Fleetwood-Walker SM (2007). Neuropathic changes in equine laminitis pain. *Pain*, 132(3): 321-331.
27. Krystal JH, Sanacora G, Blumberg H, Anand A, Charney DS, Marek G, Epperson CN, Goddard A, Mason GF (2002). Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Molecular Psychiatry*, 7(S1): S71.
28. Kukes VG, Kondratenko SN, Savelyeva MI, Starodubtsev AK, Gneushev ET (2009). Experimental and clinical pharmacokinetics of amitriptyline: comparative analysis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 147(4): 434-437.
29. Linden R, Antunes MV, Ziulkoski AL, Wingert M, Tonello P, Tzvetkov M, Souto AA (2008). Determination of amitriptyline and its main metabolites in human plasma samples using HPLC-DAD: application to the determination of metabolic

ratios after single oral dose of amitriptyline. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(1): 35-41.

30. Love L, Thompson D (2014). Nontraditional Analgesic Agents. En: Egger CM, Love L, Doherty T. Pain management in veterinary practice. Iowa, Wiley, pp 105-114.
31. McCarson KE, Duric V, Reisman SA, Winter M, Enna SJ (2006). GABA_B receptor function and subunit expression in the rat spinal cord as indicators of stress and the antinociceptive response to antidepressants. *Brain Research*, 1068(1): 109-117.
32. McQuay HJ, Carroll D, Glynn CJ (1993). Dose-response for analgesic effect of amitriptyline in chronic pain. *Anaesthesia*, 48(4): 281-285.
33. Menzies-Gow N (2001). ECG interpretation in the horse. *In Practice*, 23(8): 454-459.
34. Messenger KM, Davis JL, LaFevers DH, Barlow BM, Posner LP (2011). Intravenous and sublingual buprenorphine in horses: pharmacokinetics and influence of sampling site. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 38(4): 374-384.
35. Murray RC, Dyson SJ, Tranquille C, Adams V (2006). Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36): 411-416.
36. Muir WW (2005). Pain therapy in horses. *Equine Veterinary Journal*, 37(2): 98-100.
37. Muir WW (2010). Pain in horses: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Veterinary Clinics of North American: Equine Practice*, 26(3): 467-680.
38. Norkus C, Rankin D, KuKanich B (2015). Pharmacokinetics of intravenous and oral amitriptyline and its active metabolite nortriptyline in Greyhound dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42(6): 580-589.

39. Pedersen PJ, Kanters JK, Buhl R, Klaerke DA (2013). Normal electrocardiographic QT interval in race-fit Standardbred horses at rest and its rate dependence during exercise. *Journal of Veterinary Cardiology*, 15(1): 23-31.
40. Pypendop BH (2014). Pharmacokinetic Principles for the Design of Intravenous Infusions. En: Egger CM, Love L, Doherty T. Pain management in veterinary practice. Ames, Wiley, pp 125-129.
41. Rutherford KMD (2002). Assessing pain in animals. *Animal Welfare*, 11(1): 31-53.
42. Sanchez LC, Robertson SA (2014). Pain control in horses: what do we really know? *Equine Veterinary Journal*, 46(4): 517-523.
43. Schaible HG (2012). Mechanisms of chronic pain in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports*, 14(6): 549-556.
44. Scholz J, Woolf CJ (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, 5(11s): 1062.
45. Scott MA, Letrent KJ, Hager KL, Burch JL (1999). Use of transdermal amitriptyline gel in a patient with chronic pain and depression. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 19(2): 236-239.
46. Shen Y, Zhu RH, Liu YW, Xu P (2010). Validated LC–MS (ESI) assay for the simultaneous determination of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in rat plasma: Application to a pharmacokinetic comparison. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3): 735-739.
47. Shilo Y, Pascoe PJ (2014). Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of Pain. En: Egger CM, Love L, Doherty T. Pain management in veterinary practice. Ames, Wiley, pp 9-27.
48. Siddall PJ, Cousins MJ (2004). Persistent pain as a disease entity: implications for clinical management. *Anesthesia & Analgesia*, 99(2): 510-520.
49. Sutayatram S, Soontornvipart K, Glangosol P (2018). Review of the cardiovascular toxicity of amitriptyline treatment for canine neuropathic pain. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 48(4): 515-528.

50. Taylor PM, Pascoe PJ, Mama KR (2002). Diagnosing and treating pain in the horse: where are we today? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18(1): 1-19.
51. Verdu B, Decosterd I, Buclin T, Stiefel F, Berney A (2008). Antidepressants for the treatment of chronic pain. *Drugs*, 68(18): 2611-2632.
52. Verheyen T, Decloedt A, De Clercq D, Deprez P, Sys S, van Loon G (2010). Electrocardiography in horses, part 1: how to make a good recording. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 79(5): 331-336.
53. Visser E, Schug SA (2006). The role of ketamine in pain management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(7): 341-348.
54. Wagner AE (2010). Effects of stress on pain in horses and incorporating pain scales for equine practice. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 26(3): 481-492.
55. Wang GK, Russell C, Wang SY (2004). State-dependent block of voltage-gated Na⁺ channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. *Pain*, 110(1-2): 166-174.
56. Witchel HJ, Hancox JC, Nutt DJ (2003). Psychotropic drugs, cardiac arrhythmia, and sudden death. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 23(1): 58-77.
57. Yáñez JA, Remsberg CM, Sayre CL, Forrest ML, Davies NM (2011). Flip-flop pharmacokinetics—delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. *Therapeutic Delivery*, 2(5): 643-672.
58. Yaron I, Shirazi I, Judovich R, Levartovsky D, Caspi D, Yaron M (1999). Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E₂, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. *Arthritis & Rheumatism*, 42(12): 2561-2568.
59. Zylicz Z (2019). Neuropathic pain: new mechanisms of action of old drugs. *Palliative Medicine in Practice*, 13(3): 123-128.

9. ANEXOS

Anexo 1. Score utilizado para registrar sonidos intestinales auscultando cada uno de los cuadrantes abdominales (dorsal derecho, ventral derecho, dorsal izquierdo, ventral izquierdo) en equinos, durante 1 min.

Score	Criterio
0	Ausencia de sonidos intestinales
1	Sonidos crepitantes bajos con frecuencia $\leq 1/\text{min}$
2	Sonidos crepitantes bajos con frecuencia $> 1/\text{min}$
3	Sonidos prolongados, fuertes, borborignos, frecuencia $1/\text{min}$
4	Sonidos prolongados, fuertes, borborignos, frecuencia 2 a $4/\text{min}$
5	Sonidos prolongados, fuertes, borborignos, frecuencia $> 4/\text{min}$



PROCEDIMIENTO PARA LA DOSIFICACIÓN DE AMITRIPTILINA EN PLASMA DE EQUINO

PA 0002/01

Anexo 2.

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación Amitriptilina en plasma de equino.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Laboratorio de Farmacología Veterinaria y a todos los ensayos de Amitriptilina realizados en el Área de Farmacología.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria.

Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

TEA: Trietilamina

HPLC: Cromatógrafo líquido de alto rendimiento. (High performance liquid chromatograph)

Agua HPLC: Agua destilada filtrada por membrana de 0,45 µm.

AMT HCl: Amitriptilina Clorhidrato

IMP HCl: Imipramina Clorhidrato

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de fase móvil Buffer Fosfato 30 mM pH 3,00 TEA 1%: pesar 35,8g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 20,7 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y llevar a 500 mL con agua



PROCEDIMIENTO PARA LA DOSIFICACIÓN DE AMITRIPTILINA EN PLASMA DE EQUINO

PA 0002/01

destilada. Tomar 60 mL de esta solución y llevarlos a 1 L con agua destilada obteniendo una solución de 30 mM. Agregar 10 mL de TEA y llevar a pH 3,00 con H_3PO_4 3%.

5.2 Preparación de soluciones

5.2.1 Preparación de NaOH 1 M: pesar 10 g de NaOH y llevar a 250 mL con agua destilada.

5.2.2 Solución Madre AMT Calibración en Metanol (SM AMT). Pesar en forma exacta aproximadamente 23 mg de AMT HCl, disolver y llevar a 10,0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 2.032.970 ng/mL.

5.2.3 Solución de Trabajo 1 AMT Calibración en Metanol (ST1 AMT): tomar 50 μL de SM AMT con micro jeringa y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de AMT aproximada a 10.164,85 ng/mL.

5.2.4 Solución de Trabajo 2 AMT Calibración en Metanol (ST2 AMT): tomar 1 mL de ST1 AMT con pipeta aforada y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de AMT aproximada a 1.016,49 ng/mL.

5.2.5 Solución Madre de estándar interno (SM IMP): Pesar en forma exacta aproximadamente 30 mg de IMP HCl, disolver y llevar a 25,0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1.062.000 ng/mL.

5.2.6 Solución de trabajo de estándar interno (ST1 IMP): tomar 20 μL de SM IMP con micro jeringa y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de IMP aproximada a 2.124 ng/mL.

5.1.7 Soluciones Plasmáticas estándar AMT para curva de calibración: a 10,0 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar la cantidad



**PROCEDIMIENTO PARA LA
DOSIFICACIÓN DE AMITRIPTILINA EN
PLASMA DE EQUINO**

PA 0002/01

correspondiente de solución metanólica de calibración indicada en la Tabla 1 utilizando micropipeta. Homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Tabla 1.

Punto	AMT		
	Solución	Volumen (µL)	Concentración (ng/mL)
P1	ST1 AMT	500	484,04
P2	ST1 AMT	250	247,92
P3	ST1 AMT	120	120,53
P4	ST1 AMT	50	50,57
P5	ST2 AMT	250	24,79
P6	ST2 AMT	100	10,06

5.2 Tratamiento de muestras

1. A 1000 µL de muestra plasmática tomada con micropipeta agregar 50 µL de solución de estándar interno utilizando micropipeta.
2. Agregar 1 mL de NaOH 1 M y agitar con vórtex 10 segundos.
3. Agregar 6 mL de mezcla Hexano:isopropanol (90:10) utilizando pipeta graduada y agitar en vórtex durante 3 minutos.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
5. Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase orgánica (superior), transferir a tubo de vidrio de base cónica.
6. Agregar 300 µL de H₃PO₄ 0,1% y agitar en vórtex durante 1 minuto.
7. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
8. Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase acuosa (inferior) y transferir a vial de polipropileno de 250 µL.
9. Inyectar 100 µL en HPLC.



PROCEDIMIENTO PARA LA DOSIFICACIÓN DE AMITRIPTILINA EN PLASMA DE EQUINO

PA 0002/01

5.3 Condiciones cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000.

Columna: C18 (25 cm x 4.6 mm), tamaño de partícula 5 µm.

Detección: 210 nm.

Fase móvil: Buffer fosfato 30 mM pH=3,0, TEA 1% : ACN (65:35).

Flujo: 1 mL/min.

Temperatura de compartimiento de columna: 40 °C.

5.4 Tiempos de retención

IMP ~ 8,3 minutos

AMT ~ 9,6 minutos

5.5 Cálculos

Se determinará la concentración de AMT utilizando como variable independiente la relación de áreas porcentual que presenten respecto de la IMP.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

7. REGISTROS

8. DIAGRAMA DE FLUJO

10. MODIFICACIONES

Versión	Fecha	Modificaciones
01	3/01/2018	Primera edición

11. ANEXOS

No aplicable

	ELABORADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
Cargo	Lucciana Recchi	Silvana Alvariza	Silvana Alvariza
Fecha	3/01/2018		