

*TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA
FACULTAD DE QUÍMICA – UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA*

***PROFUNDIZACIÓN EN EL ENTENDIMIENTO DEL
ROL DE LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA
EN LA TERAPÉUTICA FARMACOLÓGICA
DE LA EPILEPSIA***

Q.F. CECILIA MALDONADO

CODIRECCIÓN:

DRA. MARTA VÁZQUEZ – DR. PIETRO FAGIOLINO

TRIBUNAL EXAMINADOR:

DR. EDUARDO SAVIO QUEVEDO (Uruguay)

DRA. SANDRA OROZCO-SUÁREZ (México)

DR. ALBERTO LAZAROWSKI (Argentina)

MONTEVIDEO, 21 DE NOVIEMBRE DE 2011.

CAPÍTULO 1	5
TRANSPORTADORES DE EFLUJO: MRP2 Y PG-P	5
1.1- INTRODUCCIÓN.....	5
1.2- LOCALIZACIÓN	6
1.2.1- ENTEROCITO	6
1.2.2- SISTEMA HEPATOBILIAR.....	7
1.2.3- RIÑÓN.....	8
1.2.4- OTROS TEJIDOS.....	8
CAPÍTULO 2.....	10
EPILEPSIA REFRACTARIA AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	10
2.1- INTRODUCCIÓN.....	10
2.2- REFRACTARIEDAD.....	10
2.3- MECANISMO DE RESISTENCIA EN EPILEPSIA	12
2.4- TRANSPORTADORES DE EFLUJO EN EPILEPSIA REFRACTARIA	14
2.5- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	15
2.6- OBJETIVO DE LA TESIS	16
CAPÍTULO 3.....	18
MODELO FARMACOCINÉTICO.....	18
3.1- INTRODUCCIÓN.....	18
3.2- PROCESOS INFLUENCIADOS POR TRANSPORTADORES DE EFLUJO.....	19
3.2.1- ABSORCIÓN – PRIMER PASAJE HEPÁTICO – CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA.....	19
3.2.2- DISTRIBUCIÓN.....	22
3.2.3- ELIMINACIÓN	23
3.3- APLICACIÓN DEL MODELO	24
3.3.1- BIODISPONIBILIDAD (F)	25
3.3.2- CLEARANCE (CL).....	26
CAPÍTULO 4.....	29
ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE TRANSPORTADORES DE EFLUJO POR CARBAMACEPINA USANDO DIGOXINA Y CARBAMACEPINA COMO MARCADORES.....	29
4.1- FUNDAMENTO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
4.2- HIPÓTESIS DEL EXPERIMENTO	32
4.3- PROTOCOLO DEL ESTUDIO.....	33
4.3.1- RECOLECCIÓN DE ORINA.....	34
4.3.2- RECOLECCIÓN DE SALIVA PARA DETERMINACIÓN DE DGX	34
4.3.3- RECOLECCIÓN DE SALIVA PARA DETERMINACIÓN DE CBZ.....	34
4.4- MÉTODO DE ANÁLISIS.....	34
4.5- PROCESAMIENTO DE DATOS Y CÁLCULOS FARMACOCINÉTICOS.....	35
4.5.1- DIGOXINA.....	35
4.5.2- CARBAMACEPINA	35
4.6- RESULTADOS	36
4.6.1- DIGOXINA.....	36
4.6.2- CARBAMACEPINA	36
4.7- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	39
CAPÍTULO 5.....	41
ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE LA FARMACOCINÉTICA DE CARBAMACEPINA	41

5.1-	INTRODUCCIÓN.....	41
5.2-	PROTOCOLO DEL ESTUDIO.....	42
5.3-	PROCESAMIENTO DE DATOS Y CÁLCULOS FARMACOCINÉTICOS.....	42
5.4-	RESULTADOS	43
5.5-	DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO 6.....		46
RESULTADOS DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON CARBAMACEPINA		46
6.1-	CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DE CARBAMACEPINA	46
6.2-	SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON CBZ UTILIZANDO SALIVA Y PLASMA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.....	47
6.3-	RESULTADOS	48
6.3.1-	COMPARACIÓN DE LAS DOSIS NORMALIZADAS Y CONCENTRACIONES DE CBZ EN S2 ENTRE SEXOS	48
6.3.2-	COMPARACIÓN DOSIFICACIONES PLASMÁTICAS ENTRE SEXOS	49
6.3.3-	COMPARACIÓN ENTRE HOMBRES Y MUJERES MENORES DE 40 AÑOS.....	50
6.3.4-	COMPARACIÓN ENTRE HOMBRES Y MUJERES MAYORES DE 50 AÑOS.....	51
6.3.5-	COMPARACIÓN S1/S2 ENTRE GÉNEROS.....	52
6.3.6-	COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE EPÓXIDO EN SALIVA ENTRE GÉNEROS.....	52
6.3.7-	RELACIÓN S1/S2 CON S2 DE CBZ.....	53
CAPÍTULO 7.....		57
RESULTADOS DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON FENITOÍNA		57
7.1-	CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DE FENITOÍNA.....	57
7.2-	SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON DFH UTILIZANDO PLASMA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.....	60
7.3-	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
7.3.1-	COMPARACIÓN DE HOMBRES Y MUJERES.....	61
7.3.2-	HOMBRES Y MUJERES MENORES DE 40 AÑOS.....	61
7.3.3-	HOMBRES Y MUJERES MAYORES DE 50 AÑOS.....	62
7.3.4-	DIFERENCIAS ETARIAS INTRA GÉNERO.....	63
7.3.4.1-	MUJERES	63
7.3.4.2-	HOMBRES	64
7.4-	RESPUESTA NO LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE FENITOÍNA A LAS DOSIS DIARIAS RECIBIDAS POR LOS PACIENTES.....	65
7.5-	SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON DFH UTILIZANDO SALIVA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.....	66
7.5.1-	DOSIFICACIONES SALIVALES.....	67
7.5.2-	COMPARACIÓN S1/S2 ENTRE GÉNEROS.....	68
7.5.3-	RELACIÓN S1/S2 VS CONCENTRACIÓN DE DFH.....	68
7.6-	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CONTEXTO DEL CONOCIMIENTO ACTUALMENTE VIGENTE A NIVEL INTERNACIONAL.	70
CAPÍTULO 8.....		72
RESULTADOS DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON ÁCIDO VALPROICO		72
8.1-	CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DEL ÁCIDO VALPROICO.....	72
8.2-	SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON DPA UTILIZANDO SALIVA Y PLASMA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.....	75

8.2.1-	RESULTADOS SALIVA.....	76
8.2.1.1-	COMPARACIÓN DE LA RELACIONES S1/S2 ENTRE HOMBRES Y MUJERES.....	76
8.2.2-	RESULTADOS PLASMA.....	77
8.3-	HIPERAMONIEMIA SECUNDARIA A TRATAMIENTO CRÓNICO O INTOXICACIÓN CON ÁCIDO VALPROICO	81
8.4-	NEUROTOXICIDAD ASOCIADA A AMONÍACO.....	83
8.5-	LAMOTRIGINA.....	84
8.6-	SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN TRATADOS CON LTG UTILIZANDO SALIVA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.	84
CAPÍTULO 9.....		86
SOBREEXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA EN EPILEPSIA REFRACTARIA.....		86
9.1-	CARBAMACEPINA	86
9.2-	FENITOÍNA	88
9.3-	ÁCIDO VALPROICO	90
9.4-	¿POR QUÉ LAS CRISIS CONVULSIVAS DETERMINARÍAN UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE EFLUJO? ¿ES FACTIBLE QUE ESTA SOBREEXPRESIÓN SE GENERALICE A OTROS TEJIDOS DEL ORGANISMO?	91
9.5-	EPILEPSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO	93
9.6-	SOBREEXPRESIÓN SISTÉMICA DEL TRANSPORTE EFLUJO Y ELIMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS.....	96
CAPÍTULO 10.....		97
CONCLUSIONES		97
REFERENCIAS		101
REFERENCIAS FIGURAS		112
ANEXO 1		114
PROTOCOLO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE FENOTIPIFICACIÓN DE TRANSPORTADORES DE MEMBRANA UTILIZANDO DIGOXINA (DGX) Y CARBAMAZEPINA (CBZ)		114
ANEXO 2		128
REVALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBAMACEPINA – CARBAMACEPINA EPOXIDO EN SALIVA		128
ANEXO 3		134
VALIDACIÓN DE TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAMOTRIGINA EN PLASMA Y SALIVA		134

CAPÍTULO 1

Transportadores de eflujo: MRP2 y Pg-p

1.1- INTRODUCCIÓN

El transporte de moléculas a través de la membrana celular es un aspecto crítico en el funcionamiento de todos los organismos vivos. En general el influjo de sustancias implica la entrada de nutrientes, mientras que el eflujo comprende sustancias de desecho y/o tóxicos. Diversos son los fármacos que utilizan estos mismos mecanismos para absorberse y eliminarse del organismo.

Los transportadores de membrana, objetivo de estudio de esta tesis, pertenecen a un subgrupo de transportadores ATP dependientes, los que han adquirido gran relevancia en estos últimos años luego de vislumbrarse el posible rol que juegan en la absorción y disposición de diversos fármacos y en la fisiopatología de distintas enfermedades.

Es por esto, que se han realizado denodados esfuerzos para caracterizarlos desde el punto de vista estructural, locativo y del tipo de sustrato con el cual son capaces de interaccionar.

La presencia de transportadores como mecanismo de defensa no es rara en la naturaleza; las bacterias han desarrollado varios tipos de proteínas capaces de eliminar antibióticos y de esta manera impedir su acción.

En humanos estos transportadores fueron descubiertos en 1970 en células tumorales que presentaban refractariedad al tratamiento antineoplásico por concentraciones baja de droga a nivel intracelular; de esta manera les fue asignada su primera función como bombas de eflujo, pues eran responsables de la extrusión del fármaco de su sitio de acción a nivel intracelular y por lo tanto de la falla terapéutica del tratamiento (Mickisch, 1994; Sharom, 2008).

Estudios posteriores reconocieron su presencia en diversos tejidos en condiciones no patológicas y si bien en un principio se les asignó un rol principalmente de defensa, en el presente, se sabe que están involucrados también en la absorción de sustancias esenciales.

Los transportadores ABC (ATP Binding Cassette, mecanismo Ca^{2+} dependiente), de los cuales su ejemplo más estudiado es la P-glicoproteína (P-gp), son una superfamilia de proteínas de membrana que incluyen además a los transportadores Bile Salt Export Pump (BSEP), Multidrug Resistance Protein (MRP) y Breast Cancer Resistance Protein (BCRP).

En el transcurso de esta tesis dos de estos transportadores fueron estudiados en mayor profundidad: MRP2 y P-gp, esto se desprende de las drogas involucradas en la investigación y de las patologías a las cuales se asocia su sobreexpresión.

En un organismo sano se reconoce la presencia de estos dos transportadores en diversos tejidos y órganos, en los cuales se encuentran generalmente asociados a sistemas enzimáticos y cumplen una función de defensa influyendo la biodisponibilidad y eliminación de distintas drogas. Su influencia sobre la biodisponibilidad ha sido tan reconocida en los últimos años que la FDA dio lugar a la inclusión de estos transportadores para la clasificación de drogas en THE BIOPHARMACEUTICS DRUG DISPOSITION CLASSIFICATION SYSTEM (BDDCS) (Shugarts & Benet, 2009)

A continuación pasamos a detallar algunos de los órganos más relevantes donde estos transportadores se encuentran presentes.

1.2- LOCALIZACIÓN

1.2.1- ENTEROCITO

En el intestino, P-gp y MRP2 se expresan en la superficie apical de los enterocitos, donde se sabe que en muchos casos trabajan de forma concertada con las enzimas presentes a nivel intracelular, actuando como una especie de "barricada" que hace que la concentración de fármaco no alcance niveles de saturación para la enzima y que por lo tanto la misma trabaje más eficientemente. Para el caso de drogas que son sustrato de transportadores pero no son metabolizadas en el intestino la presencia de transportadores no influenciará necesariamente la cantidad de fármaco absorbida, pero si muy probablemente la velocidad de absorción del mismo.

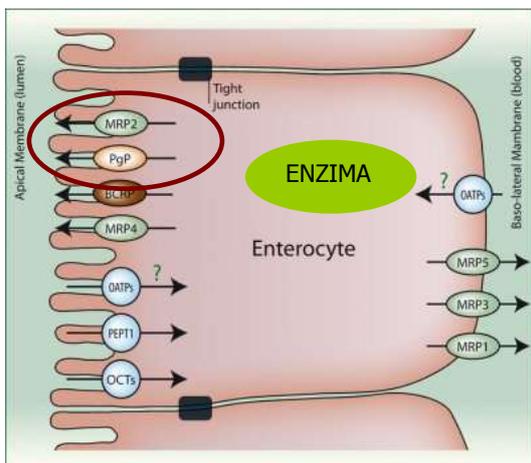


Figura 1.1 - Se muestra la expresión de P-gp y MRP2 en la membrana apical del enterocito y su potencial coacción con sistemas enzimáticos presentes a nivel intracelular.

1.2.2- SISTEMA HEPATOBILIAR

En el sistema hepatobiliar, estos transportadores se localizan en los hepatocitos frente a los canalículos biliares y en la superficie apical de las células epiteliales de los pequeños canalículos biliares. De esta forma, una vez que un fármaco ha alcanzado el hepatocito, si existen en él enzimas responsables de su metabolización, puede ser eliminado por acción de las mismas, o por ser sustrato de estas bombas de eflujo puede ser transportado a través de la bilis, hasta el lumen intestinal. Esto hace que el fármaco pueda encontrar su camino nuevamente hacia la circulación sistémica, repitiéndose los procesos descritos en el enterocito.

Especialmente en hepatocitos se ha reconocido el trabajo coordinado existente entre MRP2 y las enzimas encargadas de la conjugación con glucurónido, glutatión o sulfato, y cómo el trabajo de este transportador condiciona la composición del líquido biliar.

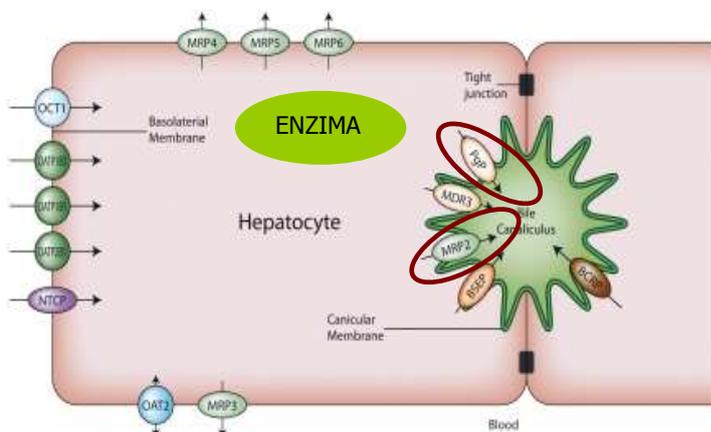


Figura 1.2 - Se muestra la expresión de P-gp y MRP2 en la membrana apical del hepatocito – que facilita salida hacia bilis.

1.2.3- RIÑÓN

A nivel renal, las dos bombas en estudio se encuentran en la superficie apical de las células epiteliales de los túbulos proximales y cumplen una función importante en la excreción urinaria de drogas y toxinas.

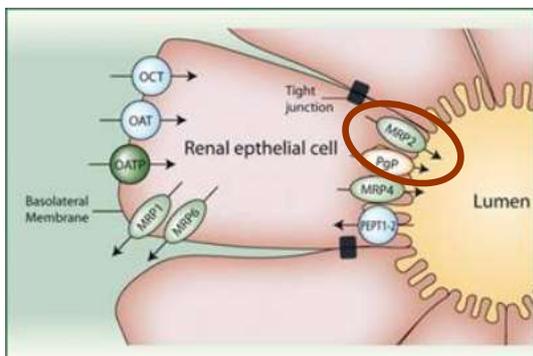


Figura 1.3 - Se muestra la expresión de P-gp y MRP2 en la membrana luminal de las células tubulares renales.

1.2.4- OTROS TEJIDOS

Contribuyendo en menor porcentaje a la eliminación, ha sido referenciado también la presencia de dichos transportadores a nivel de las glándulas salivales, donde se ha detectado la presencia de P-gp y MRP2, entre otros (Nooter et al, 1195; Uematsu et al, 2001).

En el cerebro sano estas bombas se encuentran en la superficie luminal de las células de los capilares cerebrales donde contribuyen a la función de la barrera hematoencefálica y en los plexos coroideos donde contribuyen a la formación de líquido cefalorraquídeo (Loscher & Potschka, 2005).

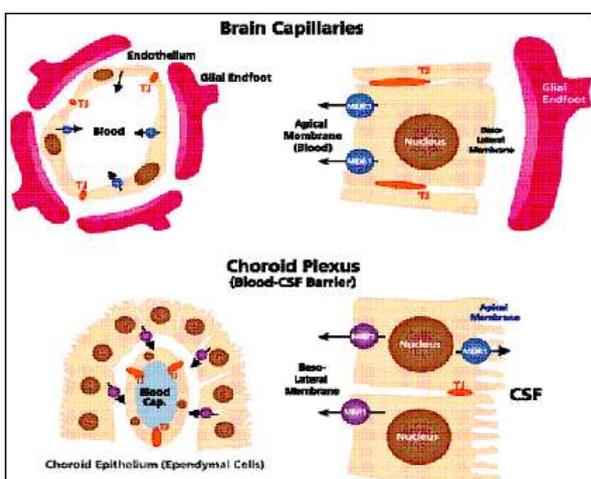


Figura 1.4 - Se muestra la expresión de P-gp en la membrana apical de las células de la barrera hematoencefálica y en los plexos coroideos.

El descubrimiento de que la sobreexpresión de P-gp determina la resistencia a quimioterapia en cáncer llevó a la creencia que el rol de este transportador era la protección de células tumorales. El posterior descubrimiento de su presencia en diferentes órganos en condiciones basales, llevó a la búsqueda de sustratos endógenos para estas proteínas.

P-gp ha sido caracterizada recientemente como transportador de la sustancia β -amiloide y cambios en su expresión han sido relacionados con la enfermedad de Alzheimer (Cirrito et al, 2005).

MRP2 es ampliamente reconocido como transportador de conjugados glucurónidos, sulfatos y de glutatión. Dentro de los más relevantes para compuestos endógenos se encuentra la bilirrubina, la misma se conjuga con glucurónico en el hepatocito y es excretada vía bilis para su eliminación por heces. Tal es el rol de MRP2 que la deficiencia en su expresión determina hiperbilirrubinemia, la cual se conoce como el síndrome de Dubin-Johnson (Jedlitschky et al, 2006).

El presente trabajo de tesis se enfoca en el estudio de un grupo de drogas anticonvulsivantes que son sustrato de dichos transportadores y cómo sus parámetros farmacocinéticos se ven influenciados por estas bombas de eflujo, el tratamiento farmacológico, la patología epiléptica que presenta el paciente, su sexo y edad.

CAPÍTULO 2

Epilepsia Refractaria al Tratamiento Farmacológico

2.1- INTRODUCCIÓN

La epilepsia es la alteración neurológica más frecuente en la población general después de la cefalea. Se calcula que aproximadamente 50 millones de personas en el mundo padecen epilepsia, de los cuales el 75% se encuentran en los países en vía de desarrollo (Meinardi et al, 2001). La prevalencia en estas naciones se ha calculado entre 15-20 por 1.000 habitantes, comparada con los países desarrollados, donde es de 4-7 por 1.000 habitantes (Shorvon & Farmer, 1988). Una reciente revisión analizó los estudios de prevalencia de epilepsia en los Estados de América Latina, encontrando una media de 17,8 por 1.000 habitantes (Reyes & Santiago, 2010). En Uruguay la prevalencia es de 9,5 – 11,5 por 1000 habitantes (Scaramelli et al, 1995).

2.2- REFRACTARIEDAD

En los últimos 20 años el tratamiento de los pacientes con epilepsia ha evolucionado considerablemente. El desarrollo de fármacos antiepilépticos nuevos y más seguros, y el uso cada vez más frecuente de la cirugía como medio terapéutico o paliativo, representan los mayores avances en este campo. Sin embargo, la epilepsia refractaria o farmacorresistente es una condición no tan infrecuente en la práctica neurológica cotidiana. Se considera que aproximadamente el 30% de pacientes con epilepsia no responde al tratamiento médico (Loscher & Potscka, 2002). En general, cuando se inicia un tratamiento antiepiléptico, independientemente del tipo de crisis que presente el paciente, la probabilidad de estar libre de convulsiones durante el primer año es de alrededor del 60-70%. En el caso de no obtener

un control total de la enfermedad, la adición de un nuevo medicamento aumenta un 10% más la probabilidad de alcanzar un estado libre de crisis. Si a pesar de esto el paciente persiste con crisis epilépticas, el porcentaje de mejoría que adiciona el uso de un tercer anticonvulsivante no va más allá del 5% (Kwan & Brodie, 2000). Ello ha permitido concluir que uno de los factores predictivos para desarrollar epilepsia refractaria es la inadecuada respuesta inicial a los fármacos y la frecuencia de convulsiones antes del tratamiento.

Actualmente existen más de 20 medicamentos anticonvulsivantes autorizados para el uso clínico. En general los anticonvulsivantes de primera línea comparten un porcentaje de respuesta similar y la diferencia más importante entre ellos, es la aparición de efectos adversos. Sin embargo, esto ha demostrado ser dependiente del tiempo en el que se ha realizado vigilancia sanitaria en el escenario clínico, es decir, cuanto más tiempo hace que un fármaco ha estado en el mercado, más se conocen sus efectos adversos.

La definición del término "epilepsia refractaria" o "epilepsia farmacorresistente" continúa siendo motivo de extensa controversia y ha sido ampliamente discutida por la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) (Kwan et al, 2009; Kwan & Brodie, 2000). Para que un paciente se considere refractario a la medicación, deben haberse utilizado medicamentos con indicación demostrada para el tipo de epilepsia presentada por el paciente, se deben haber ensayado las dosis terapéuticas aconsejadas y no se debe haber logrado control de crisis (Figura 2.1). Para evaluar la capacidad de los fármacos para controlar de las convulsiones, se debe medir el período (el tiempo máximo) que logra alcanzar un paciente sin presentar episodios convulsivos una vez iniciado el tratamiento. Éste debe ser por lo menos tres veces el periodo interictal promedio de dicho paciente (previo al tratamiento); Si por ejemplo dicho intervalo interictal pretratamiento fuese menor a cuatro meses, una vez iniciada la terapéutica, el paciente deberá permanecer sin crisis durante doce meses, para poder considerarse que ha alcanzado un estado libre de crisis.

De esta manera, se considera refractario a terapia medicamentosa aquel paciente que haya utilizado al menos dos anticonvulsivantes con indicación y dosis adecuadas en monoterapia o politerapia sin alcanzar un estado libre de crisis. La aplicación clara de estas definiciones y conceptos en la práctica clínica permitirán seleccionar a los candidatos a terapias no farmacológicas.

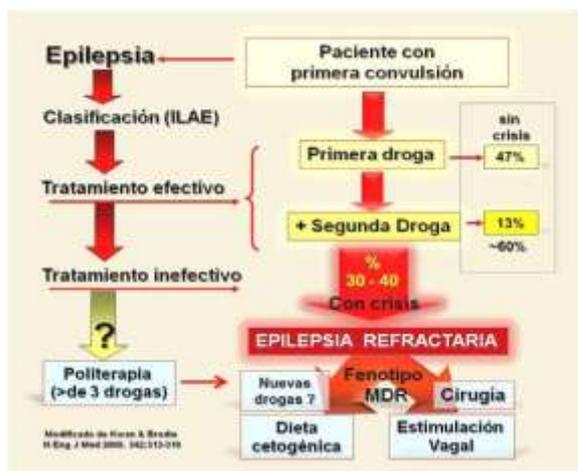


Figura 2.1 – Algoritmo para clasificación de pacientes epilépticos refractarios y posibles estrategias para su tratamiento.

En un paciente que ha recibido tres medicamentos de primera línea y no presenta un adecuado control de crisis, la posibilidad de éxito de la terapia médica es mínima y requiere considerarse una opción quirúrgica paliativa o curativa (Duncan, 2007; Marson et al, 2009). El periodo de tiempo establecido con el fin de definir el estado de refractariedad es arbitrario y representa el tiempo necesario para instaurar y evaluar la respuesta a varios fármacos de primera línea y terapias combinadas (Berg, 2007; 2009); de manera general se ha estimado en alrededor de dos años, pero depende claramente del tipo de epilepsia, la causa subyacente, las frecuencias de crisis y las condiciones descritas (Walker & Fish, 2009). Es decir, la refractariedad temprana al tratamiento farmacológico es un factor pronóstico a largo plazo para predecir la posibilidad de estar libre de crisis. Aquellos pacientes que rápidamente se muestran refractarios al tratamiento con múltiples fármacos posiblemente no hallen mayores beneficios al seguir adicionando medicamentos anticonvulsivantes. Por otra parte, la adición de múltiples medicamentos aumenta la posibilidad de interacciones farmacológicas y efectos adversos los cuales en algunos casos tienen consecuencias significativamente negativas en la calidad de vida.

2.3- MECANISMO DE RESISTENCIA EN EPILEPSIA

Para que se pueda considerar que un paciente es refractario a la medicación, se debe primero comprobar que no existen factores tecnológicos que limiten la entrada del fármaco a nivel sistémico (por ej. liberación desde la forma farmacéutica), adherencia a la posología por parte del paciente, o interacciones medicamentosas.

Una vez que esto ha sido descartado, la entrada del fármaco al SNC, donde se encuentra su sitio de acción, o la interacción del mismo con su blanco bioquímico serán los mecanismos responsables del éxito o fracaso de la terapia.

En base a este razonamiento es que se han desarrollado dos hipótesis para dar explicación a la epilepsia farmacorresistente:

- Hipótesis del Blanco Modificado

Los canales iónicos de Na^+ y el receptor GABA_A son el blanco de acción de varios anticonvulsivantes de primera línea (fenitoína, carbamacepina, lamotrigina), y en su población es donde se han encontrado alteraciones más significativas. Las modificaciones encontradas van desde la disminución en la expresión de canales a modificaciones estructurales en las proteínas que determinan pérdida en la sensibilidad a los anticonvulsivantes (Gambardella & Marini, 2009).

- Hipótesis de los transportadores

El fenómeno clínico de "Múltiple Resistencia" al tratamiento farmacológico (Multidrug Resistance), denominado fenotipo MDR, originalmente descrito en cáncer, es debido a la presencia excesiva de transportadores de membrana capaces de expulsar diferentes fármacos antineoplásicos (Gottesman & Pastan, 1993; Ling, 1989).

La posibilidad de acceder a tejido resectado de focos epileptógenos de pacientes que sufrieron cirugía de epilepsia permitió dilucidar que en muchos de los casos los pacientes presentaban aumento en la expresión de transportadores de membrana (Lazarowski et al, 1997; Tishler et al, 1995). Por lo tanto, la falla terapéutica deriva en estos casos de la imposibilidad del fármaco de acceder al sitio de acción en concentraciones efectivas.

Esta última hipótesis es la que se aborda en este trabajo de tesis.

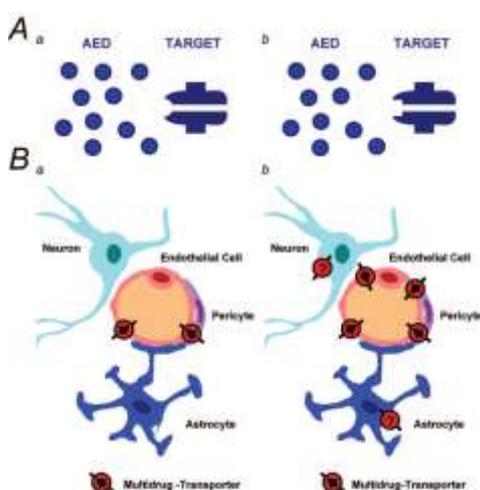


Figura 2.2 – La figura muestra las dos hipótesis que dan explicación a la epilepsia refractaria:

A - Hipótesis del objetivo modificado

B - Hipótesis de los transportadores de eflujo.

2.4- TRANSPORTADORES DE EFLUJO EN EPILEPSIA REFRACTARIA

Las primeras evidencias de la sobre-expresión de los transportadores ABC, particularmente P-gp, en el cerebro de pacientes con epilepsia refractaria, fue inicialmente documentada en casos de pacientes adultos por Tishler et al (1995).

Posteriormente varios grupos de investigación informaron de la sobre-expresión de P-gp en células endoteliales vasculares de la BHE, generando un incremento en la dificultad de ingreso de los fármacos anticonvulsivantes al SNC (Figura 2.3), pero también se observó su expresión en astrocitos y neuronas (Aronica et al, 2003; D'Giano et al, 1997; Volk et al, 2004). En estos reportes no se logró determinar si dicha sobreexpresión era una característica constitutiva de cada uno de los síndromes epilépticos refractarios analizados, o bien era secundaria al estrés convulsivo persistente, o el resultado de una inducción relacionada al tratamiento farmacológico crónico, o bien, la combinación de todas estas circunstancias.

Una de las condiciones clínicas que definen un paciente con epilepsia refractaria es el hecho que a pesar de recibir el fármaco más adecuado para su cuadro epiléptico, a las dosis recomendadas, y con documentados niveles plasmáticos dentro del denominado "rango terapéutico" (RT), el paciente no logra el control de las crisis convulsivas. Sin embargo, en algunos pacientes con epilepsia refractaria y en politerapia, suele ocurrir que al menos uno de esos fármacos, muestra un perfil de niveles plasmáticos francamente por debajo de su RT, o bien en el límite inferior del mismo, aún cuando esté recibiendo dosis altas del mismo. Este hecho ha sido poco estudiado, y como se mencionó anteriormente podría atribuirse a varias razones como la falta de cumplimiento de la terapéutica prescrita, mala calidad de los medicamentos, fallas técnicas en los procedimientos del laboratorio, o "interacciones entre fármacos" que se aceptan empíricamente.

No obstante, algunos grupos de investigación proponen que esto se debe también a sobreexpresión de transportadores a nivel sistémico. Lazarowski et al, (2004) en un estudio con ^{99m}Tc -hexakis-2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc -MIBI, compuesto radioactivo no metabolizable utilizado para estudios de perfusión cardiaca, substrato de P-gp), mediante una prueba centellográfica funcional, demostraron que la cinética de excreción hepatobiliar del ^{99m}Tc -MIBI, estudiada en 8 pacientes con epilepsia refractaria con ELT con esclerosis mesial temporal, estaba significativamente acelerada comparada a controles normales y con pacientes epilépticos respondedores. Es más, de dicho grupo refractario, en los cinco casos que fueron tratados quirúrgicamente, se detectó alta expresión cerebral de P-gp en BHE, astrocitos y neuronas del área cerebral epiléptógena (Vázquez et al, 2004).

La abundante expresión de P-gp y MRPs, en intestino y otros órganos excretores, sugiere una fuerte relación entre la baja biodisponibilidad de los fármacos y la “sobreexpresión:hiperactividad” de estos transportadores (Lazarowski & Czornyj, 2010).

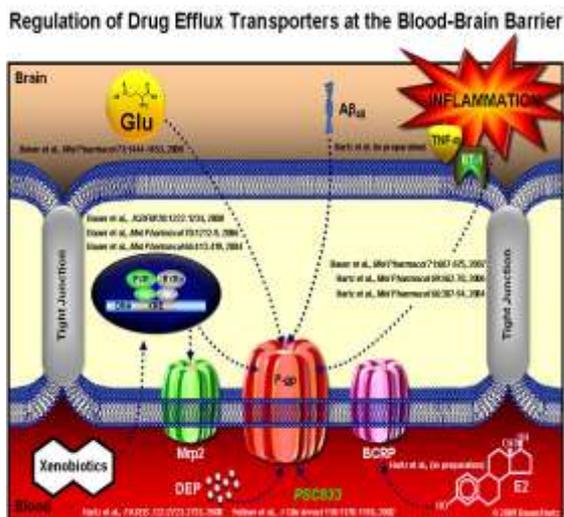


Figura 2.3 – Regulación de los transportadores en la barrera hematoencefálica. Distintos agentes biológicos, hormonas, oncogenes o factores de transcripción activados durante la apoptosis, el estrés, la inflamación, o la hipoxia, están involucrados en la inducción de sobreexpresión y/o funcionalidad de transportadores en los tejidos que normalmente los expresan, incrementando su funcionalidad, particularmente en los órganos de barrera y excreción. También ha sido demostrado que la capacidad de inducción puede ejercerse sobre tejidos o células que previamente no la expresaban como en el caso de neuronas y cardiomiocitos.

Fármacos como fenitoina (DFH), fenobarbital (FB), carbamacepina (CBZ), ácido valproico (DPA), lamotrigina (LTG), gabapentina y topiramato se reconocen hoy día como sustratos de estas bombas de eflujo y varios de ellos han sido reportados como inductores de la actividad y/o expresión de estos transportadores. Por lo tanto, al momento de evaluar la farmacocinética de estas drogas se debe tener en cuenta la doble contribución que la patología y el propio fármaco pueden tener sobre el tratamiento

Un diagnóstico oportuno de dicho tipo de epilepsias permitiría una reducción en el tiempo de búsqueda de opciones terapéuticas o incluso, como ya ha sido postulado, el agregado de bloqueantes de los canales de Ca^{2+} como inhibidores de la actividad de estas bombas.

2.5- ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En el año 2007, la Unidad de Monitoreo de Medicamentos del Hospital de Clínicas llevó a cabo un estudio retrospectivo (Maldonado et al, 2008) de todos los pacientes pediátricos cuya terapia crónica con carbamacepina (CBZ) y/o ácido valproico (DPA) había sido seguida a través de la concentración salival de dichos fármacos. Las muestras fueron extraídas a predosis matinal y un total de 103 pacientes presentaron concentraciones salivales por encima del límite de cuantificación (31 medicados con DPA en monoterapia, 56 medicados con CBZ en monoterapia y 16 con terapia DPA y CBZ combinada).

Como se establece que la respuesta farmacocinética depende en parte, del control de la patología, los pacientes fueron divididos según el número de crisis en:

Grupo 1 - pacientes sin crisis y pacientes con crisis mensuales.

Grupo 2 - pacientes con crisis semanales y pacientes con crisis diarias.

Los resultados mostraron para CBZ que al igual que ha sido referenciado para plasma, la evolución de la concentración salival de CBZ no sigue una cinética lineal con la dosis, lo cual ha sido en general explicado por la autoinducción que el fármaco ejerce sobre las enzimas que lo metabolizan a nivel presistémico y sistémico. Se discutirá más adelante otra explicación a este tipo de cinética.

Los pacientes del grupo 2 en monoterapia tenían dosis 31% más altas de CBZ, sin embargo las medias de concentraciones obtenidas no difirieron significativamente. De acuerdo a estos resultados, se planteó que los pacientes con crisis más frecuentes presentan un clearance aumentado. Sabiendo que CBZ es inductora de su propio metabolismo es posible que este efecto enmascare los resultados. Como ambos grupos presentaban edades similares, tales diferencias en clearance parecen no estar relacionadas con la edad.

Los resultados para DPA mostraron que la concentración del fármaco en saliva muestra una relación lineal con la dosis. Los pacientes cuyas crisis no pudieron ser controladas con un aumento de dosis fueron declarados refractarios y en estos casos pudo verse que la concentración salival se incrementó en mayor proporción que la dosis.

Cuando los pacientes se agruparon según su control de crisis en: grupo 1 y grupo 2 y se realizaron las medias de las concentraciones salivales para cada grupo se observó que los pacientes con mal control de crisis presentaban concentraciones significativamente mayores y no pasibles de ser explicadas únicamente por un aumento en la dosis. Se postuló que esto se debía una mayor excreción de la droga a nivel de las glándulas salivales mediada por su transportador MRP2 (Uematsu et al., 2001).

Este trabajo basaba sus conclusiones en una única muestra salival, lo cual cuenta con la desventaja de ser producto de varios procesos, es por esto que se diseña un nuevo protocolo de muestreo que utiliza dos fracciones S1 y S2.

2.6- OBJETIVO DE LA TESIS

El objetivo de esta tesis es elucidar el rol que los transportadores de membrana ejercen en la terapéutica farmacológica, entendiéndose por esto la respuesta farmacocinética y farmacodinámica a un tratamiento, mediante el desarrollo de una técnica que permita fenotipificar a pacientes epilépticos.

La estrategia de trabajo busca estudiar la expresión de transportadores en epilepsia sin la necesidad de acceder al tejido directamente implicado en la patología. La investigación se

aboca entonces a buscar un subrogante de la expresión / actividad de transportadores en sitios tan poco accesibles como la barrera hematoencefálica.

Como existen indicios de que la expresión de bombas de eflujo no se circunscribe sólo a un tejido, sino que puede generalizarse a otros órganos, sea por la genética natural del individuo, por sobreexpresión o subexpresión causada por la propia enfermedad, o por inducción o inhibición farmacológica de dicha expresión y existen, además, referencias de la presencia de dichos transportadores en las glándulas salivales, es que se elige realizar dosificaciones de fármacos en saliva y crear un protocolo de recolección de muestra que facilite la detección en la variación del número-actividad de transportadores. Además, desde un punto de vista asistencial, la saliva provee de una muestra adecuada por ser un fluido de fácil acceso lo que permite fenotipificar a los pacientes de forma sencilla.

Como ha sido propuesto que la inducción en la expresión de transportadores, además de atribuible a la patología, puede ser causada por algunos de los fármacos anticonvulsivantes dosificados; el entendimiento de la inducción no-patología-dependiente se hace pues necesario, y con este fin es que fue diseñado un protocolo para voluntarios sanos (en el marco de un proyecto CSIC), de manera de poder interpretar el cociente de concentraciones del agente marcador del transporte entre dos muestras extraídas en condiciones normalizadas.

CAPÍTULO 3

Modelo farmacocinético

3.1- INTRODUCCIÓN

El conocimiento de que la actividad y expresión de transportadores en diversos tejidos del organismo puede influenciar la absorción y disposición de varios fármacos ha traído aparejado la construcción de nuevos modelos farmacocinéticos que los contemplen.

Si bien el modelo farmacocinético presentado en este capítulo es producto de las investigaciones realizadas durante este trabajo de tesis, su inclusión previa a los resultados pretende facilitar al lector el entendimiento de las discusiones y conclusiones de capítulos posteriores.

El siguiente modelo farmacocinético fisiológico presenta los procesos que un fármaco que es administrado por vía oral puede sufrir durante su entrada, distribución y eliminación del organismo.

Si bien las bombas de eflujo por si solas pueden condicionar parámetros farmacocinéticos de drogas con escasa metabolización, en este trabajo de tesis la mayoría de los fármacos estudiados (anticonvulsivantes) presentan alto porcentaje de metabolismo y por lo tanto el trabajo conjunto entre las enzimas que componen el sistema del Citocromo P450 así como los transportadores de eflujo expresados en el intestino e hígado, juegan un rol importante en la biodisponibilidad y clearance de estas drogas (Shugarts & Benet, 2009).

En este capítulo se abordan estos procesos de forma sencilla y se resaltan aquellos en los cuales las bombas de eflujo desempeñan un rol preponderante. Con el propósito de facilitar el entendimiento de los diferentes procesos los mismos se describen secuencialmente, si bien en muchos casos éstos se dan en forma simultánea.

3.2- PROCESOS INFLUENCIADOS POR TRANSPORTADORES DE EFLUJO

3.2.1- ABSORCIÓN – PRIMER PASAJE HEPÁTICO – CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA

Cuando un fármaco es administrado en forma de comprimido, por ejemplo, por vía oral puede ser absorbido en distintas porciones del tracto gastrointestinal, pero primero deberá disolverse lo cual está condicionado por diversos factores, entre ellos la liberación del principio activo desde la forma farmacéutica, la hidrofilia y el pKa del fármaco, así como el pH de la zona por donde transita.

Una vez en solución, el fármaco puede entrar al enterocito, proceso que puede darse por múltiples mecanismos: difusión pasiva, transporte mediado por proteínas, etc. Una vez alcanzado el interior de éste, el fármaco puede sufrir varios procesos:

- Metabolismo presistémico. Se refiere a la pérdida de parte de la masa del fármaco por metabolismo a cargo de enzimas enterocíticas, aunque en algunos casos permite la formación de metabolitos activos que pueden absorberse posteriormente. Vale la pena aclarar que no todos los fármacos son metabolizados en una proporción significativa a este nivel.

Los procesos enzimáticos siguen en muchos casos cinéticas no lineales, generalmente comparadas con la cinética de Michaelis-Menten. Este proceso presenta una velocidad máxima de metabolización, que está determinada por características intrínsecas a la proteína y la interacción enzima-sustrato, es decir, hay una velocidad de metabolización que no puede ser sobrepasada aún cuando más fármaco esté disponible. La concentración de fármaco a nivel del enterocito es alta pues proviene directamente de la liberación de la forma farmacéutica por lo que es de suponer que muchas de las enzimas allí presentes trabajan a velocidad máxima pues se encuentran a concentración de saturación. En este momento la cinética se aproxima a un orden cero, es decir independiente de la concentración intracelular.

Excepto para una cinética de orden cero, la velocidad de metabolización enterocito al medio interno puede representarse como:

$$\frac{dE}{dt} = CL \cdot C \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

donde:

CL- clearance

C – concentración.

En el caso de la cinética Michaelis-Menten el CL puede escribirse como:

$$CL = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m + C} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde:

$V_{m\acute{a}x}$ y K_m son los parámetros de Michaelis-Menten.

Como se observa de la ecuación a mayor concentración de sustrato el CL disminuye y entonces la velocidad de eliminación tiende a ser $V_{m\acute{a}x}$.

- Extrusión a la luz intestinal debido a la existencia de transportadores de eflujo. Esto puede determinar una mejora en la eficiencia del metabolismo a nivel presistémico, un retraso en la absorción o la pérdida definitiva de fármaco en las heces (Shugarts & Benet, 2009).
- Ingreso a la circulación portal. El fármaco puede atravesar la membrana basal del enterocito y entrar a circulación portal, para llegar a hígado, siguiendo generalmente una cinética de primer orden.

$$vel.salida \equiv k \cdot C \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

siendo:

vel salida – velocidad de salida desde el enterocito al hígado

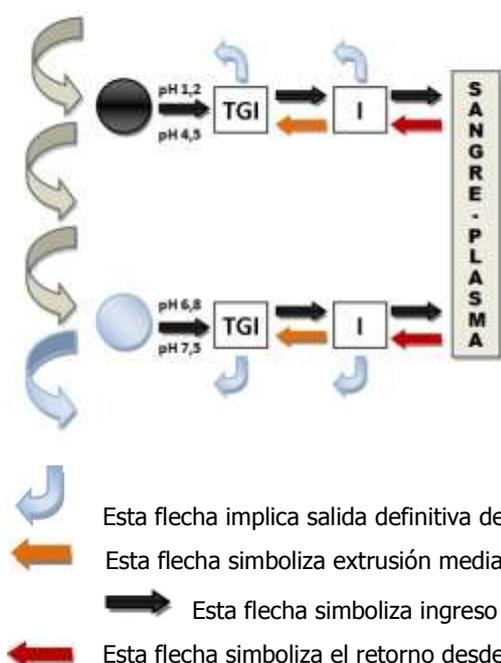


Figura 3.1 – Representación compartimental del proceso de absorción. TGI - luz del tracto gastrointestinal, I - célula intestinal (enterocito). El círculo negro representa un comprimido en su pasaje por la luz del tracto gastrointestinal. La pérdida de color significa que la forma farmacéutica libera al fármaco.

Esta flecha implica salida definitiva del organismo

Esta flecha simboliza extrusión mediada por transportadores

Esta flecha simboliza ingreso desde el lumen intestinal a enterocito y a la circulación portal.

Esta flecha simboliza el retorno desde circulación sistémica a enterocito.

Los tres mecanismos mencionados anteriormente ocurren de forma simultánea; los dos primeros de forma concertada se contraponen con el último, o sea con el pasaje a la circulación portal del fármaco administrado.

Debido a que la liberación de fármaco desde la forma farmacéutica expone al enterocito a altas concentraciones del mismo, la batería enzimática se encuentra trabajando a velocidad máxima, por lo tanto la pérdida presistémica ocurre en forma prácticamente independiente de la concentración intracelular. En estas condiciones la velocidad de pasaje a través de la membrana basal, que sí depende de la concentración, es significativamente mayor.

En el caso de los fármacos para los cuales la actividad de los transportadores de eflujo es relevante, la disminución de la concentración intracelular que provocan determina una disminución significativa de la velocidad de entrada del mismo a circulación portal y una mayor eficiencia de las enzimas metabólicas para eliminar el mismo, pues no se encuentran trabajando a nivel de saturación.

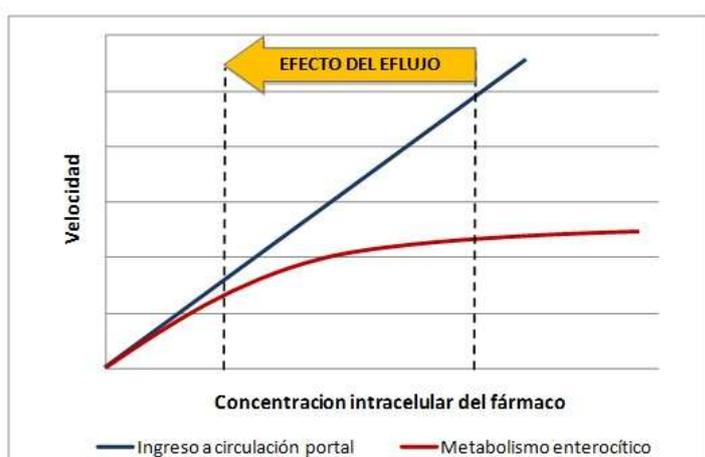


Figura 3.2

En la grafica se representa el efecto que la presencia de los transportadores de eflujo ejerce sobre disposición de un fármaco que es posible de ser metabolizado en el enterocito.

En realidad, cuando los transportadores y las enzimas metabolizadoras trabajan en forma concertada, ambos procesos son los que disminuyen la concentración de fármaco en el enterocito, lo cual implica un menor ingreso a circulación portal.

La fracción de fármaco que alcanza la circulación portal puede alcanzar la circulación sistémica o ingresar por primera vez al hígado, donde enfrenta nuevamente diferentes destinos:

- Ser metabolizado por enzimas hepáticas que contribuyan al metabolismo de primer paso (nuevamente no todos los fármacos, presentan metabolismo relevante a este nivel) y por lo tanto a su desaparición presistémica, lo cual implicaría también pérdida de la biodisponibilidad.

- Ser regresado al intestino vía biliar por transportadores, entre ellos bombas de eflujo, desde donde pueden repetirse los procesos anteriormente mencionados. Esto se conoce como circulación enterohepática.
- El fármaco puede salir del hígado y vía vena suprahepática llegar por primera vez al corazón, donde una vez alcanzado el ventrículo izquierdo será distribuido a todos los tejidos de la economía.

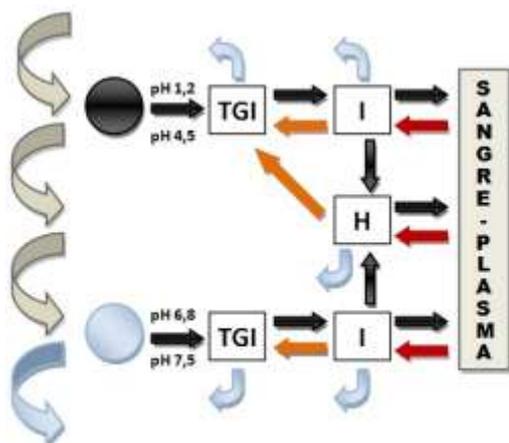


Figura 3.3 – Se agrega a la representación anterior la circulación enterohepática. H – Hepatocito. Modelo que incorpora el hígado como compartimiento, y presenta además los mecanismos de interacción con intestino y plasma.

Nuevamente aquí, el trabajo concertado de enzimas metabolizadoras y transportadores de eflujo condicionan la cantidad y velocidad de ingreso del fármaco a circulación sistémica.

Si la batería enzimática que trabaja sobre este fármaco se encuentra mayoritariamente a nivel hepático, entonces la existencia de transportadores que extruyan al fármaco hacia el intestino preservaría al mismo de su metabolización hepática, brindándole la posibilidad de absorberse nuevamente en el intestino, ingresar a circulación portal y tal vez no sufrir extracción hepática, es decir, estos transportadores estarían posibilitando que una cierta fracción del fármaco pueda evitar ser eliminado por el hígado.

Si por el contrario, las enzimas responsables de la metabolización se encuentran a nivel intestinal, la salida desde el hepatocito hacia el enterocito lo enfrentaría nuevamente con la posibilidad de ser eliminado definitivamente, es decir que en este caso los transportadores de eflujo estarían colaborando a una menor biodisponibilidad del fármaco.

3.2.2- DISTRIBUCIÓN

Si el fármaco es capaz de sortear los procesos de eliminación presistémica anteriormente mencionado el porcentaje de él que alcanza el ventrículo izquierdo está biodisponible, y puede distribuirse hacia todos los tejidos del organismo, contactarse con el sitio de acción y cumplir su acción farmacológica. Para que esto ocurra las moléculas que se encuentran en el

espacio intravascular deben atravesar membranas, alcanzar el líquido intersticial y desde allí a las células de los tejidos u órganos que contienen su blanco de acción.

En este proceso los transportadores de eflujo también cumplen un rol importante, ejemplo de esto son algunos anticonvulsivantes para los cuales la concentración en el sitio donde se encuentra su blanco de acción está también condicionada por la expresión de transportadores.

Si bien estos fármacos logran atravesar la BHE, su concentración a nivel del SNC se mantiene baja si los transportadores se sobreexpresan, por ejemplo por mecanismos patológicos.

3.2.3- ELIMINACIÓN

Los fármacos que se eliminan sistémicamente por metabolización hepática, repiten los procesos descritos anteriormente para hígado.

Para aquellos fármacos que se eliminan por excreción renal y son sustratos de transportadores, el aumento en la expresión y/o actividad de los mismos a nivel renal puede traer aparejado un aumento del clearance.

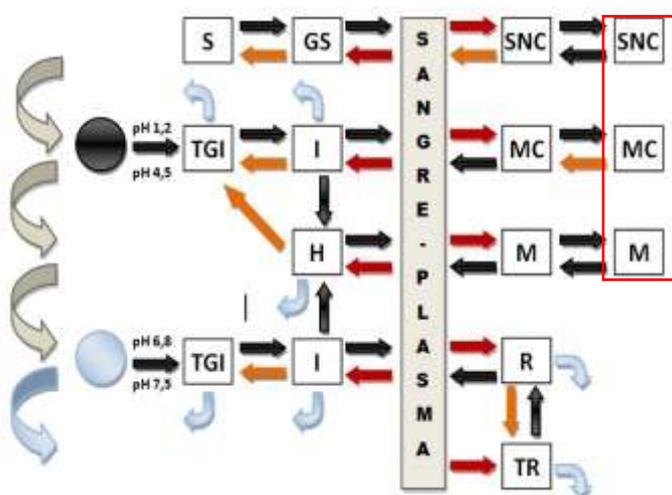


Figura 3.4 – Modelo completo.

SNC – Sistema Nervioso Central, M – Músculo, MC – Miocardio, R – Riñón, TR – Túbulo renal, GS – Glándula salival, S – Saliva.

Los compartimentos marcados en ---- representan tejidos más profundos y de más lento equilibrio con el plasma.

Otro aspecto relevante de este modelo, es la inclusión del flujo sanguíneo hacia compartimentos como hígado, riñón, intestino y músculo esquelético y cómo la redistribución del mismo puede impactar en la cinética de los fármacos en estudio.

Si bien ciertos órganos tienen un flujo sanguíneo preservado (cerebro, miocardio e hígado), se debe tener en cuenta que para los dos sexos el porcentaje de masa muscular es diferente (en hombres mayor que en mujeres) y que por lo tanto el porcentaje del flujo sanguíneo esplácnico (y dentro de él, el intestinal) será mayor en el sexo femenino que en el masculino.

Si nos enfocamos ahora en las diferencias etarias, los adultos jóvenes tienen en proporción una mayor masa muscular que los adultos mayores, por lo tanto desde el punto de vista del flujo sanguíneo se puede establecer un paralelismo entre hombre – mujer y adultos mayores – adultos jóvenes.

3.3- APLICACIÓN DEL MODELO

Mucho ha sido teorizado sobre la influencia de los transportadores de eflujo sobre la biodisponibilidad y clearance de múltiples drogas, el desarrollo de este modelo permite predecir los cambios en los parámetros anteriormente mencionados cuando el tratamiento crónico con ciertas drogas induce la expresión de transportadores, o cuando el fármaco se combina con inductores o inhibidores de la expresión de los mismos.

Hasta este punto se ha realizado una discusión cualitativa del modelo, en adelante se presentan ecuaciones que permiten cuantificar el impacto que el cambio en la expresión-actividad de transportadores tiene sobre la biodisponibilidad y clearance.

Llevando el modelo presentado en la Figura 3.3 a la siguiente representación:

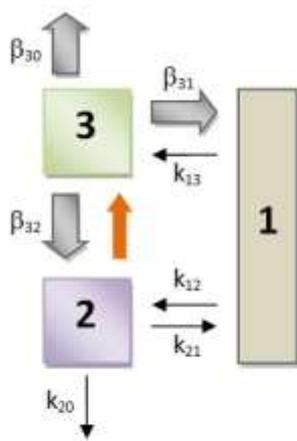


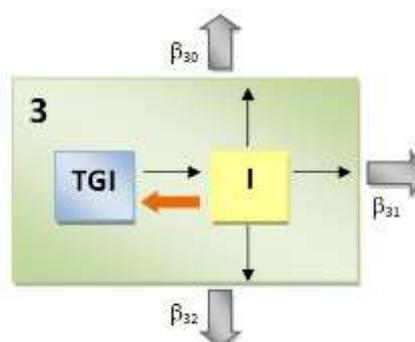
Figura 3.5 – Modelo farmacocinético. 1 – Plasma, 2 – Hígado, 3 – Intestino - conjunción bicompartimental - enterocito y TGI

Esta flecha representa los procesos que se ven disminuidos por el aumento del transporte de eflujo, lo cuales se rigen por la constante de primer orden β (resultante de la asociación bicompartimental mostrada en 3.6).

Esta flecha representa la extrusión mediada por transportadores de eflujo.

El compartimento 3 es:

Figura 3.6 – Desglose del compartimento 3.
TGI – tracto gastrintestinal, I – célula intestinal (enterocito)



3.3.1- BIODISPONIBILIDAD (F)

Se define:

$$F \equiv \frac{CL_{\text{ingreso}}}{CL_{\text{total}}} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

CL de ingreso – desde 3 a 1

CL total – desde 3 hacia todos los demás compartimentos.

Si se plantea F utilizando las k y β correspondientes, la ecuación se transforma en:

$$F \equiv \frac{\beta_{31}(k_{21} + k_{23} + k_{20}) + \beta_{32}k_{21}}{(\beta_{31} + \beta_{30})(k_{21} + k_{23} + k_{20}) + \beta_{32}(k_{21} + k_{20})} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

La actividad de los transportadores se ve reflejada en la constante k_{23} que implicaría a los transportadores presentes en el hepatocito y responsables de la salida de fármaco desde el hígado hasta el canalículo biliar. Además, un aumento de la actividad no sólo incrementaría k_{23} , sino que también disminuiría las diferentes β_{3X} por igual (lo cual se deduce del modelo mostrado en la figura 3.6)

El aumento de k_{23} impactará de forma diferente en la biodisponibilidad de un fármaco según donde se metabolice de forma preponderante.

Analizaremos los casos extremos, metabolismo principalmente hepático o principalmente intestinal, lo cual está determinado por la proporción relativa de enzimas en cada uno de estos órganos.

Si no existe metabolismo a nivel intestinal, o sea $\beta_{30}=0$, y k_{23} aumenta, el cociente aumenta, esto permite concluir que para un fármaco que es metabolizado principalmente a nivel hepático, un aumento en la actividad de los transportadores redundará en un aumento de la biodisponibilidad.

Si no existe metabolismo a nivel hepático, o sea $k_{20}=0$, y k_{23} aumenta, el cociente disminuye. Esto permite concluir que para un fármaco que es metabolizado principalmente a nivel intestinal, un aumento en la actividad de los transportadores redundará en una disminución de la biodisponibilidad.

3.3.2- CLEARANCE (CL)

Tomando en cuenta que la mayoría de los fármacos estudiados en este trabajo de tesis tienen eliminación por metabolización y que el modelo analizado previamente (fig. 3.5 y 3.6) contiene a los dos órganos metabolizadores por excelencia, es que se utiliza a éste para estudiar como los transportadores influyen el CL de un fármaco.

Tomando todas las salidas posibles del sistema desde el compartimento 1 de la figura 3.5 es que se plantea el CL como:

$$CL_{total} \equiv CL_{1220} + CL_{1320} + CL_{1330} + CL_{1230} \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

$$CL_{1220} \equiv \frac{k_{12}(\beta_{31} + \beta_{32} + \beta_{30})k_{20}V_1}{(k_{21} + k_{20})(\beta_{31} + \beta_{32} + \beta_{30}) + k_{23}(\beta_{31} + \beta_{30})} \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

$$CL_{1320} \equiv \frac{k_{13}\beta_{32}k_{20}V_1}{(k_{21} + k_{20})(\beta_{31} + \beta_{32} + \beta_{30}) + k_{23}(\beta_{31} + \beta_{30})} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

$$CL_{1330} \equiv \frac{k_{13}(k_{21} + k_{23} + k_{20})\beta_{30}V_1}{(\beta_{31} + \beta_{30})(k_{21} + k_{23} + k_{20}) + \beta_{32}(k_{21} + k_{20})} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

$$CL_{1230} \equiv \frac{k_{12}\beta_{30}k_{23}V_1}{(\beta_{31} + \beta_{30})(k_{21} + k_{23} + k_{20}) + \beta_{32}(k_{21} + k_{20})} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

Para realizar el análisis nos situaremos nuevamente en dos extremos, metabolismo totalmente hepático ó totalmente intestinal.

Si un fármaco se metaboliza principalmente en el hígado, β_{30} (representación del clearance intestinal) es cero por lo tanto el CL de ese fármaco se simplifica en:

$$CL_{1220} \equiv \frac{k_{12}(\beta_{31} + \beta_{32})k_{20}V_1}{(k_{21} + k_{20})(\beta_{31} + \beta_{32}) + k_{23}(\beta_{31})} \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

$$CL_{1320} \equiv \frac{k_{13}\beta_{32}k_{20}V_1}{(k_{21} + k_{20})(\beta_{31} + \beta_{32}) + k_{23}(\beta_{31})} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Si k_{23} aumenta por aumento de la actividad de transportadores, los CL_{1220} y CL_{1320} disminuyen por lo que el CL_{total} disminuye.

Es lo mismo decir que, si el número o actividad de los transportadores aumenta, la salida desde el órgano que metaboliza el fármaco, en este caso el hígado (2) hasta un órgano sin poder metabólico, en este caso el intestino, puede disminuir el CL de un fármaco.

Si por el contrario un fármaco es metabolizado principalmente por enzimas enterocíticas, k_{20} es cero y el CL de este fármaco se simplifica en:

$$CL_{1330} \equiv \frac{k_{13}(k_{21}+k_{23})\beta_{30}.V_1}{(\beta_{31} + \beta_{30})(k_{21} + k_{23}) + \beta_{32}(k_{21})} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

$$CL_{1230} \equiv \frac{k_{12}\beta_{30}k_{23}.V_1}{(\beta_{31} + \beta_{30})(k_{21} + k_{23}) + \beta_{32}(k_{21})} \quad (\text{Ecuación 3.14})$$

De la misma forma si k_{23} aumenta por aumento de la actividad de transportadores CL_{1330} y CL_{1230} (si bien k_{23} se encuentra en el numerador y en el denominador impacta más en el numerador dando como resultado un aumento del cociente) y por lo tanto el CL total del fármaco aumenta.

Es lo mismo decir que, si el número o actividad de los transportadores aumenta, la salida desde un órgano que no tiene poder metabólico sobre él, hasta un órgano con poder metabólico, en este caso el intestino, puede aumentar el CL de un fármaco.

El modelo de la figura 3.7 puede por un lado desglosar del compartimento 1 a otros dos compartimentos útiles para el presente trabajo de tesis: SNC y GS. Por otro lado, es posible simplificar la forma de egreso del sistema, uniendo los compartimentos 2 y 3. Para ello es preciso tener bien presente cómo se interpretan los aumentos de actividad del transporte de eflujo discutido previamente.

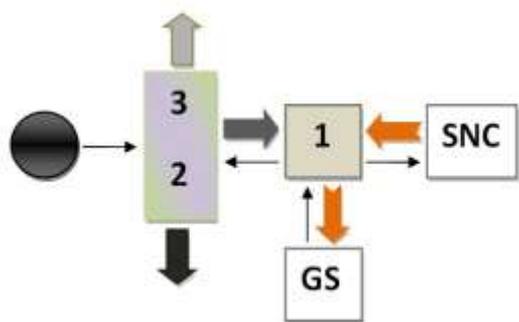


Figura 3.7 – Modelo que desglosa al compartimento 1 en dos compartimentos útiles en esta tesis Sistema Nervioso Central (SNC) y Glándulas Salivales (GS). 1- plasma, 3-2 - intestino e hígado, SNC – Sistema Nervioso Central, GS – Glándulas salivales
 ⇒ Las flechas grises representan los procesos que se ven disminuidos por el aumento del transporte de eflujo. La intensidad del color indica la intensidad del descenso (más oscuro – mayor reducción).

Las flechas naranjas representan los procesos que se ven aumentados por el aumento en la actividad de transportadores.

Tres de los anticonvulsivantes más antiguos usados en la clínica, DFH, FB y CBZ son bien conocidos por su poder como inductores enzimáticos y presentar respuesta farmacocinéticas diferentes con la dosis.

Además de compartir las propiedades de inductores enzimáticos, estos tres fármacos comparten la capacidad de inducir la expresión de transportadores, sin embargo esta capacidad no ha sido relacionada, hasta ahora, con las cinéticas presentadas.

El modelo farmacocinético presentado anteriormente es capaz de explicar porqué tres drogas que comparten características inductivas similares presentan cinéticas tan disímiles y que la base de tales diferencias puede radicarse en la expresión de los transportadores de eflujo dependiente del propio fármaco y de su interacción con la batería enzimática (Fagiolino et al, 2011)

El impacto que este modelo tiene sobre el análisis de los parámetros farmacocinéticos de estos fármacos será discutido posteriormente para cada uno de los fármacos analizados.

Este análisis revela que el modelo farmacocinético planteado brinda respuestas concretas y que acompañan los resultados hallados no solamente en este trabajo de tesis sino también por otros grupos de investigación.

CAPÍTULO 4

Estudio de la inducción de transportadores de eflujo por Carbamacepina usando Digoxina y Carbamacepina como marcadores

4.1- FUNDAMENTO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Según lo expuesto en los dos capítulos anteriores, la actividad y expresión enzimática y de transportadores de eflujo dependen de diversos factores. Por una parte, la inducción tiempo y concentración dependiente del inductor, y por otra la expresión género dependiente de los transportadores. Ambos parámetros se han sustanciado como claves en el entendimiento de los modelos farmacocinéticos que los contemplan. Existen además otros factores que influyen en la sobreexpresión de los transportadores, como ser la epilepsia refractaria (Loscher & Potschka, 2001).

En nuestra búsqueda por profundizar en el entendimiento del rol de los transportadores en la respuesta farmacológica (entendiéndose por ésta la respuesta farmacocinética y farmacodinámica), se buscó desarrollar un protocolo que no estuviera influenciado por el fenotipo patológico, sabiendo que el escenario clínico podía sesgar en parte nuestros hallazgos. La estrategia de trabajo se propuso entonces: combinar individuos sanos con drogas que pudieran servir de inductor y/o trazador de la expresión de los transportadores.

En este trabajo de tesis los transportadores de membrana seleccionados para estudio son P-gp y MRP2, ya que ambos han mostrado tener una regulación positiva en su expresión mediada por drogas y ciertas patologías. (Giessmann et al, 2004; Hoffmann & Loscher, 2007).

Como en el caso de muchas proteínas, la regulación de los transportadores ocurre al menos a tres niveles (Gerk & Vore, 2002):

- captación endocítica o inserción exocítica en la membrana, proceso que ocurre en pocos minutos,
- regulación transduccional, proceso que requiere horas,
- regulación transcripcional, proceso que puede llevar días y que es regulado por el receptor nuclear de pregnano (PXR) y por el receptor constitutivo de androstano (CAR).

Entre las posibles moléculas sustrato de transportadores de eflujo se encuentran varios fármacos anticonvulsivantes CBZ, DFH, FB y DPA, así como el cardiotónico digitálico Digoxina (DGX).

La elección de las dos drogas que se detallan a continuación estuvo determinada por el conocimiento existente sobre sus parámetros farmacocinéticos.

DGX se eligió como trazador de la expresión y actividad del transportador P-gp, porque es sustrato de dicho transportador y tanto su biodisponibilidad como su eliminación a nivel renal se ven influenciadas por cambios en la expresión o actividad del mismo, además de haber sido una droga ampliamente estudiada por nuestro grupo de trabajo.

La selección de CBZ como trazador de MRP2 e inductor de P-gp y MRP2, se debe a que su rol en la regulación positiva de la expresión de CYP3A4 y MRP2 a través de un mecanismo transcripcional ha sido estudiado (Owen et al, 2006) y es también una droga bien caracterizada desde el punto de vista farmacocinético. Sufre metabolismo a nivel intestinal y hepático por CYP3A4 y es sustrato de MRP2, lo cual le proporciona una cinética particular en su paso por el organismo. Respecto a la regulación que CBZ podría ejercer sobre P-gp, existe información contradictoria.

Para medir la actividad y/o expresión de P-gp se decidió evaluar algunos parámetros farmacocinéticos de DGX en dosis única para cada voluntario, previos a la terapia con CBZ. Luego de un período de recibir el inductor en forma crónica, el voluntario recibió una nueva dosis de DGX y sus parámetros fueron reevaluados.

Como se expuso en el capítulo 2, P-gp se expresa en diversos tejidos; en el enterocito donde influencia la biodisponibilidad (F) de DGX y en los túbulos renales, donde afecta su velocidad de eliminación (β). Debido a que DGX se elimina mayoritariamente por vía renal se elige determinar la concentración de droga en orina en el transcurso del tiempo para la

determinación de β , y ya que DGX se metaboliza en bajo porcentaje se decide aproximar el parámetro F con dicha área bajo la curva.

Para el seguimiento de la excreción urinaria de DGX, se protocolizaron los muestreos, la ingesta de líquidos, alimentos y cualquier otra sustancia, a los efectos de no alterar los parámetros farmacocinéticos por causas externas a las estudiadas en la investigación.

Para evaluar los cambios en la actividad y/o expresión de MRP2 se eligió seguir parámetros farmacocinéticos de CBZ ya que como la misma es sustrato de este transportador, su F y eliminación por metabolización podrían verse afectadas por cambios en la expresión de MRP2. Al ser una droga altamente metabolizada, su F y β no pueden ser estimados de manera confiable a partir de la excreción renal de la misma. La determinación de la concentración de CBZ vs tiempo en saliva es un método ampliamente utilizado por el grupo de investigación y cumple con el requisito de fácil accesibilidad, por lo que este fluido fue el seleccionado para la estimación de los parámetros farmacocinéticos de CBZ.

El diseño experimental intenta poner en evidencia alguna diferencia de parámetros farmacocinéticos entre la primera administración de CBZ y los mismos parámetros luego de la administración crónica de la misma.

De la misma forma que para DGX, se protocolizaron los muestreos, la ingesta de líquidos, alimentos y cualquier otra sustancia, a los efectos de no alterar los parámetros farmacocinéticos por causas externas a las estudiadas en la investigación.

Por otro lado, trabajo de nuestro grupo (Maldonado et al, 2008), postula que la expresión de transportadores condiciona la concentración salival de fármacos; lo que despertó el interés en el diseño de un protocolo que permitiera la detección de la inducción de la expresión de transportadores de membrana a nivel de las glándulas salivales.

El escenario ideal sería poder determinar la concentración de los fármacos a ambos lados de la barrera que contiene a los transportadores. Tanto en el caso de orina como de saliva esto es impracticable, pero en esta última existe una aproximación consecuencia de su proceso de formación. Las células acinares y ductales están en contacto con concentraciones de fármaco producto de la extravasación de droga libre, el fármaco ingresa a las células acinares y se convierte en parte de la saliva fresca por un mecanismo de filtración pasiva y transporte activo. En su paso por los ductos, la saliva sufre múltiples procesos entre los cuales se incluye secreción activa mediada por los transportadores de eflujo. Esta fracción es

almacenada en la glándula hasta que se estimula su secreción. Cuando una segunda estimulación es hecha poco tiempo después de la primera, el lapso transcurrido entre la formación de saliva y la recolección no sería suficiente para permitir que el transporte activo tenga lugar, en consecuencia, la concentración de droga en esta fracción sería similar a la concentración de droga en el intersticio y por lo tanto a la concentración libre en plasma.

Por lo anteriormente expuesto, para poder determinar la actividad de los transportadores de eflujo en la glándulas salivales se deben extraer 2 fracciones de saliva en secuencia: S1 corresponde a la concentración de droga contenida en la glándula al momento de la primera estimulación y S2 es la concentración de droga en la saliva rápidamente formada mientras que la sangre fluye a través de los capilares que irrigan los acinos. Esta última fracción es mucho más dependiente de la concentración plasmática libre en los capilares (Fagiolino et al, 2006).

El diseño del protocolo se realiza de modo que la estimulación de las glándulas para obtener la segunda fracción maximice el flujo salival en todos los voluntarios y así lograr que S2 sea casi exclusiva consecuencia de la concentración de droga libre en plasma y menos contaminada de la concentración ductal.

4.2- HIPÓTESIS DEL EXPERIMENTO

1. El estudio diseñado será capaz de detectar la potencial inducción del transportador P-gp, tanto a nivel de los túbulos renales como del enterocito, lo que producirá un incremento en β de DGX, y en consecuencia se producirá un aumento de CL (cuyo mayor componente es renal), y por tanto este hecho presumiría una inducción de la excreción urinaria de DGX.
2. La evidencia de una disminución de $E(\infty)$ orina ver (ecuación 4.1) calculado a partir de las muestras de orina acompañado de la observación de menores S2 de DGX a lo largo del tiempo, estarían indicando una reducción de F, consecuencia de la inducción de P-gp a nivel intestinal. Esto se desprende de lo siguiente:

Excreción urinaria de DGX es

$$E(\infty)_{orina} \equiv \frac{CLR}{CL} \bullet FD \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Dado que CL_R/CL es relativamente constante, una disminución de $E(\infty)$ se explicaría por disminución F.

3. Debido a la bien conocida autoinducción que CBZ ejerce sobre su metabolismo, es de esperar que el Área Bajo la Curva (AUC) luego de la administración crónica sea

menor que el AUC de la primera administración. En el caso de que la inducción de MRP2 tuviera lugar, la biodisponibilidad de CBZ se vería reducida tanto en cantidad como en velocidad.

4. Si se produce una modificación del cociente S1/S2 del digitálico o de CBZ, se estaría confirmando el efecto inductivo de CBZ en la expresión de P-gp y MRP2 respectivamente, pero además se confirmaría la utilidad de la relación S1/S2 como una herramienta al momento de evaluar la inducción de transportadores de eflujo en la glándula salival como consecuencia de administración de fármacos, con lo cual podría ser utilizada en el escenario clínico como marcador de la sobreexpresión de transportadores.

4.3- PROTOCOLO DEL ESTUDIO

El estudio prospectivo realizado puede verse en el Ver Anexo 1.

El protocolo de estudio fue aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Química.

Seis voluntarios (3 mujeres y 3 hombres) fueron incluidos en el trabajo.

Todos los sujetos dieron consentimiento por escrito para la participación en el estudio.

Del chequeo de la historia clínica, examen físico y exámenes de laboratorio que incluyeron hemograma, ionograma, funcional hepático y proteinograma electroforético, se descartaron patologías que pudieran incidir en el estudio.

Los sujetos no recibieron ninguna medicación adicional durante el estudio y no consumieron alcohol ni xantinas durante el día 0 (día antes de comenzar la ingesta de medicación), 1, 6, 7, y 8 del estudio. La media de pesos fue de 79 kg (rango 49-109) y media de edades fue de 25 años (21-29). La ingesta de comida fue estandarizada para todos los voluntarios durante el día 1, 2, 3, 7, 8 y 9. Todas las mujeres fueron reclutadas una semana después de haber comenzado su período menstrual. Ha sido referenciado que las hormonas sexuales podrían condicionar el metabolismo de CBZ (Nakamura et al, 2002).

En el primer día del estudio (día 1), los sujetos tomaron una dosis única de DGX 0.5 mg a las 8:00 a.m. y se siguió el protocolo de muestreo para saliva y orina durante las siguientes 48 horas.

El día 3 los voluntarios recibieron CBZ (2 x 200 mg – comprimidos de liberación inmediata) a las 8:00 a.m. Se recolectaron muestras salivales según protocolo durante las siguientes 24 horas.

Desde el día 4 al 8 los sujetos tomaron 400 mg de CBZ por día (200 mg 8:00 am y 200 mg 8:00 pm) y dos muestras a predosis matutinas fueron extraídas durante este período. Luego de la dosis matutina del día 9 los voluntarios fueron sometidos al mismo esquema de muestreo del día 3, pero la muestra extraída a la hora 16 posdosis fue omitida.

El día 10 se extrajeron 3 muestras: 12, 16 y 20 horas luego de la dosis vespertina del día 9.

El día 10 los voluntarios recibieron 0.5 mg de DGX y fueron sometidos al mismo protocolo de muestreo del día 1.

4.3.1- RECOLECCIÓN DE ORINA

Los días 1, 2, 10 y 11, los voluntarios debieron recolectar orina por micción espontánea a los tiempos indicados en el protocolo, anotar el volumen total emitido en cada intervalo y guardar una alícuota en freezer a -20°C hasta el momento del análisis.

4.3.2- RECOLECCIÓN DE SALIVA PARA DETERMINACIÓN DE DGX

En los días 1 y 10, S1 fue recolectada ubicando 50 mg de ácido cítrico en la lengua para estimular la salivación y salivando no más de 1 mL en un tubo. La saliva intermedia fue descartada y el procedimiento repetido para obtener S2.

4.3.3- RECOLECCIÓN DE SALIVA PARA DETERMINACIÓN DE CBZ

Desde el día 3 al 10, S1 fue recolectada ubicando 50 mg de ácido cítrico en la lengua para estimular la salivación y salivando no más de 1 mL en un tubo conteniendo 60 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) para evitar la degradación de 10,11-Epóxido de CBZ (EPOX). La saliva intermedia fue descartada y el procedimiento repetido para obtener S2.

4.4- MÉTODO DE ANÁLISIS

DGX fue analizada por técnica de Inmuno Fluorescencia de Luz Polarizada (FPIA Abbott Laboratories).

CBZ y EPOX fueron analizados por HPLC de acuerdo a una técnica previamente publicada y revalidada para esta tesis. (Olano et al, 1998) Anexo 2.

4.5- PROCESAMIENTO DE DATOS Y CÁLCULOS FARMACOCINÉTICOS

4.5.1- DIGOXINA

La cantidad excretada de DGX en cada intervalo de tiempo dividido el valor de dicho intervalo, se tomó como estimador experimental de la velocidad de excreción urinaria al tiempo medio del intervalo. Un gráfico de velocidad vs. tiempo rindió puntos que simulan el perfil de concentración plasmática, y por tanto de él se calculó la constante de eliminación (k_e), con mayor fidelidad desde las 8 horas post-dosis. Las semividas de DGX resultaron de los cocientes $0.693/k_e$ de los días 2 y 10.

El área bajo la curva de dicho gráfico entre cero e infinito ($AUC_{0-\infty} = \text{cantidad recuperada en orina } [E(\infty)]$), es directamente proporcional a la dosis de DGX biodisponible (FD), al aclaramiento renal (clearance renal: CL_R), e inversamente proporcional al aclaramiento total ($CL = CL_R + CL_{NR}$) de la droga: $E(\infty) = FD \cdot CL_R / CL$. Se calcularon AUC S2 de 0 a 3 horas (AUC_{0-3}) y las medias de S1/S2 para ambos períodos

4.5.2- CARBAMACEPINA

Se calcularon las AUC para CBZ de 0 a 24 horas (AUC_{0-24}) y de cero a infinito ($AUC_{0-\infty}$) luego de la administración de una dosis de 400 mg el día 3, y de cero a doce horas (AUC_{0-12}) luego de la dosis matutina de 200 mg del día 9, usando el método de los trapecios. Los clearance aparentes (CL/F) en el día 3 y 9 fueron estimados dividiendo la dosis administrada (400 y 200 mg) por $AUC_{0-\infty}$ y por AUC_{0-12} , respectivamente. Las constantes de eliminación de primer orden (k_e) fueron calculadas de la pendiente de la regresión lineal entre las concentraciones transformadas logarítmicamente y el tiempo, usando las muestras S2 entre las 12 y 24 horas extraídas en los días 3 y 9.

Las semividas de CBZ resultaron de los cocientes $0.693/k_e$ obtenidos los días 3 y 9. Los cocientes metabólicos experimentales (concentración de EPOX / concentración de CBZ) y las relaciones de concentración de CBZ S1/S2 fueron calculadas a lo largo de todo el estudio.

Para evaluar la influencia que la concentración de CBZ y el tiempo de exposición pueden tener en la expresión de los transportadores, el perfil de la relación S1/S2 vs tiempo se comparó con el perfil de S2 vs tiempo.

4.6- RESULTADOS

4.6.1- DIGOXINA

La tabla 4.1 muestra los parámetros calculados para DGX, y en la figura 4.1 los perfiles medios de los voluntarios antes y después de la administración del CBZ. De la comparación de los mismos se desprende que DGX no sufrió cambios en su biodisponibilidad ni en su velocidad de excreción, así como tampoco en el cociente S1/S2

Día	$t_{1/2} \pm SD$ (h)	Vel exc $\pm SD$ (mcg/h)	AUC S2 0-3 $\pm SD$ (mcgh/mL)	S1/S2 $\pm SD$
1	23.0 \pm 7.2	210.7 \pm 10.1	1.52 \pm 0.77	1.95 \pm 0.30
10	29.5 \pm 11.0	215.5 \pm 29.1	1.69 \pm 1.07	1.90 \pm 0.33

Tabla 4.1 - Media de los parámetros farmacocinéticos calculados luego de administración de 0.5 mg de DGX en dosis única el día 1 y 10 del protocolo.

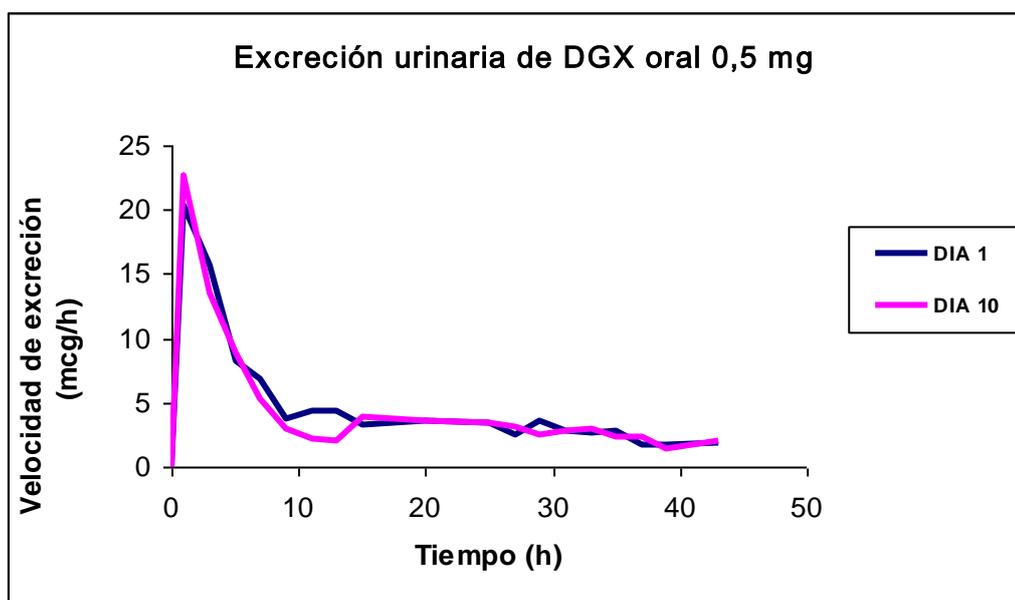


Figura 4.1 - Perfiles medios de excreción urinaria de DGX durante el día 1 y 10 del protocolo

4.6.2- CARBAMACEPINA

Las curvas de concentración de CBZ en S2 vs tiempo obtenidas luego de la primera administración de 400 mg (día 3) y luego de la administración de 200 mg (día 9) se muestran en la figura 4.2. Como se esperaba el metabolismo de CBZ fue inducido a lo largo del estudio. Esto se muestra en la tabla 4.2 por el descenso en la semivida de CBZ desde

36.9 h a 25.7 h, y de AUC, de 77.8 mg.h/L (AUC_{0-inf}) a 42.9 mg.h/L ($2 \times AUC_{0-12}$). También se observó un aumento en el cociente metabólico EPOX/CBZ (desde 0.14 a 0.38). La inducción alcanza una meseta luego de 4 días aproximadamente (figura 4.3).

Día	$t_{1/2} \pm SD$ (h)	AUC $\pm SD$ (mgh/L)	EPOX/CBZ índice
3	36.87 ± 8.25	77.8 ± 8.10	0.144 ± 0.044
9	25.70 ± 7.96	42.9 ± 2.84	0.383 ± 0.133

Tabla 4.2 - Parámetros farmacocinéticos durante el primer día de tratamiento con 400 mg (2 comprimidos de 200 mg) en dosis única (Día 3) y luego de seis días de administración crónica de 200 mg de CBZ cada 12 h (Día 9). AUC correspondiente al día 9 resulta de la multiplicación de AUC_{0-12} por 2.

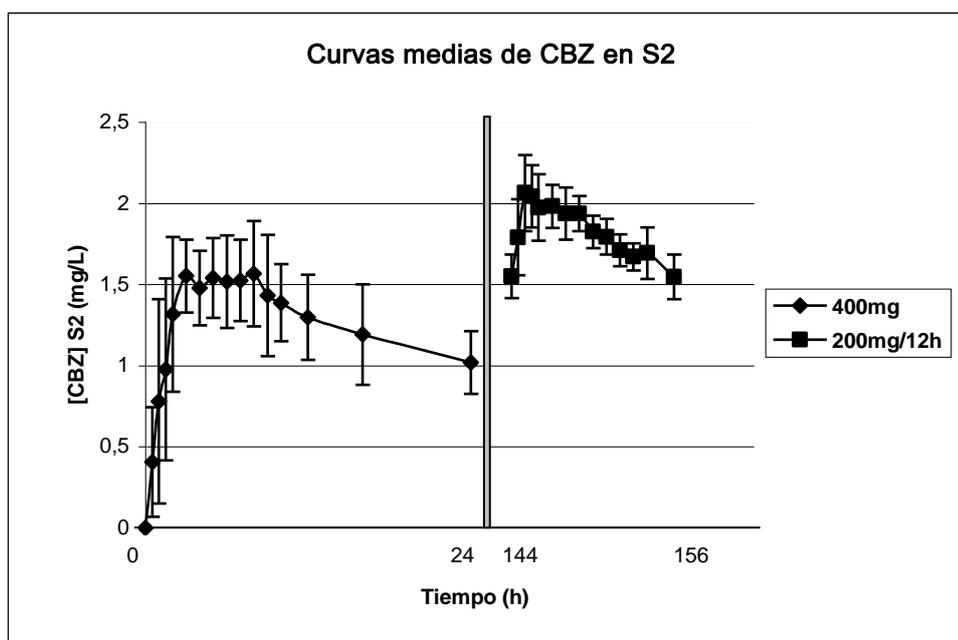


Figura 4.2 - Concentración de CBZ en S2 durante las primeras 24 horas de administración (Día 3) y luego de 6 días de administración crónica (día 9).

Tanto los cocientes S1/S2 a predosis como las concentraciones de CBZ en S2 comprendidas en el período 48 h a 168 h fueron considerados con fines estadísticos.

Según se muestra en la figura 4.3 los valores de concentración en S2 mostraron un incremento seguido de una caída durante el período mencionado, revelando efecto autoinductivo tiempo dependiente a lo largo de la administración múltiple del fármaco. La relación S1/S2 mostró el mismo comportamiento pero desfasado en el tiempo (con respecto a S2) en una media de 48 horas. El tiempo transcurrido entre el máximo S2 y el máximo

S1/S2 para cada voluntario se denominó desfasaje intravoluntario, para 4 voluntarios este retraso fue de 2 días y 2 voluntarios mostraron 1 y 3 días de retraso respectivamente.

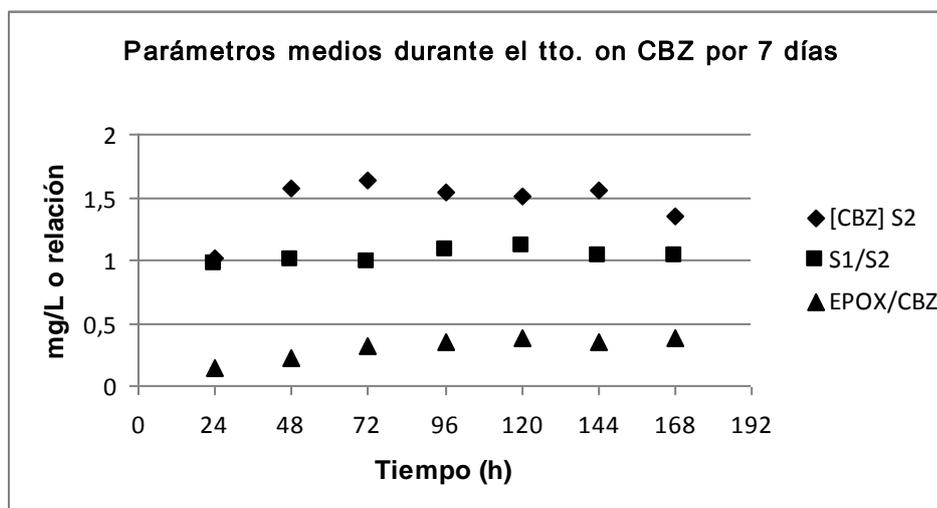


Figura 4.3 – Administración de 200 mg de CBZ cada 12 horas. La concentración de CBZ en S2 muestra un incremento seguido de un descenso comprendido en el período entre las 48 y 168hs. S1/S2 muestra el mismo comportamiento pero con un retraso de 48 horas en promedio. El cociente EPOX/CBZ muestra que la inducción alcanza una meseta luego de 96 horas de tratamiento.

El máximo valor de S2 y el obtenido luego de transcurrido el desfasaje intravoluntario mostraron diferencia significativa ($p < 0.01$). Diferencias significativas fueron encontrada comparando S1/S2 al momento del máximo S2 con el S1/S2 máximo (ver figura 4.4).

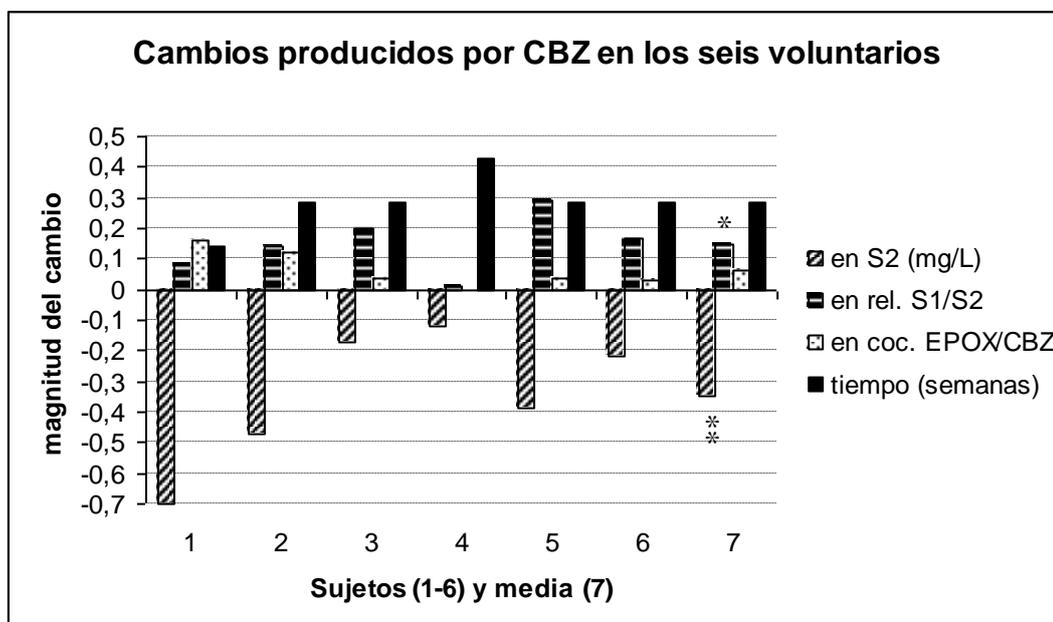


Figura 4.4 - Administración de 200 mg de CBZ cada 12 horas 12 h en 6 voluntarios sanos durante 6 días. Las barras muestran la diferencia entre la máxima S2 de CBZ o la máxima relación S1/S2 y los valores obtenidos luego de transcurrido el desfasaje intraindividuo (tiempo representado en semanas). La diferencia en el cociente metabólico EPOX/CBZ luego de transcurrido el desfasaje intraindividuo también se muestra en la gráfica.

* $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

4.7- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos para DGX se concluye que CBZ no es inductor de P-gp, ya que los parámetros farmacocinéticos de DGX no se vieron afectados luego de 7 días de administración crónica de CBZ.

Como se esperaba, el metabolismo de CBZ fue inducido a lo largo de los 7 días de estudio tomando los sujetos individualmente o como grupo, comprobado por el descenso significativo en la semivida de eliminación y el incremento, también significativo, del CL oral. La constante de eliminación (k_e) se incrementó en menor forma que el CL aparente (CL/F), por lo que se está detectando además de una inducción metabólica sistémica, una contribución adicional de una inducción metabólica presistémica y por lo tanto una menor F para CBZ.

Trabajos previos (Kudriakova et al., 1992) han referenciado una respuesta farmacocinética de CBZ dosis dependiente debido a su efecto inductivo sobre la metabolización, pero no existen hasta el momento estudios que evalúen la inducción de transportadores dependiente de la concentración in vivo. Luego de la experimentación realizada con voluntarios sanos se puede concluir que CBZ ejerce un efecto inductor tiempo y concentración dependiente de los transportadores de eflujo a nivel sistémico (glándula salival entre otros) luego de administración crónica, sustentado por la comparación de los perfiles de las curvas S1/S2 vs tiempo y S2 vs tiempo.

Se ha desarrollado un método innovador para el seguimiento de cambios en la expresión de transportadores, a través de dos medidas realizadas únicamente en saliva (S1/S2).

De acuerdo a los resultados obtenidos la actividad/número de los transportadores de eflujo cambia tras el tiempo que el inductor ha alcanzado su concentración activa, 48 horas en promedio. Este tiempo de retraso está en concordancia con los mecanismos transcripcionales de regulación positiva (Gerk & Vore, 2002).

Cuan determinante es el rol de los transportadores de eflujo en la inducción metabólica por CBZ no ha sido determinado hasta el momento. Durante el período que transcurre desde el comienzo del tratamiento hasta que el individuo alcanza estado estacionario, la incidencia del transportador sobre la autoinducción metabólica de la droga parece estar determinado principalmente por el tiempo más que por la concentración en el intestino. Esta afirmación, un tanto especulativa, se basa en la constancia que presentó el cociente metabólico a partir del día 4 del estudio.

Por otro lado, la concentración de CBZ intracelular debe ser regulada y estabilizada una vez que el transportador de eflujo se expresa como consecuencia a su vez de la concentración de droga. Por lo tanto, el transportador y la concentración de droga se regulan recíprocamente en este corto período de 4 días. Debería tenerse en cuenta que a partir del segundo día del estudio el tracto gastrointestinal recibió la misma dosis (200 mg) cada 12 horas, y que luego la estabilización puede demorar otras 48 horas como fue mencionado anteriormente. En lo concerniente a la inducción de la enzima CYP3A4, se esperaría observar el mismo período de desfasaje.

CAPÍTULO 5

Estudio de la influencia del sexo sobre la farmacocinética de Carbamacepina

5.1- INTRODUCCIÓN

Varios han sido los estudios que abordan las diferencias de parámetros farmacocinéticos entre géneros para diferentes fármacos (Fagiolino et al, 2007; Meibohm et al, 2002), y los procesos de absorción y disposición han sido reportado como disímiles para varias drogas (Soldin et al, 2009). Las características distintivas en las mujeres respecto a los hombres se deben en su mayoría a factores hormonales, los cuales determinan la composición del organismo, la expresión de enzimas hepáticas e intestinales y transportadores de membrana, entre otros.

Las mujeres tienen una menor proporción de músculos que los hombres cuando se considera el mismo peso. Esta es la razón por la cual los hombres tienen una mayor fracción de flujo sanguíneo destinado a los músculos, y consecuentemente una menor fracción entregada a la zona intestinal.

A causa de la incidencia que la distribución de gasto cardíaco tiene sobre la disposición de drogas (Fagiolino, 2004; Fagiolino et al, 2006; Fagiolino et al, 2007), puede esperarse para mujeres un mayor CL y una menor semivida para drogas que se eliminan por metabolización. Sin embargo, para alcanzar una visión más acabada de la eliminación de drogas en ambos sexos, la actividad de enzimas y transportadores deben ser incorporados en el análisis como factores también determinantes.

Esta perspectiva cardiovascular y fisiológica de la disposición de drogas podría ser un buen punto de comienzo para el análisis de los mecanismos por el cual las drogas son metabolizadas, o aún excretadas del organismo.

Como CBZ es eliminada a través de rutas que comprometen tanto a hígado como a intestino (Levy, 1995, Klotz, 2007), debería esperarse una eliminación más rápida de droga en mujeres que en hombres. El objetivo de este análisis es determinar si existe una ruta de eliminación sistémica y presistémica de drogas favorecida según el sexo del individuo.

5.2- PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Para poder disminuir la influencia de la absorción sobre la disposición de la droga, se ensayaron formulaciones de liberación inmediata (LI). Aún cuando la disolución de CBZ puede demorar menos tiempo, se asumió para el cálculo de la constante de eliminación que el proceso de absorción cesa luego de 10 horas post administración (Riad et al, 1986).

Para realizar este estudio se relevaron los resultados obtenidos en la primera dosis de CBZ para seis de los voluntarios sanos sometidos al protocolo anterior y se adicionaron los resultados de otros 6 voluntarios que habían sido reclutados con anterioridad. Las condiciones de muestreo fueron las mismas.

A los doce voluntarios sanos (6 hombres y 6 mujeres, con edades entre 21 y 36 años) les fue administrada CBZ comprimidos de 200 mg LI. Todos ellos recibieron dosis únicas de 400 mg (2 comprimidos). Todos los voluntarios firmaron consentimientos informados para participar en este estudio, el cual había sido previamente aprobado por la Comisión de Ética de Facultad de Química. Los voluntarios no tomaron otra medicación durante el estudio. La media de pesos (\pm desviación estándar) para hombres y mujeres fue: 78 (\pm 17) y 59 (\pm 7.8) kg, respectivamente. La ingesta de comida fue estandarizada para todos los voluntarios.

Las muestras salivales fueron recogidas a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 24 horas luego de la toma de dosis.

5.3- PROCESAMIENTO DE DATOS Y CÁLCULOS FARMACOCINÉTICOS

La concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo en el que la misma se alcanza ($T_{m\acute{a}x}$) fueron tomadas de los datos experimentales sin ningún tipo de cálculos. El área bajo la curva concentración-tiempo (AUC) fue calculada utilizando el método de los trapecios hasta 24 h (AUC_{0-24}), tanto para CBZ como para EPOX, y luego extrapoladas hasta infinito (AUC_{0-inf}) usando la constante de eliminación (k_e) obtenida por regresión logarítmica de los datos

posteriores a las 10 horas postadministración. Las semividas fueron calculadas por el cociente $0.693/k_e$. Los CL ap (CL/F) fueron calculados como: dosis/AUC_{0-inf}/peso. Los cocientes metabólicos se calcularon como: AUC_{0-24(EPOX)}/AUC_{0-24(CBZ)}.

5.4- RESULTADOS

La tabla 5.1 resume los parámetros farmacocinéticos obtenidos para ambos sexos como medias (o medianas) junto con los intervalos de confianza al 95%. Para la comparación de medias se llevó a cabo un test t no apareado, mientras que para la comparación de medianas se utilizó un test U de Mann-Whitney. La curva media (\pm error estándar) obtenida de las concentraciones salivales para hombre y mujer se muestran en la figura 4.5.

	T_{max}^2 (h)	C_{max} (mgL ⁻¹) ¹	AUC ₀₋₂₄ ¹ (mghL ⁻¹)	AUC _{0-∞} (mghL ⁻¹)	k_e (h ⁻¹)	CL/F (L.h ⁻¹ .Kg ⁻¹)	AUC _{EPOX} /AUC _{CBZ}
Hombres	6 (3-8)	1.37 (0.19)	35.2 (8.2)	60.0 (11.6)	0.0189 (0.0046)	0.0767 (0.0170)	0.0626 (0.0123)
Mujeres	5 (2-6)	2.06 (0.16)	38.0 (5.0)	78.6 (18.8)	0.0196 (0.0078)	0.0782 (0.0101)	0.0913 (0.0179)
Sig.	NS	p<0.001	NS	p<0.05	NS	NS	P<0.05

Tabla 5.1 – Comparación de los parámetros farmacocinéticos entre géneros.

1 - valor medio (intervalo de confianza al 95%)

2 - mediana (valores min./max.)

NS: No Significativo

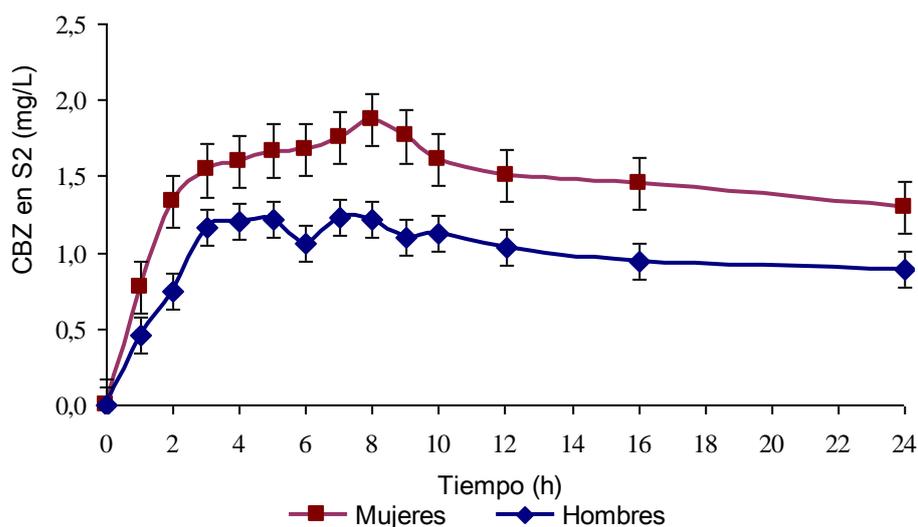


Figura 5.1 - Perfiles medios de concentración de CBZ para ambos sexos.

5.5- DISCUSIÓN

Aún cuando no se encontraron diferencias significativas en $T_{m\acute{a}x}$ entre hombres y mujeres (medianas de 5 y 6 h respectivamente), un proceso de absorción más lento parece ser más factible en mujeres de acuerdo a los perfiles de concentración salivales (figura 5.1). Se observa en mujeres un continuado ascenso hasta 8 horas posdosis, en tanto que en hombres esto ocurre hasta las 4 horas.

Se encontraron diferencias significativas en las medias de AUC y $C_{m\acute{a}x}$ entre sexos ($p < 0.05$ y $p < 0.001$). Sin embargo, una vez que los valores individuales fueron corregidos (multiplicados) por los respectivos pesos corporales, las diferencias encontradas desaparecieron, por lo tanto el tamaño corporal fue responsable por las diferencias encontradas. En otras palabras, el CLap de CBZ no presentó diferencias significativas entre géneros (mujeres: $78 \pm 13 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$; y hombres: $77 \pm 21 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$). Las medias de constante de eliminación tampoco mostraron una diferencia significativa (tablas 5.1).

Las no diferencias encontradas en el CL ap pueden significar que la F y el CL no difieren entre sexos, o que ambos varían de la misma manera con este parámetro. Ha sido referenciado que la mujer presenta mayor expresión de MRP2 (Suzuki et al, 2006) en el enterocito y en el hepatocito, por lo que probablemente podrían tener una menor F que los hombres por un metabolismo de primer paso mayor.

Esto puede ser avisado además por el mayor cociente EPOX/CBZ encontrado en mujeres, el cual se explica por mayor contenido de CYP3A4, responsable por la epoxidación (figura 5.2), en el interino que en el hígado (von Ritcher et al, 2004). Si las mujeres presentaran menor F, deberían en consecuencia tener un clearance sistémico menor. Como no se encontraron diferencias en las semividas (tabla 5.1), el menor CL de las mujeres debería ser explicado por un volumen de distribución menor, lo cual es compatible con su menor masa muscular.

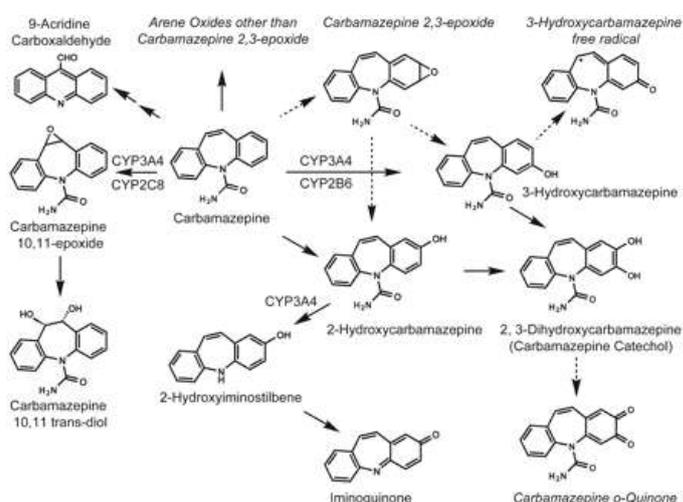


Figura 5.2 - Rutas metabólicas que sufre CBZ mediadas por CYP450 y algunas de las isoenzimas involucradas. CBZ y sus metabolitos hidroxilados pueden ser conjugados con glucurónico para su posterior eliminación.

Representando, en el modelo desarrollado en el capítulo 3, los dos factores discutidos anteriormente, expresión de transportadores y gasto cardíaco podemos elaborar la siguiente representación:

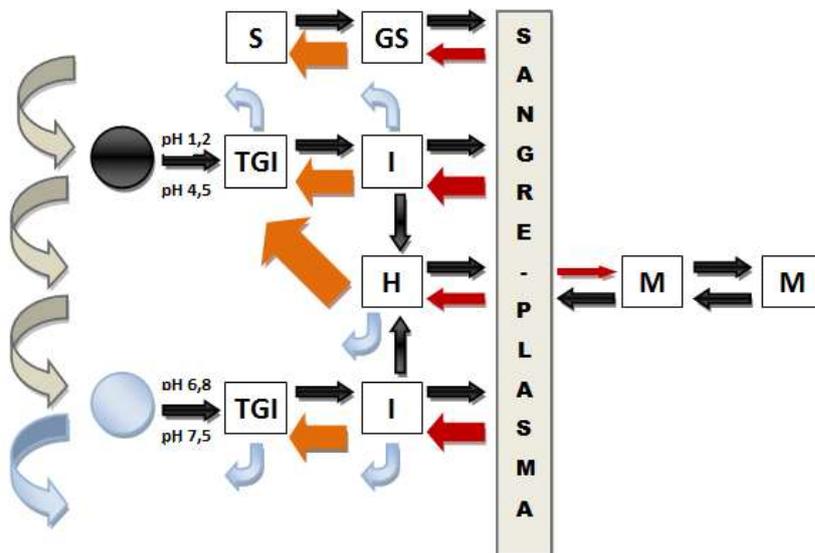


Figura 5.3- Representación del modelo para mujeres. Se destaca alta expresión de transportadores (flechas naranjas), el gasto cardíaco alto hacia intestino y bajo hacia músculo esquelético.

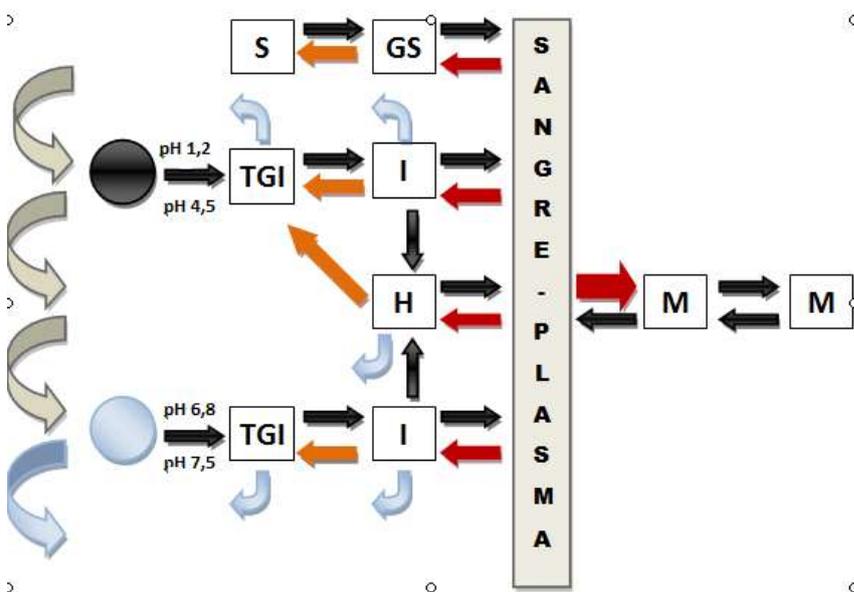


Figura 5.4- Representación del modelo para hombres. Se destaca la menor expresión de transportadores que en el modelo para mujeres (flechas naranjas), el gasto cardíaco bajo hacia intestino y alto hacia músculo esquelético.

Como los transportadores de membrana están involucrados en múltiples procesos metabólicos su rol se erige como clave en el destino de múltiples drogas.

CAPÍTULO 6

Resultados de pacientes en monoterapia con Carbamacepina

6.1- CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DE CARBAMACEPINA

La respuesta farmacológica y su dependencia de los transportadores implican estudiar a las bombas de eflujo en el escenario donde adquieren gran relevancia: la clínica.

De los posibles grupos de pacientes que pueden ver afectada su terapéutica farmacológica por el cambio en la expresión y/o actividad de transportadores se encuentran los pacientes epilépticos. La combinación del tratamiento farmacológico con las características intrínsecas de la patología hace de estos pacientes una trama difícil de desentrañar.

Además de la sobreexpresión de transportadores en la epilepsia refractaria, existen otros dos aspectos a tener en cuenta en el caso de los pacientes tratados con CBZ: el tratamiento con este fármaco induce la expresión de transportadores (hecho corroborado con voluntarios sanos) y la respuesta farmacocinética a la administración de CBZ depende del género del sujeto, así como también del envejecimiento.

Todos estos aspectos serán estudiados en este capítulo mientras que la sobreexpresión patología-dependiente será tratada en un capítulo posterior.

En este capítulo abordaremos el tratamiento en monoterapia con CBZ, tratando de evaluar si en el escenario clínico podemos establecer paralelismos con lo encontrado en voluntarios sanos.

CBZ es una droga muy utilizada en el tratamiento de diversos tipos de epilepsias, y como se ha mencionado anteriormente ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista farmacodinámico y farmacocinético. La absorción de CBZ tiene lugar en el intestino delgado, gracias a su liposolubilidad atraviesa fácilmente la membrana de enterocitos donde se

enfrenta por primera vez con los transportadores de membrana y con CYP3A4, enzima involucrada en su metabolismo presistémico. Ha sido referenciado que el contenido de CYP3A4 es mayor en intestino que en hígado (von Ritcher et al, 2004), razón por la cual la formación presistémica de EPOX parece ser predominante con respecto a la formación sistémica del mismo (Fagiolino et al, 2006). Como fue mencionado en el capítulo 4 esta ruta compromete al 40 % de la dosis de CBZ, el 60% restante es metabolizado principalmente en hígado por otras isoenzimas del CYP450. CBZ es también sustrato de MRP2 (Geissmann et al, 2004), transportador presente en diversos órganos eliminadores (intestino, hígado y riñón) (Couture et al, 2006), que además determina la extrusión de CBZ por parte de la BHE (Potschka et al, 2003). El propio fármaco induce MRP2 a nivel intestinal y renal por medio del receptor nuclear de pregnano (PXR) (Geissmann et al, 2004).

Es bien conocida la respuesta no lineal de CBZ con la dosis, fenómeno que se adjudica a la autoinducción enzimática a nivel presistémico y sistémico, e influencia no solamente al CL sino también a F (Bernus et al, 1996; Battino et al, 2003). De la discusión planteada en el capítulo 4, otro factor que también podría colaborar a explicar la respuesta farmacocinética no lineal es la inducción de transportadores de eflujo por CBZ.

En lo que respecta al EPOX, su respuesta lineal a la dosis también está condicionada a la heteroinducción dependiente de CBZ la cual impacta no sólo en el CL y en la F del mismo (Fagiolino et al, 2006).

6.2- SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON CBZ UTILIZANDO SALIVA Y PLASMA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.

En el marco del Proyecto que involucró trabajo con voluntarios se incluyó el seguimiento de pacientes utilizando saliva como fluido de monitorización.

Un total de 26 pacientes entre 9 y 49 años en monoterapia con CBZ fueron monitoreados posteriormente a la consulta con el médico tratante.

La extracción de las muestras salivales se realizó en dos fracciones igual que para voluntarios.

Un total de 104 dosificaciones plasmáticas de pacientes entre 16 y 87 años realizadas en la Unidad de Monitoreo de Medicamentos fueron relevadas en el transcurso de esta tesis. Se compararon las dosis normalizadas recibidas por ambos sexos y las concentraciones plasmáticas producto de dichas dosis. Resultó también de relevancia la categorización de los pacientes según su franja etaria y las comparaciones de dosis y concentraciones se realizaron para individuos mayores de 50 años y menores de 40 años.

Para verificar si en pacientes se mantiene la dependencia de la expresión de los transportadores de eflujo de CBZ género-dependiente, el tratamiento de los datos obtenidos se realiza comparando las dosis normalizadas recibidas por hombres respecto a mujeres.

La dependencia de la expresión de los transportadores de eflujo de CBZ concentración – dependiente se determinó por la correlación entre la relación S1/S2 con S2.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0.

6.3- RESULTADOS

6.3.1- COMPARACIÓN DE LAS DOSIS NORMALIZADAS Y CONCENTRACIONES DE CBZ EN S2 ENTRE SEXOS

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	15	19.3398	7.75868	2.00328
	M	11	10.7765	4.03917	1.21786
Conc. S2 (mg/L)	F	15	1.8213	0.56922	0.14697
	M	11	2.0027	0.89711	0.27049

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior		Superior
Dosis norm	1	3.593	0.070	-3.33	24	0.003	8.56255	2.56991	3.2585	13.8666
	2			-3.65	22.0	0.001	8.56255	2.34442	3.7011	13.4240
Conc. S2	1	1.593	0.219	0.613	24	0.534	-0.18139	0.28744	-0.775	0.412
	2			0.589	15.8	0.569	-0.18139	0.30784	-0.835	0.472

Tablas 6.1 - Comparación de las dosis normalizadas y concentraciones de CBZ en S2 entre géneros. 1- asumiendo varianzas iguales, 2- no asumiendo varianzas iguales.

De la comparación estadística de las dosis normalizadas por kilogramo de peso entre géneros se aprecia que las recibidas por mujeres son significativamente mayores que las recibidas por hombres, en general debido al menor peso medio presentado por las primeras. Para comparar las concentraciones de estado estacionario alcanzadas con las dosis administradas a cada género, se decidió comparar la concentración en S2 pues como se

explicó en el capítulo anterior esta fracción es la que mejor se relaciona con la concentración libre en plasma.

Los resultados muestran que ambos sexos presentan concentraciones que no difieren significativamente, a pesar de la gran diferencia en las dosis recibidas.

Para plasma se realizaron las mismas comparaciones que para las dosificaciones salivales (ver tablas 6.2).

6.3.2- COMPARACIÓN DOSIFICACIONES PLASMÁTICAS ENTRE SEXOS

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	66	14.1772	5.81976	0.71363
	M	40	14.1592	5.78669	0.91500
Conc (mg/L)	F	66	7.2177	2.29201	0.28213
	M	40	9.3980	3.78538	0.59852

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior		Superior
Dosis norm	1	1.189	0.278	0.015	104	0.988	0.01794	1.1637	-2.290	2.326
	2			0.015	82.8	0.988	0.01794	1.1621	-2.293	2.329
Conc	1	12.04	0.001	-3.70	104	0.000	-2.18027	0.5896	-3.349	-1.011
	2			-3.29	56.6	0.002	-2.18027	0.6619	-3.505	-0.855

Tablas 6.2 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones plasmáticas de CBZ entre géneros. 1- asumiendo varianzas iguales. 2- no asumiendo varianzas iguales.

Los resultados en plasma acompañan los resultados obtenidos en saliva, es decir existe diferencia en la respuesta farmacocinética entre sexos. Sin embargo, en las comparaciones plasmáticas, las dosis recibidas no difieren significativamente y las concentraciones si.

Ha sido referenciado, que tanto las enzimas como los transportadores de eflujo parecen responder a diferencias en los niveles de hormonas sexuales (Suzuki et al, 2006). Sin embargo, en un artículo reciente publicado por Simon et al (2006) se concluye que la expresión de MRP2 está regulada por la hormona del crecimiento y su patrón de secreción. Es decir, en ausencia de hormona de crecimiento la expresión de MRP2 disminuye y la

secreción constante (que ocurre en hembras) promueve mayor expresión que la secreción pulsátil (típica de machos) por lo tanto, las hormonas sexuales aportan un patrón sexualmente dimórfico en la expresión de este transportador. La hormona del crecimiento se secreta en mayor cantidad hasta aproximadamente los 20 años y luego sufre caídas del 14% por cada década de vida (Kargi & Merriam, 2011). Esta es la razón por la cual se decidió dividir a la población. La década que va desde los 40 a los 50 años implica variables niveles de hormonas sexuales (mujeres sobretodo), por lo tanto no fue tomada en cuenta al momento de las comparaciones. Los pacientes fueron divididos entonces según fueran menores de 40 o mayores de 50 años. La mayoría de las mujeres menores de 40 años mantendrían ciclos hormonales infradianos (cada 28 días) y en el caso de los hombres, las concentraciones de testosterona no sufrirían modificaciones. A partir de los 50 años en los hombres comenzarían a descender los niveles de testosterona y un alto porcentaje de mujeres estarían en la etapa menopáusica (niveles de estrógenos y progestágenos descendidos).

6.3.3- COMPARACIÓN ENTRE HOMBRES Y MUJERES MENORES DE 40 AÑOS

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	49	16.1873	5.70175	0.81454
	M	13	16.8940	5.63022	1.56154
Conc. (mg/L)	F	49	6.6918	1.94517	0.27788
	M	13	9.6562	4.52462	1.25490

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Dosis norm	1	0.196	0.059	-0.40	60	0.692	-0.70672	1.77439	-4.256	2.843
	2			-0.40	19.1	0.693	-0.70672	1.76122	-4.392	2.979
Conc.	1	16.85	0.000	-3.56	60	0.001	-2.96432	0.83255	-4.630	-1.299
	2			-2.31	14.0	0.038	-2.96432	1.28530	-5.737	-0.192

Tablas 6.3 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones plasmáticas de CBZ entre hombres y mujeres menores de 40 años. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo iguales.

De lo observado en las tablas 6.3 se concluye que para la población de sujetos menores de 40 años no se encuentra diferencia entre las dosis que reciben ambos sexos pero si en las concentraciones que producen.

6.3.4- COMPARACIÓN ENTRE HOMBRES Y MUJERES MAYORES DE 50 AÑOS

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	8	18.7610	8.31064	2.93826
	M	17	13.3852	6.13939	1.48902
Conc. (mg/L)	F	8	8.8775	2.99505	1.05891
	M	17	9.5588	3.66266	0.88833

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior	Superior	
Dosis norm	1	0.179	0.676	1.82	23	0.081	5.37578	2.94686	-0.720	11.471
	2			1.63	10.7	0.132	5.37578	3.29401	-1.895	12.646
Conc.	1	0.212	0.650	-0.46	23	0.652	-0.68132	1.48907	-3.762	2.399
	2			-0.49	16.7	0.628	-0.68132	1.38218	-3.601	2.238

Tablas 6.4 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones plasmáticas de CBZ entre hombres y mujeres mayores de 50 años. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

De lo observado en las tablas 6.4 se concluye que para la población de sujetos mayores de 50 años no se encuentra diferencia ni en las dosis ni en las concentraciones que reciben y producen ambos sexos respectivamente.

De lo expuesto en las tablas 6.3 y 6.4 se desprende que la diferencia entre ambos géneros se encuentra en aquellos pacientes menores de 40 años. Si la hormona del crecimiento y las hormonas sexuales condicionan la expresión de MRP2 entonces el descenso de las mismas trae aparejado una farmacocinética similar para CBZ en aquellos pacientes mayores de 50 años.

6.3.5- COMPARACIÓN S1/S2 ENTRE GÉNEROS

Sexo	N	Media S1/S2	Desviación tip.	Error tip. Media
F	12	1.0756	0.13707	0.03957
M	11	1.0324	0.08287	0.02499

Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias							
F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia		
							Inferior	Superior	
1	1.477	0.238	0.664	21	0.514	0.0432	0.04780	-0.068	0.131
2			0.679	18.3	0.506	0.0432	0.04680	-0.066	0.130

Tablas 6.5 – Comparación de las relaciones S1/S2 entre hombres y mujeres. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

De lo expuesto en la tablas 6.5 se aprecia que no existe diferencia significativa en las relaciones S1/S2 entre géneros.

6.3.6- COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE EPÓXIDO EN SALIVA ENTRE GÉNEROS

Sexo	N	Media Conc EPOX en S2 (mg/L)	Desviación tip.	Error tip. Media
F	11	0.9360	0.39076	0.12357
M	8	0.5484	0.30398	0.10747

Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias							
F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia		
							Inferior	Superior	
1	0.231	0.637	2.30	16	0.035	0.38762	0.16859	0.0302	0.0745
2			2.37	15.9	0.031	0.38762	0.16377	0.0404	0.0735

Tablas 6.6 – Comparación de las concentraciones de EPOX entre sexos. 1- asumiendo varianzas iguales. 2- no asumiendo varianzas iguales.

Lamentablemente es menor el número de determinaciones de EPOX, sin embargo, la diferencia encontrada entre géneros es sustancial, presentando el sexo femenino concentraciones cercanas al doble de las que presentan los hombres.

6.3.7- RELACIÓN S1/S2 CON S2 DE CBZ

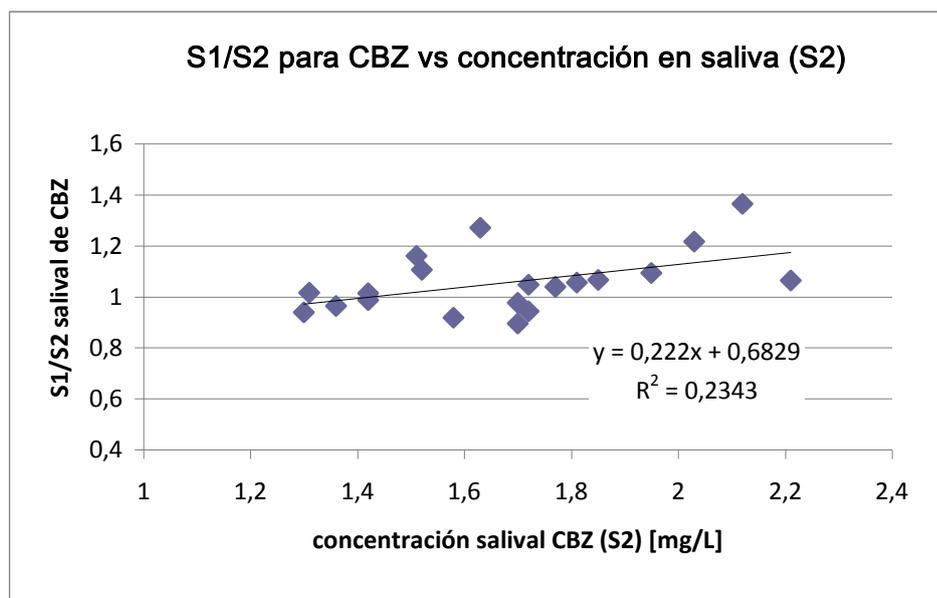


Figura 6.1 – La figura muestra la correlación entre la relación S1/S2 y la concentración de CBZ en S2.

De lo observado en la figura se desprende que relación S1/S2 aumenta con la concentración de CBZ, lo cual al igual que en voluntarios estaría demostrando que CBZ induce la expresión de MRP2 de forma concentración dependiente. La dependencia con el tiempo no pudo ser corroborada pues los pacientes no fueron monitoreados desde el principio de su terapia y tampoco se ensayaron diferentes dosis durante el tratamiento.

Los resultados obtenidos en pacientes acompañan los encontrados en voluntarios.

La dosis normalizada media recibida por las pacientes de sexo femenino es significativamente mayor que la media de dosis normalizada recibida por hombres, sin embargo la concentración de CBZ presente en la fracción S2 no es significativamente mayor (tablas 6.1). En otras palabras, si la dosis media recibida es mayor en mujeres y la concentración hallada no acompaña esta diferencia, las mujeres tienen por algún mecanismo una eliminación mayor o una biodisponibilidad menor. En referencia al plasma (tablas 6.3) no hay diferencia significativa en las dosis recibidas entre ambos sexos pero si se observaron significativas diferencias en las concentraciones presentando las mujeres concentraciones

menores. Estas diferencias en concentraciones desaparecen luego de los 50 años (tablas 6.4).

Para poder conceptualizar mejor la discusión de las posibles causas de lo observado, resulta útil ahora citar referencias bibliográficas respecto al tema:

- CYP3A4 se encuentra en mayor porcentaje en el enterocito que en el hepatocito (von Ritcher et al, 2004). No hay referencias que sugieran diferencias entre género a nivel de enterocito.
- MRP2 está presente en forma importante en el enterocito en el canalículo hepatobiliar en mayor proporción en mujeres (Shugarts & Benet, 2009).
- En tratamiento crónico CBZ es metabolizada en un 40% por CYP3A4 rindiendo EPOX, 3% es eliminado inalterado en orina y el 57 % restante es metabolizado hepáticamente por diferentes enzimas (figura 5.2).
- El flujo sanguíneo en la zona intestinal es mayor en las mujeres por su menor de porcentaje masa muscular.
- La relación entre el metabolismo de CBZ y su EPOX, responde al siguiente cuadro (Fagiolino et al, 2006).

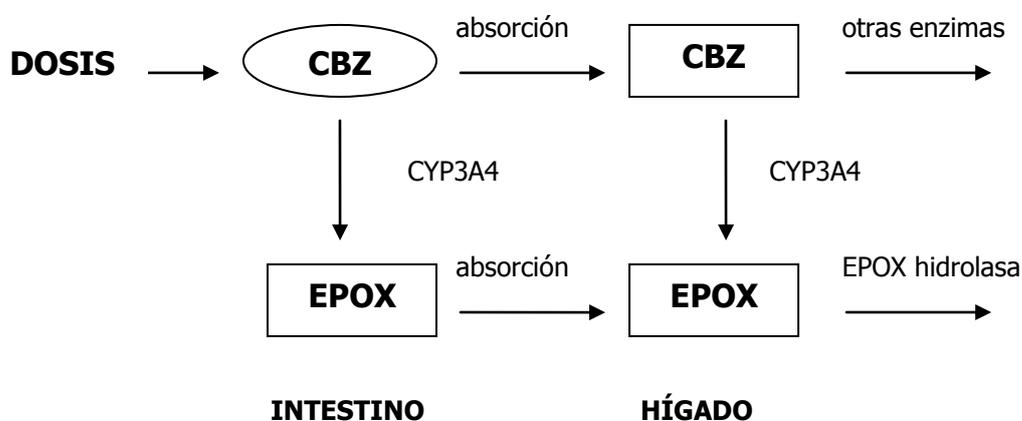


Figura 6.2 – La figura muestra la formación de EPOX a nivel presistémico y sistémico

- La formación de EPOX a nivel hepático representaría sólo un 10% de la dosis de CBZ, siendo la mayor responsable de su formación la metabolización intestinal (Fagiolino et al, 2006).

Si la proporción de CYP3A4 es mucho mayor en el enterocito respecto al hígado y en el caso de las mujeres existe una mayor proporción de MRP2 a nivel del canalículo hepatobiliar y un mayor flujo intestinal, las mujeres podrían tener mayor metabolismo de CBZ por CYP3A4 a nivel intestinal porque los transportadores de eflujo estarían extruyendo el fármaco desde el

hepatocito hacia el enterocito en mayor proporción que los hombres. Dicha suposición se ve afirmada por la mayor concentración de EPOX encontrada en mujeres (tablas 6.6), ya que el mismo tiene origen en el metabolismo intestinal mayoritariamente.

El otro parámetro que podría condicionar las concentraciones de CBZ en ambos sexos es la F , la misma podría verse disminuida en mujeres debido a la mayor expresión de MRP2 en el enterocito y a la alta proporción de CYP3A4 en el mismo, lo cual se ve corroborado por la mayor concentración de EPOX que presentan las mismas.

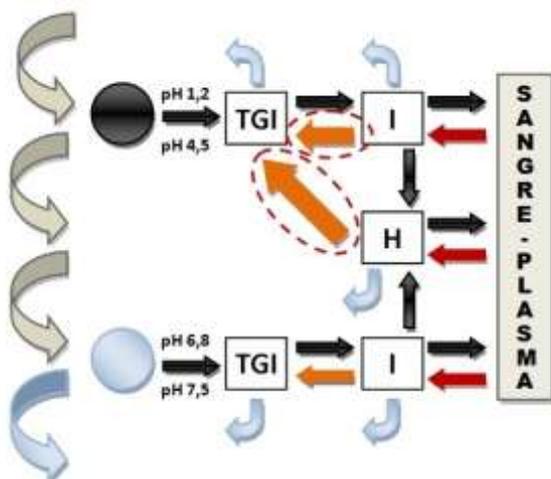


Figura 6.3 - Se resalta en el modelo la mayor expresión de MRP2 en mujeres en los canalículos hepatobiliares, lo cual lleva a CBZ desde el hígado a una zona más rica en CYP3A4, el intestino.

Las hipótesis de CL aumentado o F disminuida se ven respaldadas por los fenómenos del envejecimiento donde mujeres y hombres eliminarían sus diferencias en virtud de reducidas expresiones de MRP2, y de que los CL intestinales se equiparan dado que la mujer reduce la fracción sanguínea destinada a esta región.

Una consecuencia relevante de la inducción es la relación que puede establecerse entre la misma y la cinética no lineal presentada por CBZ.



Figura 6.4 - Curva que relaciona dosis de CBZ y concentración de CBZ. La pendiente de esta gráfica es F/CL por lo que la cinética no lineal de CBZ puede explicarse por un aumento del CL, disminución de F o ambos.

En vista de los resultados encontrados en voluntarios, el aumento de la expresión de MRP2 dependiente de la concentración de CBZ implicaría que si bien la inducción enzimática puede tener lugar, hay otro mecanismo que suma al descenso del cociente. Analizando primero el parámetro F , el aumento en la expresión de transportadores junto con la inducción de las enzimas a nivel del enterocito implicaría una disminución en la saturación de CYP3A4 y por lo tanto un trabajo más eficiente de la misma, lo cual redundaría en una disminución de F .

Desde el punto de vista del CL , teniendo en cuenta que la mayor expresión relativa de CYP3A4 es a nivel intestinal, la expresión aumentada de MRP2 en el canalículo hepatobiliar determinaría el pasaje de la droga del hepatocito a una célula con un poder metabolizador mayor en la formación de EPOX: el enterocito.

Estos dos factores explican la cinética no lineal de CBZ, especialmente cuando la misma es comparada con la de otro fármaco, también inductor enzimático pero con cinética bien disímil, DFH, como se discutió en el capítulo 3.

Otra consecuencia importante de esta inducción es la posible falla terapéutica a la que puede llevar si la misma se verificara a nivel de la BHE, donde conduciría a menores concentraciones de CBZ en el sitio de acción.

De los resultados obtenidos en pacientes, se observa también que la expresión de MRP2 seguida a través de la relación $S1/S2$ se ve modificada por la concentración de CBZ. Se corrobora de esta forma, lo encontrado en voluntarios, CBZ ejerciendo inducción en la expresión de transportadores de una forma dependiente de la concentración. No obstante haber corroborado en pacientes lo ya observado en voluntarios sanos respecto a la inducción concentración dependiente, el cociente $S1/S2$ no fue capaz de distinguir la diferente expresión de MRP2 que naturalmente se da entre géneros. La discusión de esta aparente incapacidad demostrada por el biomarcador propuesto para la fenotipificación de la expresión de transportadores será retomada en siguientes capítulos.

CAPÍTULO 7

Resultados de pacientes en monoterapia con Fenitoína

7.1- CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DE FENITOÍNA

La fenitoína (DFH) está aprobada para el uso en el control del status epiléptico y en la prevención de crisis relacionadas a eventos traumáticos, aunque en muchos países ya no se considera como fármaco de primera elección. El estrecho rango terapéutico poblacional, las consecuencias clínicas de presentar concentraciones subterapéuticas o tóxicas, y la dificultad de determinar los parámetros farmacocinéticos para cada paciente, predisponen al clínico a seguir la terapia con este anticonvulsivante a través de una frecuente determinación de concentraciones plasmáticas en el paciente.

El primer obstáculo que enfrenta la DFH cuando es administrada por vía oral es su disolución, pues precipita al pH intestinal, lo cual condiciona su entrada al organismo. Si este obstáculo es bien sorteado puede presentar una biodisponibilidad cercana al 90%, lo cual implica que además de la gran lipofilia que presenta, el metabolismo a nivel del enterocito es bajo.

Una vez biodisponible la DFH atraviesa fácilmente membranas, lo cual facilita la entrada al sitio de acción (SNC). La mayor ruta de eliminación de DFH es la 4-hidroxlación mediada principalmente por CYP2C9 y en menor medida por CYP2C19, con posterior glucuronidación (Nakajima et al, 2002). Estas isoenzimas se encuentran en una relación de expresión 10:1 – hígado:intestino, sin embargo la gran superficie de contacto que ofrece el duodeno y el

trabajo en conjunto con los transportadores llevaría a no despreciar el metabolismo intestinal.

Como ha sido ampliamente mencionado no existe linealidad entre la concentración plasmática de DFH y la posología que reciben los pacientes. Se dice habitualmente que la reacción enzimática por la cual es eliminada presenta una velocidad limitada por saturación de las enzimas hepáticas y que por lo tanto DFH sigue una cinética de Michaelis-Menten.

Existen referencias de que DFH es capaz de inducir su propio metabolismo (Chaudhry et al, 2010) y en forma similar a la CBZ, DFH induce además la expresión de MRP2 por activación de los receptores de pregnano y androstano a nivel nuclear (Hongakoski, 2003). Considerando que DFH es también sustrato de MRP2 (Potschka, 2003), su habilidad para inducir la expresión de CYP2C y MRP2 despierta controversias acerca de la capacidad de eliminación limitada que presenta con respecto a la dosis. Resulta a su vez extraña la posibilidad de que se sature una enzima que al mismo tiempo pueda ser inducida por el propio fármaco.

Una revisión de la bibliografía muestra que en un estudio diseñado por Jung et al. (1980) la administración de una dosis única intravenosa de 15 mg/kg de DFH (aproximadamente 1200 mg) confirma una cinética saturable. Sus resultados muestran que graficando las concentraciones plasmáticas (transformadas logarítmicamente) en función del tiempo, se observan 2 pendientes, es decir, un progresivo aumento de la velocidad de eliminación en el transcurso del tiempo, lo cual ameritó informar un clearance concentración-dependiente con parámetros característicos de dicho comportamiento cinético según los siguientes valores: $K_m = 9.43 \text{ mg/L}$; $V_{m\acute{a}x} = 8.25 \text{ mg/kg/día}$. Por lo tanto los autores reafirmaron en dosis única intravenosa la clásica cinética de Michaelis-Menten que se reporta para DFH cuando se administra en tratamientos crónicos.

Sin embargo, en otros estudios realizados tras la administración de dosis únicas orales comprendidas entre 100 y 300 mg de DFH, se observó una respuesta farmacocinética lineal con disminución de la velocidad de absorción, pero no en la cantidad absorbida, a medida que se incrementa la dosis administrada (Rojanasthien et al, 2007). Es decir, las AUC de concentraciones plasmáticas de la droga estuvieron en proporción con las dosis recibidas y la semivida de eliminación se mantuvo constante e independiente de las mismas (12-13h). La administración de dosis únicas comprendidas entre 400 y 1600 mg mostró una pérdida progresiva de biodisponibilidad explicada por una incompleta disolución en el tracto digestivo, cada vez más evidente con el aumento de la dosis (Jung et al, 1980). Resultó claro el progresivo retardo en alcanzar las máximas concentraciones plasmáticas ($C_{m\acute{a}x}$) cuando

se administran dosis altas en una sola toma, fruto de la saturación del fluido intestinal cuando se disuelve la droga y del consecuente cambio de cinética de absorción (disolución dependiente) pasando de orden 1 a orden 0. Sin embargo, la dosis de 1600 mg administrada en forma fraccionada, 400 mg cada 3 horas, recuperó la biodisponibilidad registrada para dosis bajas y permitió alcanzar una $C_{máx}$ acorde con el pronóstico lineal de concentración versus dosis.

Existen fuertes evidencias que acreditan una importante secreción de DFH desde la sangre hacia el tracto digestivo, tras lo cual la droga volvería a entrar al organismo desde la luz intestinal. Observaciones de segundos picos de concentraciones plasmáticas luego de administrar dosis intravenosas de DFH (Handley, 1970; Glick et al, 2004) constituyen fuertes argumentos para afirmar la importante contribución de la recirculación entre medio interno y lumen gastrointestinal en la farmacocinética de esta droga. Tan es así que la intoxicación con DFH fue exitosamente resuelta mediante la administración oral de carbón activado (Howard et al, 1994), resultando ser un eficiente mecanismo para reducir la exposición plasmática de la droga e incrementar su depuración sistémica (Mauro et al, 1987).

Estas evidencias posan un manto de duda sobre el aumento de la velocidad de eliminación registrado tras la administración intravenosa de 1200 mg en única dosis, según se mencionó previamente, dado que muy probablemente el perfil de concentraciones plasmáticas estuviese encubriendo reabsorciones de DFH, cada vez menos intensas a medida que pasa el tiempo, a causa de las menores concentraciones remanentes en el cuerpo que se estarían naturalmente dando por la progresiva biotransformación.

Una explicación alternativa para el incremento de la velocidad de eliminación tras la dosis intravenosa de DFH podría elaborarse en base a la capacidad inductora que esta droga posee sobre diferentes enzimas, incluidas aquellas de su propio metabolismo, fenómeno que se manifestaría a los pocos días de activada la biosíntesis de ARN mensajero que codifica la correspondiente proteína (Gerk et al, 2002). Sin embargo, esta hipótesis debería descartarse por no encajar adecuadamente con la acumulación dosis (concentración) – dependiente que se observa durante el tratamiento en dosis múltiple, que como ya se ha dicho acumula más de lo previsible y no menos, como debiera ser, si la inducción enzimática fuera la causa de la farmacocinética no lineal del fármaco.

En virtud de las inconsistencias antes mencionadas se ha propuesto recientemente una hipótesis (Fagiolino et al, 2011) que cuestiona la causa auto-inhibitoria de la cinética concentración-dependiente de DFH, y en su lugar se promueve una causa relacionada con su capacidad inductiva, no ya a nivel enzimático sino a nivel de los transportadores de eflujo que rigen la transferencia hepatobiliar y el pasaje hacia la luz intestinal desde los enterocitos. El transportador involucrado sería MRP2 (Potschka et al, 2003) y mediante esta bomba de eflujo se estaría secretando la droga de manera importante hacia la luz del tracto digestivo, propiciando así la aparición de picos secundarios incluso tras su administración intravenosa. La inducción de su expresión haría enlentecer la absorción oral de DFH, hecho que se registra notoriamente cuando se analizan los perfiles plasmáticos del fármaco durante el intervalo de administración en régimen de dosis múltiples, los cuales son mucho menos agudos que los perfiles observados tras dosis únicas. Por otra parte, la desviación de la droga desde el hígado hacia el intestino evitaría la mayoritaria biotransformación que tiene lugar en el hepatocito, dada la mayor abundancia de enzimas CYP2C9 y CYP2C19 allí presentes en relación con la existencia en los enterocitos, reduciéndose así el CL de manera concentración-dependiente tal como se verifica durante los tratamientos crónicos. En otras palabras, la cinética no lineal encontrada para este fármaco no se correspondería a una saturación enzimática sino a una inducción en la expresión de transportadores.

Lo que sigue en este capítulo aporta evidencias experimentales que sustentan la hipótesis de la inducción del transporte de eflujo como base para explicar la respuesta no lineal de DFH.

7.2- SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON DFH UTILIZANDO PLASMA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.

Un total de 321 dosificaciones plasmáticas de pacientes entre 18 y 92 años realizadas en la Unidad de Monitoreo de Medicamentos fueron relevadas en el transcurso de esta tesis.

Se compararon las dosis normalizadas recibidas por ambos sexos y las concentraciones plasmáticas producto de dichas dosis. Luego de este primer estudio resultó de relevancia la categorización de los pacientes según su franja etaria y las comparaciones de dosis y concentraciones se realizaron para individuos mayores de 50 años y menores de 40, tal cual fue explicado en el capítulo anterior.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 17.0.

7.3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1- COMPARACIÓN DE HOMBRES Y MUJERES

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm. (mg/kg)	F	154	5.1108	1.51180	0.12182
	M	167	4.5342	1.13740	0.08801
Conc. (mg/L)	F	154	14.2699	8.95079	0.72128
	M	167	12.3266	8.83473	0.68365

Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias								
	F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia		
								Inferior	Superior	
Dosis norm	1	6.326	0.012	3.888	319	0.000	0.57657	0.14861	0.2841	0.8689
	2			3.836	283.3	0.000	0.57657	0.15029	0.2807	0.8724
Conc.	1	0.065	0.799	1.957	319	0.051	1.99335	0.99326	-0.011	3.8975
	2			1.955	316.2	0.051	1.99335	0.99379	-0.012	3.8986

Tablas 7.1 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones plasmáticas entre todos los pacientes en monoterapia con DFH. 1- asumiendo varianzas iguales. 2- no asumiendo varianzas iguales

De acuerdo a la significancia obtenida se detectan diferencias en las dosis normalizadas recibidas por ambos géneros pero no en las concentraciones producto de dichas dosis.

7.3.2- HOMBRES Y MUJERES MENORES DE 40 AÑOS

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm. (mg/kg)	F	88	5.3282	1.40388	0.14965
	M	72	4.5446	1.04583	0.12325
Conc. (mg/L)	F	88	13.7386	8.57794	0.91441
	M	72	13.3881	8.98196	1.05853

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Dosis norm.	1	4.265	0.041	3.927	158	0.000	0.78362	0.19954	0.3895	1.1777
	2			4.042	156.7	0.000	0.78362	0.19388	0.4007	1.1665
Conc.	1	1.801	0.182	0.252	158	0.802	0.35058	1.39234	-2.399	3.1006
	2			0.251	148.8	0.802	0.35058	1.39880	-2.413	3.1146

Tabla 7.2 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones plasmáticas para ambos sexos de pacientes menores de 40 años. 1 – asumiendo varianzas iguales. 2 – no asumiendo varianzas iguales.

Si bien existe diferencia significativa de las dosis recibidas por hombres y mujeres esta diferencia no se refleja en las concentraciones que ambos sexos presentan, lo cual nos lleva a confirmar una diferencia de sexo en la farmacocinética de DFH. Parecería que las mujeres tuviesen menor biodisponibilidad y/o mayor clearance sistémico.

7.3.3- HOMBRES Y MUJERES MAYORES DE 50 AÑOS

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. media
Dosis norm. (mg/kg)	F	32	4.6917	1.21120	0.21411
	M	59	4.5224	1.15020	0.14974
Conc. (mg/L)	F	32	13.7709	7.82364	1.38304
	M	59	9.6305	6.04974	0.78761

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Dosis norm.	1	0.052	0.819	0.658	89	0.512	0.16925	0.25726	-0.342	0.680
	2			0.648	60.9	0.520	0.16925	0.26128	-0.353	0.691
Conc.	1	2.805	0.097	2.806	89	0.006	4.14043	1.47554	1.208	7.072
	2			2.601	51.4	0.012	4.14043	1.59158	0.946	7.334

Tablas 7.3 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones de DFH plasmáticas entre ambos sexos en pacientes mayores de 50 años. 1- asumiendo varianzas iguales 2 – no asumiendo varianzas iguales.

Los resultados en esta franja etaria revierten totalmente lo visto para individuos menores de 40 años, lo cual implica desactivación de la causal asignada a las mujeres o una drástica reducción de biodisponibilidad y/o aumento de clearance en los hombres.

Todo hace pensar que la caída de expresión de MRP2 fruto del envejecimiento, revertiría lo observado en mujeres jóvenes aumentando la biodisponibilidad y/o reduciendo el clearance sistémico, al menos intestinal. Si esta reducción de MRP2 operase también en los hombres no quedaría otra alternativa que un aumento del clearance hepático fuese la explicación para la caída de niveles de DFH registrada en los hombres mayores de 50 años, debido a la mayor retención de la droga en los hepatocitos.

A los efectos de confirmar estos supuestos se analizaron las diferencias etarias intragénero.

7.3.4- DIFERENCIAS ETARIAS INTRA GÉNERO

7.3.4.1- MUJERES

	Edad	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm. (mg/kg)	< 40 años	88	5.3282	1.40388	0.14985
	> 50 años	32	4.6917	1.21120	0.21411
Conc. (mg/L)	< 40 años	88	13.7386	8.57794	0.91441
	> 50 años	32	13.7709	7.82364	1.38304

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior	Superior	
Dosis norm.	1	0.328	0.568	2.274	118	0.025	0.63647	0.27990	0.0822	1.1907
	2			2.436	63.3	0.018	0.63647	0.26123	0.1145	1.1584
Conc.	1	0.015	0.904	-0.02	118	0.985	-0.03230	1.7312	-3.461	3.3959
	2			-0.02	59.9	0.985	-0.03230	1.6578	-3.349	3.2842

Tablas 7.4 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones de DFH plasmáticas entre mujeres de diferentes franjas etarias. 1- asumiendo varianzas iguales 2 – no asumiendo varianzas iguales.

Se observa una diferencia significativa en las dosis normalizadas, probablemente debido a que existe un aumento del peso corporal luego de alcanzar la menopausia. No obstante, la

menor dosis por kg de peso que recibe la mujer mayor de 50 años no condujo a una concentración de DFH reducida. Esto estaría mostrando una tendencia al incremento de la concentración con el envejecimiento en la mujer, respaldando la hipótesis de reducción del clearance y/o aumento de biodisponibilidad durante el envejecimiento.

7.3.4.2- HOMBRES

	Edad	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm. (mg/kg)	< 40 años	72	4.5446	1.04583	0.12325
	> 50 años	59	4.5224	1.15020	0.14974
Conc. (mg/L)	< 40 años	72	13.3881	8.98196	1.05853
	> 50 años	59	9.6305	6.04974	0.78761

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior	Superior	
Dosis norm.	1	1.198	0.270	0.115	129	0.909	0.02211	0.19211	-0.358	0.402
	2			0.114	118.7	0.909	0.02211	0.19394	-0.362	0.406
Conc.	1	10.123	0.002	2.898	129	0.007	3.75755	1.36995	1.047	6.468
	2			2.743	124.6	0.005	3.75755	1.31940	1.146	6.369

Tablas 7.5 – Comparación de dosis normalizadas y concentraciones de DFH plasmáticas entre hombres de diferentes franjas etarias. 1- asumiendo varianzas iguales 2 – no asumiendo varianzas iguales.

Los hombres de más de 50 años presentaron concentraciones significativamente menores que los hombres menores de 40 años, aún cuando las dosis que ambas poblaciones recibieron no difirieron significativamente. Los resultados estarían confirmando un aumento del clearance con el envejecimiento de los hombres, que no puede compensarse con un aumento de biodisponibilidad por reducción de los transportadores de membrana, dado que ya en el joven la misma estaría muy cercana al 100%.

Es importante traer a la discusión la implicancia que tiene el flujo sanguíneo relativo a nivel intestinal en la diferencia de clearance según el sexo. La mujer joven por una menor masa muscular admite mayor gasto cardíaco intestinal que el hombre y por ello el clearance sistémico vía enterocito es relevante. La mayor expresión de MRP2, dirigiendo moléculas que

entraron vía hígado hacia la mucosa intestinal, por vertido biliar, juega de una manera dual, por un lado, aumentando la depuración intestinal y por el otro, disminuyendo la depuración hepática. El resultado de ambos eventos, que ocurren en hepatocitos y enterocitos para las moléculas que entraron por hígado, lo denominaremos clearance hepático. Cuando la mujer envejece reduce el gasto cardíaco intestinal como respuesta a un deterioro progresivo de la función miocárdica. Por ello el clearance intestinal debería reducirse. Sin embargo, el clearance hepático podría reducirse, mantenerse incambiado, o incluso aumentarse, en virtud exclusiva de la menor expresión de MRP2, ya que la fracción del gasto que irriga el hígado no cambiaría durante el envejecimiento tanto en hombres como en mujeres. La resultancia incierta del eventual cambio de clearance hepático con la vejez dependerá del aporte relativo que hacen enterocitos y hepatocitos a esta vía de depuración.

En el hombre, con una menor fracción intestinal del gasto cardíaco minimizaría la contribución de este órgano en el clearance sistémico total de DFH, por lo que un descenso del riego relativo intestinal durante el envejecimiento no impactaría significativamente en la reducción de clearance. Sin embargo, el clearance hepático de DFH, mayoritario en este sexo, se incrementaría debido al descenso de MRP2 hepatobiliar, elevando así el clearance sistémico de la droga.

7.4- RESPUESTA NO LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE FENITOÍNA A LAS DOSIS DIARIAS RECIBIDAS POR LOS PACIENTES

Antes de abordar este aspecto sustantivo de la cinética de DFH, conviene precisar que la correspondencia entre ambas variables (concentración y dosis orales) es a través del clearance aparente (CL/F). La respuesta no lineal del tipo Michaelis-Menten supone un progresivo aumento de F/CL , que podría darse por un aumento de F , o una reducción de CL , o ambas cosas. Para DFH, cuya F de por sí es alta, no habría demasiado margen para que operase un aumento de F , pero sí en cambio una reducción de CL .

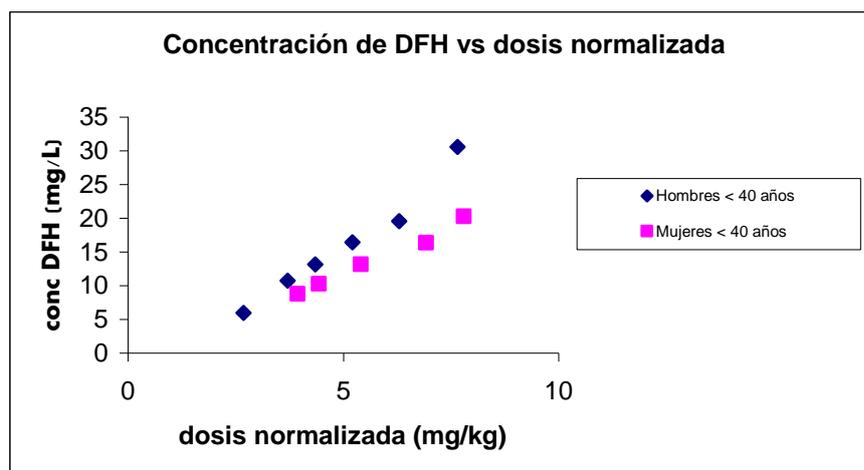


Figura 7.1 – Relación entre la dosis normalizada y la concentración de DFH para hombres y mujeres menores de 40 años.

Es interesante observar las respuestas que ambos sexos (sujetos menores de 40) muestran frente a un progresivo aumento de las dosis diarias. La figura 7.1 permite observar como en el hombre se desarrolla una curvatura típica de la cinética de Michaelis-Menten descrita en la literatura. En cambio la mujer muestra una respuesta casi lineal a las dosis administradas, lo cual podría deberse a un efecto compensatorio de reducción de F al tiempo que se reduce el CL . Es importante destacar que aquí las correcciones por kg de peso no encubren la mayor capacidad inductora que tienen las dosis reales administradas en la mujer, y por consiguiente la inducción que se efectúa a nivel enterocítico puede efectivamente reducir la biodisponibilidad del fármaco.

7.5- SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON DFH UTILIZANDO SALIVA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.

Un total de 22 pacientes entre 15 y 77 años, en monoterapia con DFH fueron monitoreados en saliva posteriormente a su consulta con el médico tratante.

La extracción de las muestras salivales se realizó en dos fracciones como muestra el protocolo del capítulo 4. Se compararon las dosis normalizadas recibidas por ambos sexos y las concentraciones salivales producto de dichas dosis. El procesamiento estadístico de los datos fue llevado a cabo de igual forma que en plasma.

Para verificar si existe dependencia de la expresión de transportadores con el género, se compararon las relaciones $S1/S2$ entre hombres y mujeres, y por último, para estudiar si la

expresión/actividad de los transportadores es afectada por la concentración de DFH, se estudió cómo evoluciona el cociente S1/S2 con el aumento de S2.

7.5.1- DOSIFICACIONES SALIVALES

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	11	4.8691	0.83515	0.25181
	M	11	4.5773	1.20251	0.36257
Conc. S2 (mg/L)	F	11	1.9055	1.04257	0.31435
	M	11	0.8973	0.39368	0.11870

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior	Superior	
Dosis norm	1	3.165	0.090	-0.66	20	0.516	-0.2918	0.4414	-1.213	0.6290
	2			-0.66	17.8	0.517	-0.2918	0.4414	-0.778	0.6362
Conc. S2	1	6.971	0.016	-3.00	20	0.007	-1.0082	-0.3360	-1.709	-0.3073
	2			-3.00	17.9	0.010	-1.0082	-0.3360	-1.735	-0.2811

Tabla 7.6- Comparación de las dosis normalizadas y concentraciones de DFH en S2 entre géneros. 1- asumiendo varianzas iguales, 2- no asumiendo varianzas iguales.

La concentración de DFH en S2 resultó ser significativamente mayor para mujeres que para hombres, cuando la misma dosis fue recibida por ambos sexos. Las dosis registradas en esta comparación resultan similares a las vistas en el tratamiento de datos plasmáticos, lo cual hablaría de una importante transferencia de DFH hacia la saliva en el caso de las mujeres, ya que en plasma las concentraciones no mostraron diferencias significativas entre sexos. Esto podría ser un interesante índice del grado de expresión de MRP2 diferencial entre hombres y mujeres a nivel de la glándula salival, complementado al cociente S1/S2 o incluso sustituyéndolo como se discutirá seguidamente.

7.5.2- COMPARACIÓN S1/S2 ENTRE GÉNEROS

Sexo	N	S1/S2	Desviación tip.	Error tip. Media
M	11	1.0855	0.08153	0.02458
F	11	1.0091	0.08938	0.02695

Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias							
F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia		
							Inferior	Superior	
1	0.411	0.529	2.09	20	0.049	0.07636	0.03648	0.0027	0.15245
2			2.09	19.8	0.049	0.07636	0.03648	0.0023	0.15245

Tablas 7.7 – Comparación de la relación S1/S2 entre géneros. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

Se observa una diferencia significativa de la relación S1/S2 entre hombres y mujeres, presentando estas últimas un menor cociente.

7.5.3- RELACIÓN S1/S2 VS CONCENTRACIÓN DE DFH

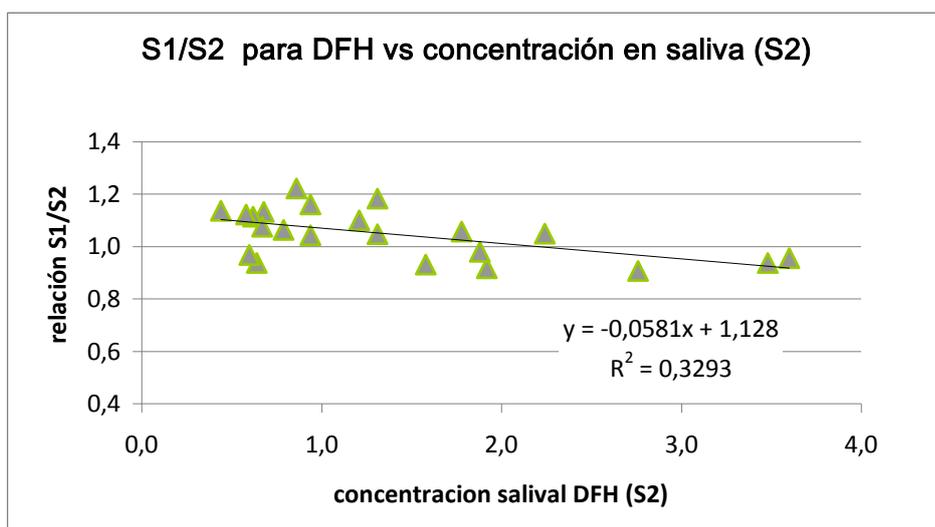


Figura 7.2 – Correlación entre los cocientes S1/S2 y la concentración de DFH en S2.

Los resultados mostrados en la figura 7.2 son opuestos a los registrados en el estudio con CBZ (capítulo 6). Quizás resulte que el cociente S1/S2 sea mejor reflejo de alteraciones en

las concentraciones sistémicas que de inducciones del transporte en la glándula salival. Podría decirse que la concentración en S2, directamente relacionada con la concentración en el plasma arterial (no igual valor pero si consecuencia de las concentraciones arteriales de fármaco), se modificaría como resultado de la capacidad depuradora de órganos que preceden a la glándula salival en la circulación sanguínea (región esplácnica para los casos de CBZ y DFH). El incremento de las dosis diarias traería aparejado para CBZ un aumento del clearance y por ello un aclaramiento más intenso de la sangre en su pasaje por los órganos esplácnicos con el resultado de diluir la sangre arterial de la gran circulación, y por consiguiente de la concentración salival en su porción S2. Esto llevaría entonces a un incremento del cociente S1/S2 para aumentos de la dosis diaria de CBZ.

En cambio para DFH, la progresiva reducción del clearance sistémico con el aumento de las dosis diarias conduciría a un resultado opuesto, es decir, menor dilución de la sangre arterial y por ende menor cociente S1/S2 a medida que se aumentan las dosis recibidas por los pacientes.

Tomando esta explicación como válida interpretación del cociente S1/S2, correspondería mencionar que el mayor valor observado en hombres, a igualdad de dosis diaria con la mujer, estaría demostrando un mayor clearance sistémico del hombre frente a la mujer. Cabría preguntarse por qué no se registraron mayores concentraciones plasmáticas de DFH en mujeres jóvenes en relación a hombres jóvenes, dado que los pacientes monitoreados en saliva son mayoritariamente menores de 40 años. La explicación podría encontrarse en la menor biodisponibilidad de ellas frente a los pacientes varones.

Este resultado adquiere una trascendencia especial en la medida que sería una forma original de desligar el clearance de la biodisponibilidad de un fármaco, cuando se miden concentraciones sistémicas de la droga.

El similar cociente entre géneros para CBZ encontrado en el capítulo anterior revelaría una disímil biodisponibilidad entre los géneros como causante de la diferencia encontrada en las concentraciones.

Habría que tener muy presente que si bien la corrección de las dosis por el peso de los pacientes intenta hacer comparables los resultados, estaríamos quizás alterando el significado de los mismos. En general las formulaciones de medicamentos orales no permiten hacer un adecuado tratamiento posológico por peso del individuo, y por lo tanto las mujeres normalmente reciben mayores dosis por kg de peso que los hombres. En drogas como las

estudiadas en esta tesis, las cuales son inductoras de transportadores, esas mayores dosis que reciben las mujeres pueden originar concentraciones locales en la región esplácnica mayores y por tanto con mayores poderes inductivos, lo cual podría llevar a concentraciones que luego se comparan corrigiendo por la dosis, en un escenario que no condice con la real capacidad inductora que se tuvo, haciendo del sexo una variable de análisis cuando en realidad se conjugan sexo y dosis al mismo tiempo.

7.6- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CONTEXTO DEL CONOCIMIENTO ACTUALMENTE VIGENTE A NIVEL INTERNACIONAL.

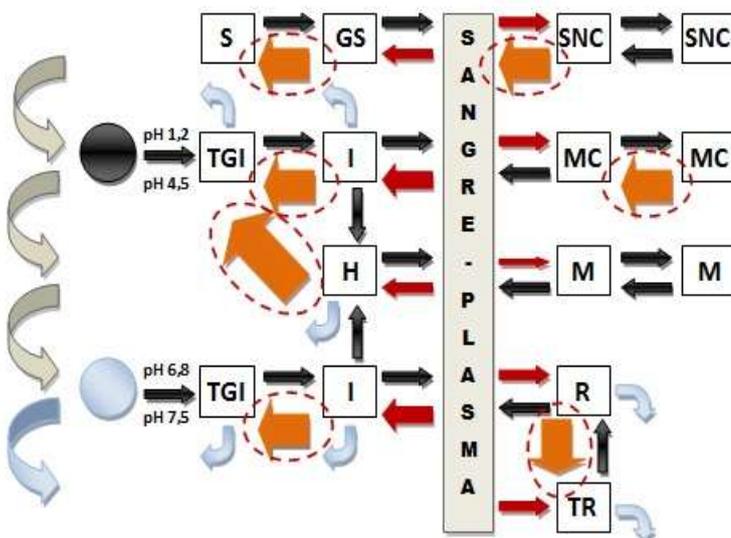
La cinética de DFH caracterizada hace más de 40 años ha sufrido poco estudio en los años recientes pues se dio por sentado que la cinética de Michaelis-Menten acompañaba perfectamente la saturación enzimática a la que supuestamente está sujeto su CL. Sin embargo, en vista de los resultados obtenidos en este trabajo y en el de otros autores, hoy en día se puede cuestionar el porqué de la cinética presentada por este fármaco.

De acuerdo a lo expuesto en este capítulo la cinética no lineal de DFH en tratamiento crónico responde a una inducción en la expresión-actividad de los transportadores lo cual se observa en el modelo para ambos géneros de la siguiente forma:

Figura 7.3 a – Representación del modelo para mujeres jóvenes.

Se muestra en esta figura la expresión de MRP2 aumentada en mujeres, flechas anaranjadas engrosadas, secundada también por la inducción fármaco dependiente (círculos punteados).

Se resalta el menor flujo sanguíneo muscular (afinamiento flecha roja) y como esto beneficia el flujo hacia la región intestinal (engrosamiento de flecha roja).



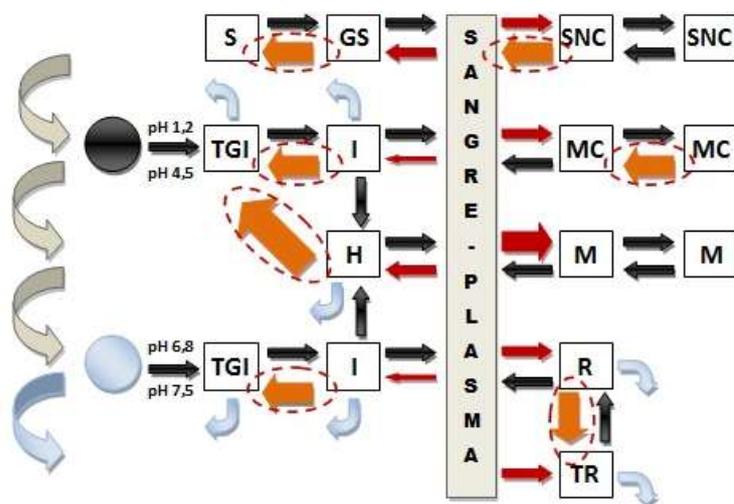


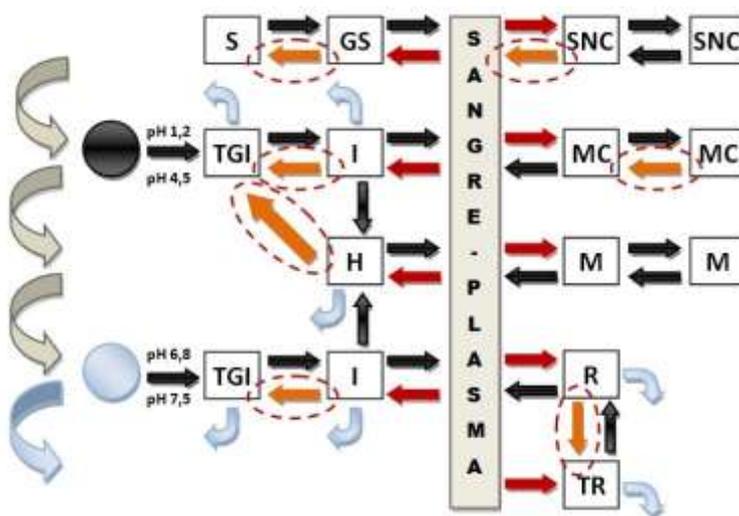
Figura 7.3 b – Representación del modelo para hombres jóvenes.

Se muestra en esta figura la expresión de MRP2 aumentada por la inducción fármaco- dependiente en hombres (círculos) y el aumento de flujo sanguíneo al músculo esquelético en detrimento del flujo sanguíneo intestinal (engrosado y afinado de flechas rojas respectivamente)

Como consecuencia del envejecimiento la expresión-actividad de los transportadores desciende, los efectos en el modelo para ambos sexos repercuten de la siguiente forma:

Figura 7.4. Representación del modelo para mujeres viejas / hombres viejos

La figura muestra la disminución de transportadores dependiente de la edad en mujeres y hombres. Se mantiene la inducción ejercida por el fármaco. El flujo intestinal disminuye en mujeres y se mantiene bajo en hombres. El flujo hepático se mantiene para ambos sexos. En hombres el flujo a músculo esquelético disminuye notoriamente.



Si bien estaríamos en condiciones de afirmar que la típica cinética de DFH no es producto de saturaciones enzimáticas, desde el punto de vista clínico, los ajustes posológicos pueden seguir realizándose según la conocida ecuación de Michaelis-Menten pues la misma se ajusta bien a los datos experimentales.

CAPÍTULO 8

Resultados de pacientes en monoterapia con Ácido Valproico

8.1- CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DEL ÁCIDO VALPROICO

El DPA, un ácido carboxílico de cadena corta, es un fármaco ampliamente utilizado en epilepsia por el amplio espectro de actividad que posee, destacando además el auge que su aplicación ha tenido en patologías psiquiátricas (manías, desórdenes bipolares).

Luego de su administración oral el valproato de sodio o magnesio (forma en la que se encuentra el principio activo en los comprimidos) es rápidamente convertido a ácido valproico (DPA) en el estómago. Debido a su alta solubilidad y permeabilidad DPA presenta una absorción alta y completa cuando es administrado en comprimidos de liberación inmediata, lo cual lo lleva a presentar alta biodisponibilidad (F). Este parámetro disminuye cuando se administran formas farmacéuticas de liberación prolongada.

Una vez en circulación, DPA presenta una unión proteínas plasmáticas (UPP) variable a las concentraciones terapéuticas, lo cual implica que el porcentaje unido decrece al aumentar la concentración.

Concentración total	Porcentaje libre
< 75 mg/L	7–9%
Aprox. 100 mg/L	15%
> 150 mg/L	30%

Tabla 8.1 – La tabla muestra cómo la fracción libre de DPA aumenta al aumentar las concentraciones totales del fármaco en plasma.

El cambio en la UPP modifica el clearance plasmático total, mayoritariamente hepático, de la droga desde el torrente sanguíneo, solamente un 3% se elimina incambiado en orina.

Más de 10 metabolitos han sido identificados en plasma y orina y al menos 5 de ellos (2-en-DPA, 3-keto-DPA, 3-hidroxi-DPA, 4-hidroxi-DPA y 5-hidroxi-DPA) poseen actividad, algunos incluso equivalente a la droga madre. Estos metabolitos contribuyen no solamente a su eficacia sino también a su toxicidad. Dos observaciones apoyan la suposición de que los metabolitos contribuyen a los efectos farmacológicos:

- Los efectos farmacológicos del DPA no se correlacionan de buena manera con la concentración del mismo en estado estacionario.
- El curso de los efectos farmacológicos difiere del que sigue la farmacocinética del DPA, en otras palabras, los efectos completos del fármaco no son vistos hasta algún tiempo después de alcanzado el estado estacionario y persisten aún después de que la droga ha sido discontinuada.

La figura 8.1 muestra las múltiples vías de eliminación por metabolización que sufre el DPA, el mismo es metabolizado por enzimas microsomaes y mitocondriales hepáticas. Dentro del sistema microsomal se encuentran las enzimas del sistema CYP450, CYP2C19 y CYP2C9 responsables de la ω y ω 1 oxidaciones de DPA (15%), el 4-en-DPA, uno de los productos de estas oxidaciones, ha sido relacionado con la toxicidad hepática, muy relacionada a los tratamientos crónicos con DPA especialmente en niños (Perucca et al, 2002). También a nivel microsomal el DPA puede conjugarse con glucurónido por medio de la UDP-glucuronosiltransferasa (40%), el conjugado es secretado por MRP2 a los canalículos biliares para su posterior excreción a la luz intestinal, donde por medio de esterases bacterianas podría escindirse liberando DPA y dando lugar a la reabsorción del mismo. El metabolismo mitocondrial involucra a las enzimas responsables de la β oxidación de ácidos grasos a nivel hepático, este mecanismo es responsable del 40% del metabolismo de DPA (Drug Information Online, 2011). Como cualquier ácido graso debe conjugarse con L-carnitina para poder atravesar la membrana mitocondrial y metabolizarse (figura 8.2), allí se produce otro de los metabolitos asociados con los efectos adversos del fármaco: 2-en-DPA, sobre todo a nivel del SNC. La metabolización mitocondrial es responsable también de la hiperamoniemia, efecto adverso catalogado en un principio como idiosincrásico, causado por la depleción de L-carnitina en tratamiento crónico e intoxicaciones agudas (Carr & Shrewsbury, 2007; García et al, 2003).

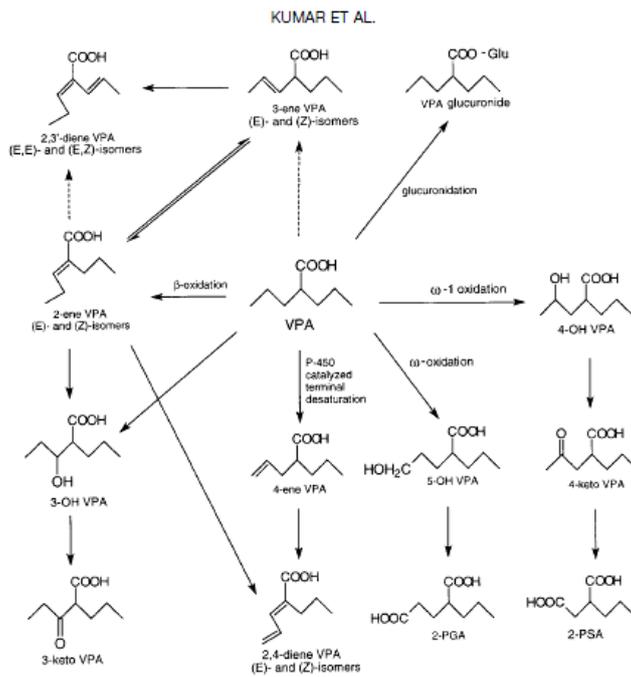


Figura 8.1 – Metabolismo de DPA.

La vía de eliminación por β oxidación implica la conjugación con L-carnitina para su entrada a la mitocondria.

Figura 8.2- Conjugación DPA con L-carnitina, entrada a mitocondrias y posterior oxidación.

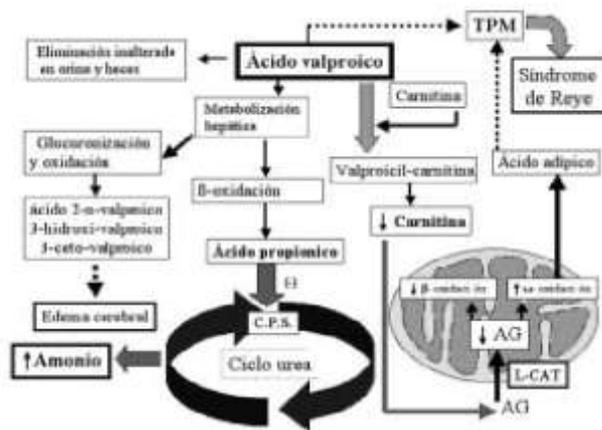
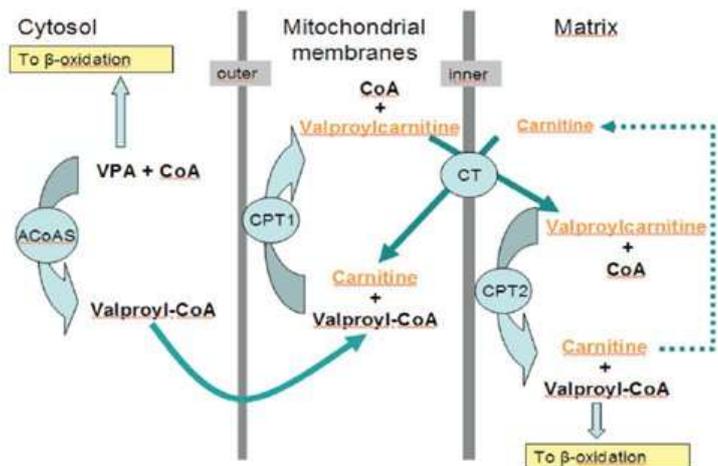


Figura 8.3 – Se muestran en la figura todas las vías de eliminación de DPA incluidas la conjugación con L-carnitina para posterior excreción renal.

TPM - Traslocación de la permeabilidad mitocondrial.
 AG - Ácidos Grasos
 CPS - Carbamil-fosfata sintetasa tipo I
 L-CAT - L-carnitin-aciltransferasa tipo I

Desde el punto de vista farmacocinético parece haber una gran variabilidad interindividual en los parámetros y concentraciones presentados por los pacientes pues los mismos pueden

verse influenciados por la edad, disfunciones orgánicas que presenten, así como también por fármacos que induzcan las enzimas hepáticas.

Los niños presentan mayor clearance de DPA que los adultos y ha sido referenciado (Bauer et al, 1985) que el CL en estado estacionario es significativamente menor en sujetos añosos para la fracción no unida.

El monitoreo de drogas en saliva ha sido desaconsejado para el DPA debido a la variabilidad del cociente saliva/plasma (S/P). Esta variabilidad, es debida principalmente, a la variable unión a las proteínas plasmáticas del DPA y al variable pH salival.

El pH salival varía normalmente entre 6.5 y 7.2 (Matin et al, 1974; Huffman, 1975), a pesar de que puede ser extendido de 5.8 a 7.1 (Fagiolino, 1999b) o de 5.9 a 7.8 (Schmidt-Nielsen, 1946) mientras que el pH plasmático es 7.4.

Si se estimula la salivación, el pH de la glándula salival difiere menos entre los pacientes ya que todos aproximan al pH plasmático por interrumpir o impedir el intercambio de H^+ a nivel de los conductos salivales. Trabajando con saliva estimulada el pH salival y la concentración salival de droga, son similares al pH plasmático y a la concentración libre plasmática de droga en estado estacionario respectivamente. De esta manera, se disminuye la variabilidad interindividual y se aumenta la reproducibilidad de las mediciones de DPA en saliva (Olano, 2008).

8.2- SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN MONOTERAPIA CON DPA UTILIZANDO SALIVA Y PLASMA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.

Un total de 24 pacientes entre 12 y 35 años, en monoterapia con DPA fueron monitoreados en saliva posteriormente a su consulta con el médico tratante.

La extracción de las muestras salivales se realizó en dos fracciones como muestra el protocolo del capítulo 4.

Un total de 25 dosificaciones plasmáticas de pacientes entre 15 y 70 años realizadas en la Unidad de Monitoreo de Medicamentos fueron también relevadas.

Se compararon las dosis normalizadas recibidas por ambos sexos y las concentraciones plasmáticas y salivales producto de dichas dosis. Luego de este primer estudio resultó de relevancia la categorización de los pacientes según su franja etaria y las comparaciones de dosis y concentraciones se realizaron para individuos mayores de 50 años y menores de 40.

Para verificar si existe dependencia de la expresión de transportadores con el género se compararon las relaciones S1/S2 entre hombres y mujeres y por último para estudiar si la expresión/actividad de los transportadores es afectada por la concentración de DFH, se estudió cómo evoluciona el cociente S1/S2 con el aumento de S2.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 17.0.

8.2.1- RESULTADOS SALIVA

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	17	27.6953	11.43486	2.77335
	M	7	21.0600	7.67320	2.90020
Conc. S2 (mg/L)	F	17	4.7047	3.55029	0.86107
	M	7	3.2986	1.70353	0.64387

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Dosis norm	1	2.387	0.137	1.401	22	0.175	6.63529	4.73469	-3.184	16.454
	2			1.654	16.7	0.117	6.63529	4.01281	-1.841	15.111
Conc. S2	1	5.734	0.026	0.992	22	0.332	1.40613	1.41719	-1.532	4.345
	2			1.308	21.2	0.205	1.40613	1.07518	-0.828	3.640

Tablas 8.2- Comparación de las dosis normalizadas medias y de la concentración de DPA en S2 media entre ambos sexos. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

Como se observa en las tablas 8.2 no existe diferencia significativa entre las dosis normalizadas y las concentraciones producto de dichas dosis entre ambos sexos

8.2.1.1- COMPARACIÓN DE LA RELACIONES S1/S2 ENTRE HOMBRES Y MUJERES

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Relación S1/S2	F	17	0.6700	0.26330	0.06386
	M	5	0.5440	0.14741	0.06592

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	Gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Relación	1	2.246	0.150	-1.01	20	0.323	0.12600	0.12442	-0.133	0.385
S1/S2	2			-1.37	12.3	0.194	0.12600	0.09178	-0.073	0.325

Tablas 8.3- Comparación de las relaciones S1/S2 entre sexo. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

De los resultados mostrados en la tablas 8.3 se desprende que no se encontró diferencia significativa para las relaciones S1/S2 entre sexos.

8.2.2- RESULTADOS PLASMA

	Sexo	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	F	16	22.2531	7.17172	1.79293
	M	9	19.3930	11.39746	3.79915
Conc. (mg/L)	F	16	64.5625	22.57382	5.64345
	M	9	48.5222	21.81718	7.27239

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Dosis norm	1	1.885	0.183	0.774	23	0.447	2.86008	3.69701	-4.788	10.508
	2			0.681	11.6	0.509	2.86008	4.20097	-6.323	12.044
Conc.	1	0.087	0.771	1.725	23	0.098	16.04028	9.29731	-3.193	35.273
	2			1.743	17.2	0.099	16.04028	9.20523	-3.363	35.443

Tablas 8.4 - Comparación de las dosis normalizadas medias y de la concentración plasmática de DPA media entre ambos sexos. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

Se observa en la comparación de dosis normalizadas y de las medias de las concentraciones plasmáticas que las mismas no difieren significativamente.

Las comparaciones por franjas etarias carecen de potencia estadística pues el número de dosificaciones para pacientes mayores de 50 años es bajo.

Si bien existe una importante dispersión de concentraciones tanto plasmáticas como salivales de DPA que responde principalmente a dos factores:

- variable frecuencia de administración - DPA presenta perfiles concentración-tiempo con grandes oscilaciones pico-valle por lo tanto el intervalo de administración condiciona las concentraciones de valle en gran proporción. Aún cuando se trabajó con las posologías cada 8 y 6 horas no pudieron obtenerse resultados concluyentes.
- formulaciones variables - existen en nuestro mercado formulaciones con perfiles de liberación distintos que condicionan la velocidad de absorción.

Impidiendo arribar a conclusiones con respecto a la diferencia de concentraciones hombre/mujer, joven/anciano de este fármaco. Sin embargo, el cociente S1/S2 permite arribar a conclusiones interesante con respecto a la dosis diaria recibida por los pacientes y a la diferencia de sexo.

Dado que S1/S2 se independiza del diferente intervalo posológico que se aplicó en los distintos pacientes, la similar relación encontrada entre hombres y mujeres, luego de administrar las mismas dosis diarias, nos permitirían concluir que el CL en ambos sexos sería igual.

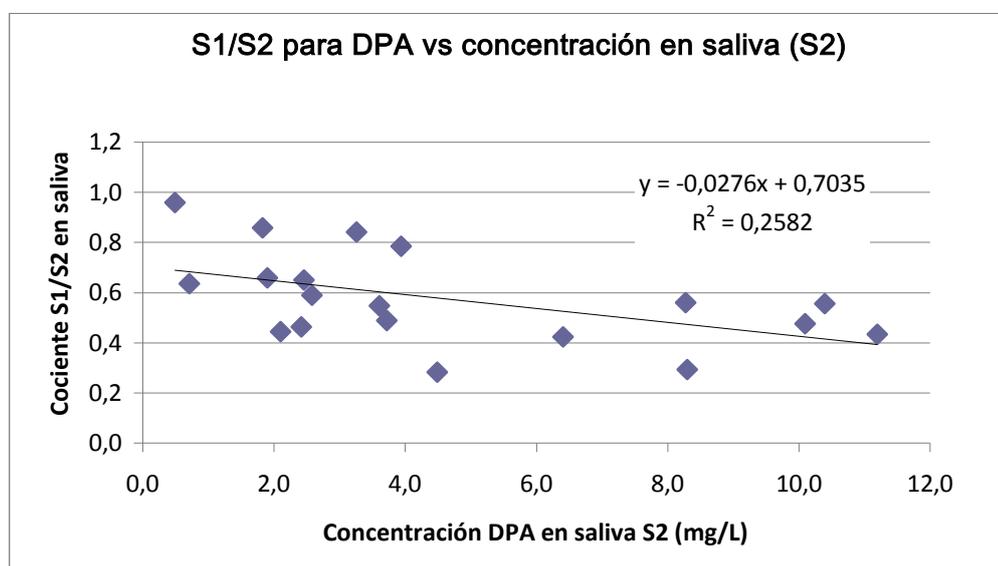


Figura 8.4 – Correlación entre la relación S1/S2 y la concentración de DPA en S2.

La figura 8.4 muestra un comportamiento similar del cociente S1/S2 en función de S2 de DPA, al que se había obtenido para DFH. Es de resaltar que para este fármaco los cocientes son francamente inferiores a 1 debido a la importante ionización que presenta DPA ($pK_a=4.8$) en los pHs de los conductos salivales (6.5-7) y del acino (7.4), y por lo tanto una mayor

concentración en S2 que en S1. La disminución concentración (dosis) dependiente de dicho cociente sugiere una concomitante reducción del clearance (CL)

A los efectos de contar con algún sustento bibliográfico que oriente al análisis de este punto, se han consultado solamente publicaciones donde la concentración libre de DPA hubiese sido medida. Esto fue esencialmente para evitar que la información se distorsionase a causa de la ya conocida modificación de la unión a proteínas plasmáticas en función de la concentración de DPA y enmascarase el verdadero impacto de las diferentes situaciones sobre el CL.

Cuatro artículos resultaran de interés para entender la eventual disminución del CL a medida que aumenta la dosis diaria recibida por lo pacientes.

Jager Roman et al (1981) y Marty et al (1982) muestran como en tratamientos crónicos la oscilación pico-valle de concentraciones plasmáticas totales de DPA es sensiblemente menor que la de libres en plasma. Esto no hace más que reafirmar la sabida saturabilidad que presenta la droga en su unión a la albúmina, y por tanto las concentraciones plasmáticas no crecen a tan altos valores, ni descienden a tan bajos niveles, como podrían si no hubiese modificación de la tasa de unión. En cambio, las concentraciones libres de fármaco, independientes de esta variable capacidad de unión, sufren la oscilación propia que le impone la formulación utilizada (comúnmente de liberación inmediata o con recubrimiento entérico) y la disposición típica de la droga en el paciente. Por consiguiente, el fenómeno relatado en oportunidad de describir el comportamiento de CBZ y DFH a lo largo de tratamientos crónicos, enlenteciendo la absorción y reduciendo la oscilación pico-valle a medida que se induce el transporte de eflujo mediado por MRP2, descartaría que la respuesta farmacocinética no lineal que podría estar aconteciendo con DPA tuviera como explicación este mecanismo inductivo.

Perucca et al. (1984) informan una reducción del CL oral de DPA libre cuando se pasa del adulto joven al anciano, a los cuales se les administró en dosis única 800 mg del fármaco. Los autores de este artículo descartan una participación de la biodisponibilidad (F) como causal de este fenómeno, ya que las formulaciones utilizadas en el estudio presentan en el joven una completa absorción, y por lo tanto sería imposible aumentar F con el envejecimiento y así reducir falsamente el clearance aparente medido tras la administración oral. Los ancianos presentaron una reducción del 33% del CL libre con respecto al mostrado por los adultos jóvenes.

El DPA presenta una eliminación compuesta por menos de 3% de excreción renal, 40% de conjugación con ácido glucurónico, 40% de betaoxidaciones que ocurren a nivel mitocondrial, y algo más de 15% de omegaoxidaciones llevadas a cabo a nivel citosólico. Si se propusiera adjudicar el descenso del CL a alguna de las rutas mencionadas, quedaría descartada la excreción inalterada por la orina como único proceso afectado por el envejecimiento. Tampoco procedería la metabolización a nivel del citosol, como única causa. Según referencias (Argikar & Remmel, 2009), parecería que la glucuronidación no estaría modificada con el envejecimiento. Por lo tanto, si una sola fuera la causa del descenso de CL habría que buscarla en los procesos mitocondriales que conllevan el 40% de la eliminación total de DPA.

La cinética no lineal de DPA presumida a través de nuestros resultados de S1/S2 estaría totalmente confirmada por las investigaciones de Bowdle et al (1980) y Felix et al (2003), los que informaron que el CL libre se reducía al incrementarse la dosis diaria recibida por pacientes jóvenes y ancianos respectivamente. El ensayo realizado en ancianos utilizó dosis comprendidas entre 500 y 1500 mg de DPA por día, habiéndose observado un descenso de CL libre de 20%. En el grupo de jóvenes el descenso se estimó en 20% cuando la dosis pasó de 500 a 1000 mg de DPA diarios.

Es importante mencionar que el ácido valproico también se conjuga con L-carnitina, en pequeño porcentaje, formando valproilcarnitina, éster que le permite al DPA entrar a la mitocondria para ser metabolizado pero que también es excretado en orina e impide la normal reabsorción de carnitina por los túbulos renales (Klaassen & Aleksunes, 2010). Este aminoácido es esencial en el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias de las células, en particular las hepáticas, entre otras. Como consecuencia de sufrir β -oxidación los ácidos grasos forman acetil-CoA la cual se incorpora al ciclo de Krebs produciendo la energía que el tejido necesite. El DPA discurre por la misma ruta por lo tanto una deficiencia de L-carnitina no sólo traerá consecuencias metabólicas que podrían afectar grandemente la salud del individuo, sino que además reduciría la ruta metabólica de DPA anteriormente mencionada. Se ha descrito (Crentsil, 2010) que el envejecimiento reduce los niveles de L-carnitina debido a reducción de los transportadores de influjo (OCTN2) que participan de la absorción gastrointestinal, reabsorción tubular, y otros importantes procesos de distribución corporal. Persistiendo con la hipótesis de que una sola ruta de eliminación pudiera explicar la reducción del CL de DPA al incrementarse la edad del paciente adulto o la dosis diaria recibida, aparece una inconsistencia cuantitativa. Si sumáramos los descensos por causa del envejecimiento (aproximadamente 30%) y por causa del aumento de dosis en el propio

anciano (aproximadamente 20%) arribamos a un descenso neto del 50%, valor que superaría la cuota informada bibliográficamente para la ruta mitocondrial de beta-oxidación (40%). Por lo tanto, otra de las vías de eliminación de DPA debe verse influenciada para explicar el porcentaje de descenso hallado.

La conjugación con glucurónico es la otra vía que aporta en gran medida a la metabolización de DPA. Han sido publicados estudios que hablan no sólo de la hidrólisis de conjugados glucurónidos a nivel intestinal, sea por enzimas aportadas por la flora microbiana normal o por esterasas inespecíficas, sino también por beta-glucuronidasas hepáticas. La glucuronidación pasaría a ser un fenómeno reversible que se explicaría tanto por la conocida circulación entero-hepática como también por la intra-hepatocítica. Si se agrega que los conjugados son activamente transportados por medio de MRP2 hacia la luz intestinal y desde las células renales hacia la luz tubular, tendríamos que un descenso del nivel de transportadores, a causa del envejecimiento, o un descenso de la capacidad de transporte por saturabilidad, acumulación de glucurónidos debido a que se limita la β -oxidación (Hu et al, 2009), se podría dar lugar a una mayor hidrólisis hepática de glucurónidos de DPA y de esta forma reducir el CL parcial correspondiente a esta ruta. De esta forma estaríamos ampliando a 2 rutas de eliminación el fenómeno de la inhibición dosis dependiente.

En resumen, la reducción de L-carnitina por el natural envejecimiento o por la depleción que el propio fármaco DPA produce como mecanismo de eliminación, haría que progresivos incrementos de la dosis diaria de este antiepiléptico exacerbara el fenómeno a tal punto de reducir el CL, sea por la propia ruta mitocondrial de eliminación como por expansión hacia la ruta de glucuronidación, y así explicar la respuesta farmacocinética no lineal observada en la literatura internacional y en nuestros propios resultados experimentales, a través del cociente S1/S2 de concentraciones salivales de droga.

8.3- HIPERAMONIEMIA SECUNDARIA A TRATAMIENTO CRÓNICO O INTOXICACIÓN CON ÁCIDO VALPROICO

La importancia de la L-carnitina en la eliminación de DPA queda de manifiesto en los 4 casos que se presentan a continuación. Todos los pacientes presentaron hiperamoniemia secundaria a la ingesta de DPA.

Paciente	Sexo	Edad años	Tratamiento	[DPA] mg/L	[NH ₄ ⁺] µg/dL	Comentario
1	M	26	Epilepsia	80	235	Tto. Crónico
1	M	26	Epilepsia	-----	86	Tto. Crónico
2	F	16	Epilepsia	60	179	Tto. Crónico
2	F	16	Epilepsia	75	200	Tto. Crónico
3	F	37	Desorden Bipolar	99	373	Tto. Crónico
3	F	37	Desorden Bipolar	-----	11	Tto. Crónico
4	M	54	Patología Psiquiátrica	568	511	Ingesta aguda
4	M	54	Patología Psiquiátrica	136	294	Ingesta aguda
4	M	54	Patología Psiquiátrica	69	50	Ingesta aguda

Tabla 8.5 – Dosificaciones plasmáticas de DPA y NH₄⁺ en cuatro pacientes que presentaron hiperamoniemia. RTP DPA – 50-100 mg/L. RTP NH₄⁺ - 19-82 µg/dL

Los pacientes 1, 2 y 3 consultaron por trastornos de conducta y malestares durante el tratamiento crónico.

El paciente 4 ingresa por Intento de autoeliminación.

Los niveles de amonio del paciente 1 descendieron tras la suspensión de DPA (extracción 7 días después de la última toma de DPA).

Los pacientes 3 y 4 recibieron L-carnitina y los valores de amonio descendieron a niveles dentro del RTP luego de 24 horas de administración.

Aunque el DPA es usualmente bien tolerado, presenta como efecto adverso infrecuente y grave la hiperamoniemia por insuficiencia hepática. Generalmente esto se observa cuando el fármaco es asociado con otros AEDs como DFH, FB, CBZ (Dreifuss et al, 1987) o con topiramato (Gerstner et al, 2006). Sin embargo, DPA puede producir hiperamoniemia en tratamientos crónicos como en intoxicaciones agudas y puede ser la causa de una encefalopatía similar a la de origen hepático pero en ausencia de insuficiencia hepática.

La eliminación de nitrógeno del organismo se realiza a través del ciclo de la urea, por esto una falla en esta ruta determina un aumento en los niveles de amonio en sangre. El ácido propiónico y el 4-en-DPA, ambos metabolitos de DPA, inhiben a la carbamoil fosfato sintetasa I (CPS I), primera enzima involucrada en el ciclo de la urea (Man et al, 2008). Los individuos con defectos en enzimas del ciclo de la urea y con deficiencia primaria y secundaria de carnitina son de alto riesgo para desarrollar encefalopatía hiperamoniémica. El tratamiento con DPA, como se mencionó anteriormente, puede disminuir la reabsorción tubular de carnitina. Asimismo, la depleción de carnitina puede traer aparejado reducción del transporte de ácidos grasos de cadena larga, de la beta oxidación y por consiguiente de

acetilcoenzima A intramitocondrial, esto lleva a una disminución en la síntesis de N-acetilglutamato (regulador alostérico de CPS I), disminuyendo así también la actividad mitocondrial de CPS I. Esta es la razón por la cual se ha establecido a la carnitina como antídoto para las intoxicaciones agudas con DPA (Bohan et al, 2001; Lheureux et al, 2005)

Los fármacos inductores enzimáticos (ej. FB, DFH y CBZ) que aumentan la omega oxidación de DPA, aumentan los niveles de 4-en-DPA y por lo tanto disminuyen la actividad de CPS I. El topiramato por otro lado inhibe la anhidrasa carbónica y por lo tanto alcaliniza la orina y hay menor pérdida de nitrógeno en forma de amonio.

8.4- NEUROTOXICIDAD ASOCIADA A AMONIACO

Además de poseer un efecto sobre el pH sanguíneo, el amoníaco atraviesa fácilmente la BHE y en el cerebro se conjuga con α -cetoglutarato para formar glutamato (Segura et al, 2006). Esto conduce a daño neuronal, así como a la aparición de convulsiones dada la actividad excitatoria del glutamato en la membrana sináptica. Asimismo los altos niveles de amoníaco cerebrales permiten la formación de glutamina por la unión de glutamato más amoníaco. Cuando los niveles de glutamina se incrementan en el cerebro, las propiedades osmolares de la misma determinan un aumento en el volumen de líquido dentro de las células gliales dando como resultado edema astrocitario (Benarroch, 2005; Wadzinski et al, 2007).

Debido a la cinética no lineal presentada por DPA, la medición de concentraciones plasmáticas totales lleva a subestimar las concentraciones libres. Por ello en los pacientes en tratamiento crónico la medición de concentraciones totales no resultaría de utilidad para relacionarlo con el efecto adverso causado por la hiperamoniemia. Prueba de ello son las dosificaciones realizadas en tres de los pacientes en tratamiento crónico.

8.5- LAMOTRIGINA

LTG es un fármaco anticonvulsivante de amplio espectro que fuera por primera vez aprobado para uso humanos en Irlanda en 1990 y que hoy en día es administrado a más de 5 millones de pacientes en todo el mundo.

Las formulaciones de liberación inmediata presentan una biodisponibilidad casi completa (98%) y alcanzan concentraciones máximas de 1.4 a 4.8 horas posdosis, su UPP es débil, aproximadamente 55%. En adultos sanos en monoterapia la semivida media de LTG es de 24 horas, la cual disminuye en tratamiento con inductores enzimáticos (DFH, CBZ, FB) a 12.6 horas y se prolonga en la presencia de fármacos que compiten por la vía de metabolización (sobre todo glucuronidación) como DPA hasta unas 60 horas aproximadamente.

El metabolismo es predominantemente hepático con un 75-90% de la dosis recuperada en orina como glucurónido. LTG parece ser sustrato tanto de P-gp como de MRP2.

8.6- SEGUIMIENTO DE PACIENTES EN TRATADOS CON LTG UTILIZANDO SALIVA COMO FLUIDO DE MONITORIZACIÓN.

Un total de 12 pacientes entre 15 y 75 años, tratados con LTG fueron monitoreados en saliva posteriormente a su consulta con el médico tratante. Si bien LTG es un fármaco que hace varios años se encuentra en nuestro mercado y cuyo perfil de seguridad ha sido bien estudiado, la mayoría de los clínicos la utiliza como terapia combinada con otros anticonvulsivantes. Por esta causa, para estos pacientes los resultados presentados incluyen pacientes en terapia combinada LTG-CBZ o LTG-DPA.

La extracción de las muestras salivales se realizó en dos fracciones como muestra el protocolo del capítulo 4.

La validación de la técnica analítica que se realizó para esta tesis se muestra en Anexo 3.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 17.0.

	Terapia	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	LTG+CBZ	8	3.9300	1.45147	0.51317
	LTG+DPA	4	4.3600	1.80346	0.90173
Conc. S2 (mg/L)	LTG+CBZ	8	1.3563	1.27129	0.44947
	LTG+DPA	4	4.2350	1.63449	0.81725

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias							
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia		
										Inferior	Superior
Dosis	1	0.141	0.715	-0.45	10	0.663	-0.4300	0.95861	-2.566	1.706	
	2			-0.41	5.0	0.696	-0.4300	1.03753	-3.092	2.232	
Conc.	1	1.465	0.254	-3.38	10	0.007	-2.8787	0.85135	-4.776	-0.982	
	2			-3.09	4.9	0.028	-2.8787	0.93269	-5.291	-0.466	

Tablas 8.6 – Comparación de medias de dosis normalizadas y las concentraciones de LTG en S2 de acuerdo a la medicación coadministrada. 1- asumiendo varianzas iguales, 2- no asumiendo varianzas iguales.

Como se observa en las tablas no existe diferencia en las dosis normalizadas recibidas por ambos grupos de pacientes, sin embargo, se observa diferencia significativa entre las concentraciones producto de estas dosis.

Esto puede atribuirse a la referenciada interacción entre LTG y DPA, que se atribuye a la competencia por la vía metabólica de eliminación que ambos comparten.

La combinación de la terapia con CBZ muestra resultados contradictorios pero en la mayoría de los casos se ha referenciado que LTG inhibe vías de metabolización usadas por CBZ.

CAPÍTULO 9

Sobreexpresión de transportadores de membrana en epilepsia refractaria

Lo expuesto en los capítulos anteriores demuestra que la terapia con fármacos anticonvulsivantes (especialmente CBZ y DFH) condiciona la respuesta terapéutica de un individuo por la inducción de transportadores que los mismos ejercen. Dos factores relevantes como el sexo y la edad del paciente fueron añadidos, ya que han sido corroborados como condicionantes también de la expresión de bombas de eflujo.

Este capítulo se aboca a estudiar un último condicionante en la expresión de bombas de eflujo: la propia patología. Existen evidencias de que las crisis convulsivas reiteradas promueven la sobreexpresión de eflujo. Lazarowski (2007) expande al resto del organismo la posibilidad de tal sobreexpresión como consecuencia del mal control de las crisis. Se plantea entonces la hipótesis de que la relación S1/S2 pudiera detectar cambios en la expresión-actividad de transportadores relacionado con el buen o mal control de crisis.

Para verificarla se agruparon a los pacientes según el grado de control de sus crisis.

La clasificación de los pacientes se realizó según el número de crisis en 2 categorías:

1. muy buen control de crisis: 1 o menos crisis cada 6 meses.
2. mal control de crisis: 1 o más crisis por semana.

9.1- CARBAMACEPINA

CBZ es sino el primer, el segundo fármaco de elección en la practica clínica al tratar crisis convulsivas tónico clónicas parciales o generalizadas en adultos.

De los datos obtenidos en monoterapia la comparación de las relaciones S1/S2 entre pacientes con buen y mal control de crisis resulta estadísticamente diferentes, presentado los

pacientes con buen control relaciones menores. La comparación de dosis normalizada para estos dos grupos muestra que las mismas no difieren significativamente, aunque los pacientes con buen control reciben una dosis media de 13 mg/kg mientras que los pacientes con mal control de crisis reciben dosis media de 18.

Teniendo que estos resultados pudieran poner en duda las diferencias significativas encontradas en la relación S1/S2 y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior para DPA (el fármaco puede ser sustrato de bombas de eflujo pero no induce la expresión-actividad de las mismas) se decide realizar la comparación de dosis normalizadas y relaciones S1/S2 para aquellos pacientes en monoterapia con CBZ o en terapia combinada CBZ-DPA.

La adición del segundo fármaco (DPA) redujo las crisis en buena parte de los pacientes que no habían podido lograrlo con solo CBZ. Esto promovió un aumento de la dosis normalizada en los pacientes de buen control sin afectar prácticamente la dosis en los pacientes de mal control, permitiendo así comparar S1/S2 bajo similares dosis normalizadas de CBZ (igual capacidad inductiva de CBZ en ambos grupos).

Los pacientes en terapia combinada con DFH y FB no fueron incluidos pues ambas drogas son inductoras de enzimas y transportadores.

	Control	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	Bueno	20	16.8770	10.16179	2.27225
	Malo	28	17.6839	6.54089	1.23611
Relación S1/S2	Bueno	20	1.0269	0.09184	0.02054
	Malo	28	1.0946	0.12975	0.02452

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior		Superior
Dosis norm	1	5.134	0.028	-0.33	46	0.739	-0.8069	2.4100	-5.658	4.044
	2			-0.31	30.0	0.757	-0.8069	2.5867	-6.089	4.475
Rel S1/S2	1	2.035	0.160	-1.99	46	0.050	-0.0676	0.0338	-0.136	-0.0049
	2			-2.11	46	0.040	-0.0676	0.0320	-0.132	-0.0033

Tablas 9.1 – Comparación de dosis normalizadas, relaciones S1/S2 y concentraciones de CBZ en S2.

1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

De lo expuesto en las tablas 8.1 la diferencia significativa en los cocientes S1/S2 no se debe a diferencias en las dosis normalizadas recibidas por los pacientes. Lo cual implicaría que si bien el fármaco produce inducción de transportadores a nivel sistémico, la propia patología estaría afectando suplementariamente el número-actividad de transportadores.

La tabla 9.2 muestra no solamente que las dosis recibidas eran similares entre los pacientes con buen y mal control de crisis, sino también las concentraciones producto de las mismas.

	Control	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
CBZ S2	Bueno	20	2.0245	0.82838	0.18523
(mg/L)	Malo	28	1.7614	0.65195	0.12321

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia	
								Inferior		Superior
CBZ	1	0.633	0.40	1.231	46	0.225	0.26307	0.21372	-0.167	0.693
en S2	2			1.183	34.7	0.245	0.26307	0.22246	-0.189	0.715

Tablas 9.2 - Comparación de las concentraciones de CBZ en S2. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

Podría concluirse entonces que la diferencia en las relaciones S1/S2 entre los pacientes controlados y no controlados puede obedecer a la inducción de transportadores a nivel sistémico mediada por las frecuentes crisis no resueltas.

9.2- FENITOÍNA

La efectividad de DFH ha sido ampliamente probada cuando se presentan cuadros clínicos severos en fase aguda convulsiva. Sin embargo, este antiepiléptico no escapa al fenómeno de resistencia farmacológica durante el transcurso de tratamientos crónicos en ciertos pacientes susceptibles.

En el caso de DFH las dosis normalizadas recibidas por ambos grupos de pacientes es prácticamente la misma por lo que no fue necesario agregar pacientes en terapia combinada.

	Control	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	Bueno	14	4.5693	1.04712	0.27986
	Malo	8	4.9925	0.98107	0.34686
Relación S1/S2	Bueno	14	1.0686	0.09566	0.02557
	Malo	8	1.0100	0.07746	0.02739

		Levene para igualdad de varianzas									Prueba T para la igualdad de las medias	
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia			
									Inferior	Superior		
Dosis norm	1	0.651	0.429	-0.93	20	0.362	-0.42321	0.45406	-1.370	0.524		
	2			-0.95	15.5	0.357	-0.42321	0.44568	-1.370	0.524		
Rel S1/S2	1	0.230	0.637	1.47	20	0.156	0.05857	0.03976	-0.024	0.141		
	2			1.56	17.4	0.136	0.05857	0.03747	-0.020	0.137		

Tablas 9.3 - Comparación de las dosis normalizadas y relaciones S1/S2 en pacientes medicados con DFH en monoterapia. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

Si bien no existen diferencias significativas entre las dosis normalizadas y las relaciones S1/S2 que presentan ambos grupos, puede observarse en las tablas 9.3 una tendencia cruzada, menores dosis normalizadas mayores S1/S2. Lo cual va en el mismo sentido que lo discutido en capítulo 6 en que por el motivo que fuera, tanto autoinducción del transporte de eflujo como inducción del mismo por las crisis no controladas, se estaría disminuyendo el CL de DFH, demostrado en ambas situaciones por el menor cociente S1/S2. Comparando nuevamente las concentraciones en S2 se obtiene (tablas 9.4) un mayor nivel en pacientes con mal control, aún cuando no se logre diferencias significativas con los de buen control de crisis.

	Control	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
DFH S2 (mg/L)	Bueno	14	1.1921	0.86494	0.22315
	Malo	8	1.7675	1.01852	0.36010

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
DFH en S2	1	0.836	0.371	-1.44	20	0.166	-0.57536	0.40041	-1.411	0.2599
	2			-1.36	12.4	0.199	-0.57536	0.42364	-1.495	0.34420

Tablas 9.4 - Comparación de las concentraciones de DFH en S2. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

Esto estaría confirmando la hipótesis de sobreexpresión de transportadores a nivel sistémico ya que la mayor salida de DFH por canalículo hepatobiliar hacia intestino determinaría menor metabolización relativa de DFH.

9.3- ÁCIDO VALPROICO

Debido a sus múltiples mecanismos de acción el DPA es utilizado en diversos tipos de crisis, entre ellas las crisis de ausencia.

	Control	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
Dosis norm (mg/kg)	Bueno	8	24.2725	12.38037	4.37712
	Malo	11	24.5573	1.004584	3.02894
Relación S1/S2	Bueno	8	0.6725	0.21532	0.07613
	Malo	11	0.6636	0.28772	0.08675

		Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias						
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
Dosis norm	1	0.093	0.764	-0.05	17	0.956	-0.28477	5.14236	-11.13	10.56
	2			-0.05	13.2	0.956	-0.28477	5.32294	-11.77	11.20
Rel S1/S2	1	1.099	0.309	0.07	17	0.942	0.00886	0.12098	-0.246	0.264
	2			0.08	16.9	0.942	0.00886	0.11542	-0.234	0.525

Tablas 9.5 - Comparación de las dosis normalizadas y relaciones S1/S2 en pacientes medicados con DPA en monoterapia. 1- asumiendo varianzas iguales 2- no asumiendo varianzas iguales.

	Control	N	Media	Desviación tip.	Error tip. Media
DPA S2	Bueno	8	4.2750	2.73476	0.96688
(mg/L)	Malo	11	3.7118	2.67117	0.80539

Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de las medias								
		F	Sig	t	gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. Diferencia	95% IC para la diferencia	
									Inferior	Superior
DPA	1	0.15	0.906	0.449	17	0.659	0.56318	1.25344	-2.081	3.208
en S2	2			0.448	15.0	0.661	0.56318	1.25838	-2.118	3.245

Tablas 9.6 – Comparación de las concentraciones medias de DPA en S2. 1- asumiendo varianzas iguales, 2- asumiendo varianzas diferentes.

Si bien todavía los procesos de excitotoxicidad en epilepsia se encuentran en estudio, en un principio los mismos se asocian a procesos convulsivos motores (crisis tónico-clónicas). Los pacientes monitoreados aquí sufren de una amplia variedad de crisis (algunas de ellas sin episodios motores) por lo que el rol del estrés oxidativo a nivel sistémico puede no verse tan claramente. Nuestros resultados de S1/S2 muestran que no habría diferencias de clearances sistémicos entre pacientes con buen control y mal control de sus crisis. Quedaría para estudiar en un futuro, aumentando el número de pacientes medicados con este fármaco, la categorización según diferentes tipos de epilepsia con sus respectivos valores de S1/S2. La hipótesis a verificar sería una eventual constancia del clearance en los subgrupos mal controlados con crisis de ausencias, en relación a los de buen control, y una eventual reducción del clearance en los subgrupos mal controlados con convulsiones tónico-clónicas que revelaría un estrés oxidativo sistémico.

9.4- ¿POR QUÉ LAS CRISIS CONVULSIVAS DETERMINARÍAN UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE EFLUJO? ¿ES FACTIBLE QUE ESTA SOBREENEXPRESIÓN SE GENERALICE A OTROS TEJIDOS DEL ORGANISMO?

Es muy claro que la epilepsia refractaria no sobreexpresa transportadores por el simple hecho de deshacerse de xenobióticos (fármacos) pues esto determinaría un gasto energético muy alto y quizás no tan redituable si el fármaco administrado no es sustrato de

transportadores. Además en modelos animales *kindled* ya ha sido demostrado que el contacto entre fármaco y BHE no es necesario para que se observe sobreexpresión (Hoffmann & Loscher, 2006).

Una característica bien conocida de la epilepsia es el estrés oxidativo al que son sometidos los tejidos del SNC. Modelos experimentales y estudios de imágenes en pacientes con este padecimiento muestran que las crisis recurrentes producen estrés oxidativo, relacionado principalmente con la excitabilidad neuronal. La excesiva estimulación de los receptores a glutamato induce neurotoxicidad, un proceso que ha sido definido como excitotoxicidad. Diversos hallazgos experimentales y clínicos relacionados con la posible toxicidad de los aminoácidos excitadores han dado lugar a esta teoría que postula, que los niveles excesivos de glutamato endógeno o la hipersensibilidad de sus receptores se relacionan con la degeneración neuronal (Olney, 1985).

El término excitotoxicidad se refiere al mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobre-activación de receptores glutamatérgicos o de cualquiera de sus análogos. La activación de los receptores glutamatérgicos promueve la despolarización de la membrana, que al prolongarse produce un desequilibrio osmótico ocasionado por la entrada de Na^+ y Cl^- el cual es seguido por la elevación masiva de la concentración plasmática de Ca^{2+} (Doble, 1999). La entrada de Na^+ altera la dirección y funcionalidad de todos los transportadores, bombas y canales iónicos que dependen del gradiente de Na^+ (Doble, 1999, Greene & Greenamyre, 1996). El influjo de Cl^- , además de alterar diferentes mecanismos de transporte a nivel de la membrana plasmática, estimula la liberación de glutamato (Babot et al, 2005). Finalmente el aumento excesivo de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} promueve:

1. la síntesis de óxido nítrico, el cual puede difundir a la terminal sináptica glutamatérgica y estimular la liberación de más glutamato,
2. la generación de radicales libres, superóxido o peroxinitrito (sintetizado a partir de óxido nítrico y superóxido) que promueven la lipoperoxidación y desestabilización de las membranas celulares,
3. la pérdida del potencial electroquímico mitocondrial, que suspende la fosforilación oxidativa y promueve la generación de radicales libres a nivel mitocondrial, hasta invalidar completamente el metabolismo energético mitocondrial.

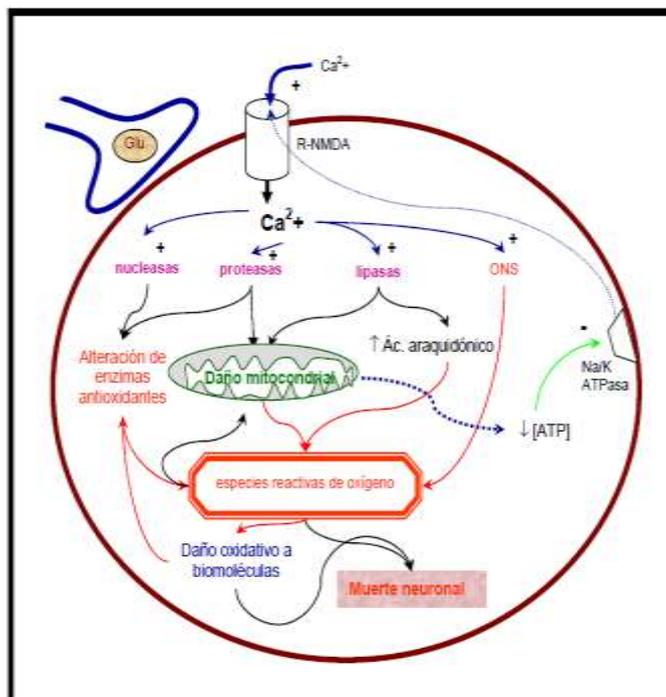
El proceso excitotóxico continuo puede ser demasiado agudo en su fase inicial y desencadenar la muerte neuronal por necrosis, o evolucionar más lentamente y producir muerte neuronal por apoptosis.

En general, el daño neuronal excitotóxico en pacientes epilépticos es mediado, a nivel celular, por la entrada excesiva de Ca^{2+} en las células durante las convulsiones (Lado et al,

2002). Los niveles elevados de Ca^{2+} desatan una secuencia de eventos como es la activación de la óxido nítrico sintasa que interfiere con el metabolismo oxidativo, generando radicales libres y daño de la membrana neuronal, de igual forma se activan procaspasas y se culmina con la muerte neuronal ya sea por necrosis o por apoptosis.

Figura 9.1- Mecanismos de excitotoxicidad.

La entrada masiva de Ca^{2+} a la célula, a través del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) persistentemente activo, provoca la activación de enzimas líticas y de la óxido nítrico sintasa (ONS). El daño mitocondrial, es uno de los factores para el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte neuronal producida por el daño a las biomoléculas y a la activación de programas de muerte apoptóticos. El déficit energético contribuye a la perpetuación del proceso degenerativo por favorecer la despolarización de la membrana y así mantener el estado activo del receptor NMDA. Esto hace sensible a la célula a la aferencia glutamatérgica normal procedente de la corteza cerebral.



9.5- EPILEPSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO

La capacidad de adaptación al estrés generado por el medio ambiente, es un requisito indispensable para la supervivencia celular y de los organismos a cualquier nivel, los fármacos y distintas patologías pueden también generar estados de alto nivel oxidativo; ejemplo de ello son las sulfamidas que inducen la caída de glutatión (GSH) intracelular en eritrocitos y pueden llevar a anemia hemolítica (De Leeuw et al, 1963), o las enfermedades como la epilepsia en la cual la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) puede llevar a necrosis o apoptosis de las neuronas y otras células (Lorigados-Pedre et al, 2010). En células cancerígenas también ha sido referenciado alto nivel de sustancias oxidantes (Wang et al, 2004); las células en su afán de sobrevivir responden mediante un mecanismo antioxidante para evitar el fenómeno de apoptosis anteriormente descrito. Este mecanismo de supervivencia no es exclusivo de células patológicas sino por el contrario, la célula cancerígena utiliza mecanismos ya existentes a nivel celular. Para poder entender la génesis de esta respuesta recurrimos al estudio detallado que ha sido realizado del factor eritroide

Nrf2 del inglés NF-E2-related factor 2. Este factor ubicuo en el organismo está presente en cantidades considerables en el intestino, hígado, pulmones, células inmunes y cerebro. En los últimos 10 años ha sido estudiado por considerarlo clave en la respuesta al estrés oxidativo.

Nrf2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes. Su actividad se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con la proteína citoplasmática Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) la cual lo mantiene anclada al citoesqueleto. Durante períodos de estrés oxidativo o en presencia de electrófilos Keap 1 libera a Nrf2 y éste se trasloca al núcleo. Una vez allí el Nrf2 se heterodimeriza con una variedad de factores transcripcionales los cuales se unen a motivos conocidos como ARE (del inglés antioxidant response elements) colocados en las regiones promotoras de genes detoxificantes.

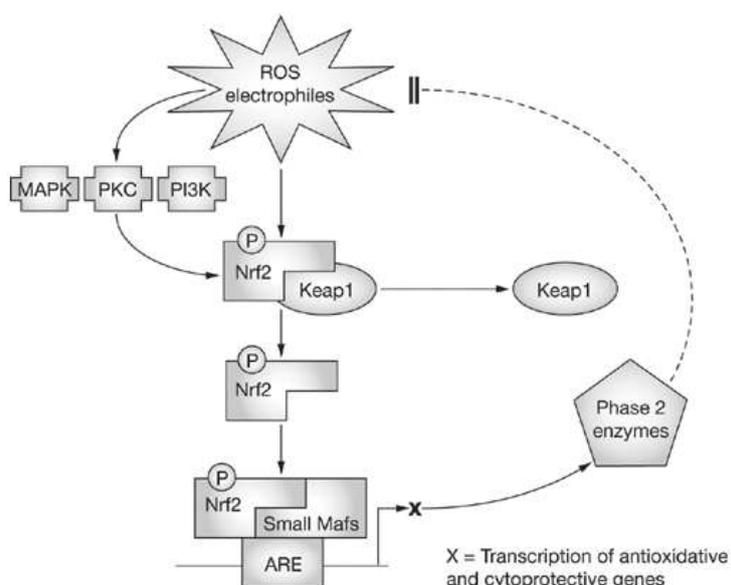


Figura 9.2- Diagrama simplificado de los mecanismos de activación del factor de transcripción Nrf2.

Ejemplos de las proteínas que se expresan por activación de Nrf2 son:

1. Enzimas encargadas de la homeostasis de GSH (glutamato-cistein ligasa, glutatión sintetasa, glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa intestinal).
2. Enzimas encargadas de la reducción y posterior conjugación de intermediarios intracelulares altamente reactivos (NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1, UDP-glucuronosiltransferasa).
3. Transportadores – MRP1, MRP2 (Vollrath et al, 2006) que envían GSH y sus conjugados fuera del organismo y P-gp cuya sustratos endógenos en estas condiciones no están aún establecidos.

Las enzimas y los transportadores inducidos muestran que la respuesta a Nfr2 implica variaciones en el estado oxidativo intracelular que desemboca en reducción de especies reactivas, conjugación y eliminación por eflujo. De lo anterior se desprende que la razón de inducción de estos genes es la citoprotección (Aleksunes & Manautou, 2007).

Comparado a otros órganos el cerebro humano representa solamente un 2% de la masa corporal pero consume el 20% del total de oxígeno del organismo (Clarke & Sokoloff, 1999), por lo tanto una gran cantidad de radicales libres son constantemente generados a nivel mitocondrial en el SNC para obtener energía del metabolismo aerobio.

Varios sistemas antioxidantes celulares incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y antioxidantes como GSH están presentes en el cerebro (Simonian & Coyle, 1996), la microglia posee un sistema de GSH prominente con un contenido de GSH mayor al de neuronas o astrocitos. (Hirrlinger et al, 2000).

Las epilepsias, especialmente las farmacorresistentes, presentan una tasa de metabolismo oxidativo aumentado que no queda circunscrito al SNC, sino que presenta su contraparte a nivel sistémico. Prueba de ello son los estudios realizados con pacientes epilépticos sometidos a cirugía de epilepsia (López et al, 2007) donde se informa que los pacientes presentaban antes de la cirugía marcadores séricos de daño a biomoléculas altos y alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes sanguíneas con respecto a sujetos control. Además se encontró una correlación positiva entre los productos avanzados de oxidación y el tiempo de evolución de la enfermedad. Luego de la cirugía los pacientes mostraron una tendencia a la regularización de todas las variables medidas. Otro estudio realizado por Hung-Ming et al (2002) en pacientes con epilepsia refractaria, epilepsia benigna y sujetos control provee datos que discurren por esta misma línea En este ensayo se verificó que especialmente los pacientes refractarios presentaban niveles de malonilaldehído (informado como índice del nivel de peroxidación) y SOD aumentados junto con GSH descendidos en suero comparados con sujetos control.

Estos hallazgos permiten corroborar que el estrés oxidativo presentado en los pacientes con pobre control de crisis no está exclusivamente vinculado con el SNC, por lo tanto el factor Nfr2 estaría activando las enzimas y transportadores anteriormente mencionados a nivel sistémico. Como consecuencia de ello el estrés oxidativo mediante Nfr2 sería el responsable de la sobreexpresión de transportadores de eflujo a nivel sistémico.

Otra conexión de relevancia es la que se observa con células tumorales. Como fue mencionado en el capítulo 2 el fenotipo MDR se le asignaba a las células tumorales en el entendido que las mismas tenían la capacidad de expresar transportadores de membrana capaces de eliminar quimioterápicos. Hoy en día puede establecerse una conexión cierta entre el aumento de Nfr2 y el intento de las células de sobrevivir al stress oxidativo (Wang et al, 2008), lo cual repercute en el fenotipo MDR por sobreexpresión de P-gp y/o MRP2.

La caída en la expresión de transportadores con la edad y cómo la misma determina cambios en los parámetros farmacocinéticos de drogas como CBZ y DFH, también puede relacionarse con cambios en la actividad de Nfr2. En una investigación presentada por Suh et al (2004) se relaciona la pérdida de respuesta al estrés oxidativo en el anciano con un descenso de los niveles de GSH mediada por una disminución en la actividad transcripcional de Nfr2. Esta pérdida en la capacidad de respuesta del anciano determina la progresión de enfermedades neurodegenerativas subsecuentes a la excitotoxicidad, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

9.6- SOBREEXPRESIÓN SISTÉMICA DEL TRANSPORTE EFLUJO Y ELIMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS

Según lo expuesto previamente en este capítulo y en el resto de esta tesis quedaría suficientemente clara la conexión existente entre la epilepsia como fenómeno excitotóxico desencadenante de la expresión de transportadores de eflujo y entre la concentración de fármacos inductores y tal sobreexpresión.

Pero tal como se evidenció en esta tesis la depuración de fármacos antiepiléptico no necesariamente se incrementa con el fracaso terapéutico, tal el caso de DFH y presuntamente de DPA. Habría una menor eliminación con la sobreexpresión del transporte de eflujo (verificado a través de los cocientes S1/S2) llevando a una eventual intoxicación sistémica (para DPA debido a depleción de L-carnitina) o paradójica ineficacia para DFH dado el alto nivel plasmático pero bajo nivel cerebral.

CAPÍTULO 10

Conclusiones

Los trabajos realizados en el marco de la presente tesis doctoral condujeron a resultados que permiten elaborar las siguientes conclusiones finales:

- Los transportadores de membrana juegan un rol trascendente en la farmacocinética de los agentes antiepilépticos. No sólo afectan la llegada a los sitios donde actúan terapéuticamente, sino que modifican tanto la biodisponibilidad como la depuración desde el organismo.
- Sus localizaciones en la región esplácnica, tanto en la membrana apical de los enterocitos como en la membrana hepatobiliar modulan de alguna forma la eliminación presistémica durante el ingreso de fármaco por vía oral, y la eliminación sistémica desde el plasma sanguíneo.
- Los antiepilépticos CBZ, DFH y DPA son sustratos del transportador MRP2 pero sólo CBZ y DFH han demostrado ser agentes inductores de su actividad.
- Los preponderantes metabolismos hepáticos que presentan las 3 drogas antes mencionadas llevan a que la inducción del transportador MRP2 reduzca sus clearances en este órgano.
- Tanto CBZ como DFH son asimismo inductores enzimáticos, por lo que la reducción del CL podría ser en cierta medida revertido.

- Para el caso de CBZ se observa un aumento del clearance sistémico con el aumento de la dosis diaria recibida por el paciente. Pero también se suma a este efecto autoinductivo un descenso de la biodisponibilidad oral por aumento del CL presistémicos.
- La conclusión mencionada anteriormente se verificó en esta tesis mediante un ensayo clínico con voluntarios sanos, tanto la inducción del transportador de eflujo como del clearance sistémico.
- La inducción del transportador de eflujo MRP2 es la clave para comprender el incremento del cociente metabólico EPOX/CBZ, en virtud de que promovería un aumento de la biodisponibilidad del EPOX por dirigir preferencialmente a CBZ desde el hígado al intestino, donde operaría en mayor grado la enzima CYP3A4, responsable de la formación de EPOX.
- La confirmada inducción del transporte de eflujo refuerza las observaciones reportados por nuestro grupo de investigación el cual mencionaba también una reducción de la biodisponibilidad de CBZ dosis y tiempo dependiente. Esto sería debido a un aumento del CL presistémico.
- La DFH, que también confirma la inducción dosis (concentración) dependiente del transportador MRP2, no aumenta su propia depuración sino que por el contrario la reduce al incrementarse la dosis diaria. La explicación más razonable es que por aumento del transporte hepatobiliar se estaría evitando su muy preponderante eliminación hepática.
- El significativo descenso de la depuración sistémica de DFH no puede ser contrarrestado por la concomitante eliminación presistémica intestinal dado que la abundancia de enzimas CYP2C9 y CYP2C19 es mucho menos a nivel del enterocito, en contraposición de la muy abundante expresión de CYP3A4 que sirviera de explicación para el caso de CBZ.
- La referenciada reducción del clearance de DPA libre en plasma a medida que se incrementa la dosis diaria de la droga no pudo mediante esta tesis asociarse a una

modulación del transportador MRP2. Por el contrario, se ha especulado sobre la probable incidencia de la depleción de L-carnitina propiciada por DPA, como causa de un progresivo decremento del metabolismo mitocondrial a nivel hepático. Este punto resulta de gran interés y proyecta futuras investigaciones del grupo de trabajo.

- La diferente expresión de MRP2 existente naturalmente entre los sexos (mayor en mujeres) conduciría a una menor biodisponibilidad tanto de CBZ como el DFH en mujeres luego de dosis única por vía oral.
- La administración crónica de CBZ, no solo exacerbaría la reducción de la biodisponibilidad en la mujer, sino que en ellas también se incrementaría el CL sistémico en mayor grado por aflujo intestinal de droga en mayor proporción.
- La administración crónica de DFH no marcaría una diferencia de concentraciones plasmáticas tan importante entre hombres y mujeres ya que el componente intestinal del CL sistémico o presistémico no es relevante.
- El envejecimiento y el concomitante descenso de la expresión de MRP2 igualaría la biodistribución hígado-intestino de la droga en cuestión, afectando el CL sistémico o no según sea asimétrica o simétrica la contribución de ambos órganos en la depuración. En cambio el impacto que la caída de MRP2 tendría en la biodisponibilidad dependerá del valor inicial de este parámetro, si fuera en la juventud alta no habría cambios en la vejez, en tanto si fuera baja, la biodisponibilidad aumentaría con el envejecimiento. De estas combinaciones surgen las conclusiones dadas en los respectivos capítulos.
- Tanto para DFH como para CBZ la inducción de MRP2 a nivel de la BHE llevaría a una progresiva pérdida de potencia antiepiléptica dada la paulatina reducción del cociente de concentraciones cerebrales/concentraciones plasmáticas.
- La epilepsia con crisis no resueltas satisfactoriamente ha conducido a desarrollar mayor expresión de transportadores de eflujo según datos recogidos en la presente tesis.

- La conjugación de estas dos últimas observaciones podrían conducir a casos de epilepsia refractaria al tratamiento antiepiléptico con estas drogas.

Referencias

Alvin J, McHorse T, Hoyumpa A, et al. The effect of liver disease in man on the disposition of phenobarbital. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975; 192: 224-35

Aleksunes L, Manautou J. Emerging role of Nrf2 in Protecting Against Hepatic and Gastrointestinal Disease. *Toxicologi Pathology.* 2007; 35: 459-73.

Ahn JE, Cloyd JC, Brundage RC, Marino SE, Conway JM, Ramsay RE, White JR, Musib LC, Rarick JO, Birnbaum AK, Leppik IE. Phenytoin Half-Life and Clearance during Maintenance Therapy in Adults and Elderly Patients with Epilepsy. *Neurology.* 2008;71(1):38–43.

Argikar U, Rimmel R. Effects of aging on glucuronidation of valproic acid in human liver microsomes and the role of UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8 and UGT1A10. *DMD.* 2009; 37: 229-36.

Aronica E, Gorter J, Jansen G, et al. Expression and cellular distribution of multidrug transporter protein in two major causes of medically intractable epilepsy: focal dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience.* 2003; 118:417-29.

Babot Z, Cristofol R, Suñol C. Excitotoxic death induced by releases glutamate in depolarised primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci.* 2005; 21: 103-12.

Battino D, Croci D, Rossini A, et al. Serum carbamazepine concentrations in elderly patients: a case-matched pharmacokinetic evaluation based on therapeutic drug monitoring data. *Epilepsia.* 2003; 44: 923-9

Bauer LA, Davis R, Wilensky A, Ransys V, Levy RH. Valproic acid clearance unbound fraction and diurnal variation in young and elderly adults. *Clin Pharamcol Ther.* 1985; 37: 697-700.

Benarroch EE, Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clinic Proceedings.* 2005; 80: 1326-38.

Berg AT. Defining intractable epilepsy. *Adv Neurol.* 2006; 97: 5-10.

Berg AT. Identification of pharmacoresistant epilepsy. *Neurol Clin.* 2009; 27(4):1003-13

Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, et al. Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans. *Epilepsy Res.* 1996; 24: 163-72

Bohan TP, Helton E, Mc Donald I, König S, Gazin S, Sugimoto T, et al. Effect of L-carnitine treatment for valproate induced hepatotoxicity. *Neurology.* 2001; 56:1405-9

Bowdle A, Patel I, Levy R & Wilensky A. Valproic acid dosage and plasma protein binding and clearance. *Clin Pharamcol Ther.* 1980; 28(4): 486-92.

Browne TR, Evans JE, Szabo GK, et al. Studies with stable isotopes II : phenobarbital pharmacokinetics during monotherapy. *J Clin Pharmacol.* 1985; 25: 51-8

Carr R, Shrewsbury K. Hyperammonemia due to valproic acid in the psychiatric settings. *Am J Psychiatry* 2007; 164:1020-27.

Chaudhry A, Urban T, Lamba J, Birnbaum A, Rimmel R et al. CYP2C91B Promoter Polymorphism in Linkage with CYP2C192 affect Phenytoin Autoinduction of Clearance and Maintenance Dose. *JPET* 2010; 332(2): 599-661.

Cheitlin MD. Cardiovascular physiology – Changes with aging. *Am J Geriatr Cardiol* 2003; 12: 9-13.

Clark DD, Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. *In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors.* Basic neuro-chemistry: molecular, cellular and medical aspects, 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999: 637-670.

Cirrito JR, Deane R, Fagan A, Spinner ML, et al. P-glycoprotein deficiency at the blood brain-barrier increases amyloid- β deposition in an Alzheimer disease mouse model. *The Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115(11): 3285-90.

Couture L, Nash JA, Turgeon J, The ATP-binding cassette transporters and their implications in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev.* 2006; 58: 244-58.

Crentsil V. Mechanistic contribution of carnitini deficiency to geriatric frailty. *Ageing Res Rev.* 2010; 9(3): 265-8.

Cusack BJ, Tesnohlidek DA, Loseke VL, et al. Phenytoin pharmacokinetics in the rabbit: evidence of rapid autoinduction. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1987; 58: 269-72.

De Leeuw N, Shapiro L, Lowenstein L. Drug-induced Hemolytic Anemia. *Annals of Internal Medicine.* 1963; 58(4): 592-607.

Dickinson RG, Hooper WD, Patterson M, et al. Extent of urinary excretion of p-hydroxyphenytoin in healthy subjects given phenytoin. *Ther Drug Monit.* 1985; 7: 283-9.

D'Giano C, Sevlever G, Lazarowski A, et al. Expression of P-glycoprotein and related proteins in brain of patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 1997; 38 s7:41,2.58

Dreifuss F, Santilli N, Langer D, Sweeney K, Moine K, Menander K. Valproic acid hepatic fatalities: a restrsopective review. *Neurology.* 1987; 37: 379-85.

Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacolther.* 1999; 81: 163-221.

Drug Information Online.

<http://www.drugs.com/pro/valproic-acid-capsules.html> [Setiembre, 2011]

Duncan JS. Epilepsy surgery. *Clin Med.* 2007; 7(2): 137-142.

Electronic Medicines Compendium: Summary of product characteristics. Tegretol chewtabs 100 mg, 200 mg, Tegretol tablets 100 mg, 200 mg, 400 mg.

<http://emc.medicines.org.uk/medicine/1328/SPC/Tegretol%20chewtabs%20100mg,%20200mg,%20tablets%20100mg,%20200mg,%20400mg> [Marzo, 2010]

Fagiolino P. "Monitorización de Fármacos en saliva: Aplicaciones biofarmacéuticas, farmacocinéticas y terapéuticas". Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC). Universidad de la República Oriental del Uruguay, 1999b.

Fagiolino P. Multiplicative dependence of the first order rate constant and its impact on clinical pharmacokinetics and bioequivalence. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2004; 29 (1): 43-9

Fagiolino P, Eiraldi R & Vázquez M. The influence of cardiovascular physiology on dose / pharmacokinetic and pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships. (2006) *Clin Pharmacokinet.* 45(5): 443-8.

Fagiolino P, González N, Vázquez M, Eiraldi R. Itraconazole bioequivalence revisited: Influence of gender on highly variable drugs. *The Open Drug Metab J* 2007; 1: 7-13

Fagiolino P, Vázquez M, Eiraldi R, Maldonado C, Scaramelli A. Influence of Efflux transporters on Drug Metabolism. Theoretical Approach for Bioavailability and Clearance Prediction. *Clin Pharmacokinet.* 2011 50(2): 75-80.

Fagiolino P, Vázquez M, Olano I, et al. Systemic and presystemic conversion of carbamazepine to carbamazepine-10,11-epoxide during long term treatment. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2006; 12:13-6

Fagiolino P, Wilson F, Samaniego E, Vázquez M. In vitro approach to study the influence of the cardiac output distribution on drug concentration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2003; 28 (2): 147-53

Felix S, Sproule B, Hardy B, Naranjo C. Dose-related pharmacokinetics and pharmacodynamics of valproate in the elderly. *J Clin Psychopharmacol.* 2003; 23(5): 471-8.

Gambardella A & Marini C. Clinical spectrum of SCN1A mutations. *Epilepsia.* 2009; (Suppl, 5): 20-23.

García D, Nogué S, Sanjurjo E, Espigol G. Hiperamoniemia secundaria a intoxicación aguda por ácido valproico. *Rev Toxicol.* 2003; 20: 43-45

Geissmann T, May K, Modess C, et al. Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences de disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76: 192-200

Gerk, P, Vore M. Regulation of Expression of the Multidrug Resistance-Associated protein 2 (MRP²) and Its Role in Drug Disposition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302(2): 407-15.

Gerstner T, Buesing D, Longin E, Bendi C, Wenzel D, Scheid B et al. Valproic acid induced encephalopathy-19 new cases in germany from 1994 to 2003- a side effect associated to VPA-therapy not only in young children. *Seizure.* 2006; 15: 443-48.

Glick TH, Workman TP, Graufberg SV. Preventing Phenytoin intoxication: Safer use of a familiar anticonvulsant. *J Family Practice*. 2004; 53: 197-202.

Gottesman M, Pastan I, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. 1993 *Ann Rev Biochem*; 62: 385-427

Greene J, Greenamyre J. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog neurobiol*. 1996; 48: 61-634.

Handley A. Phenytoin Tolerance Tests. *British Medical_Journal*. 1970; 3: 203-4

Hirrlinger J, Gutterer JM, Kussmal L, Hamprecht B, Dringen R. Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev.Neurosci*. 2000; 22: 384-92.

Hoffmann, K, Loscher W. Up-regulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficiente TR(-) rats resembles seizure induced up-regulation of this drug transporters in normal rats. *Epilepsia*. 2007; 48(4): 631-45.

Howard CE, Roberts RS, Ely DS, More RA. Use of multiple-dose activated charcoal in phenytoin toxicity. *Ann Pharmacother* 1994; 28: 201-3.

Hu Y, Sampson K, Heyde B, Mandrell K, Li N, Zutshi A, Lai Y. Saturation of Multidrug-Resistance Protein 2 (Mrp2/Abcc2)-Mediated Hepatobiliary Secretion: Nonlinear Pharmacokinetics of a Heterocyclic Compound in Rats after Intravenous Bolus Administration. *DMD*. 2009; 37(4): 841-46.

Huffman D. Relationship between Digoxin concentrations in serum and saliva. *Clin Pharmacol Ther*. 1975; 17(3): 310 – 12.

Hung_Ming W, Liu C, Tsai J, Ko L, Wei Y. Antioxidant and anticonvulsant effect of a modified formula of chai-longu-muli-tang. *Am J Chin Med*. 2002; 30(2): 339-46

Jager Roman P, Pommianh P, Baird Lambert J, Buchanan N. Free sodium valproate monitoring. *Br J clin Pharmac*. 1982; 13 452-55

Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer H. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006; 2(3): 351-66.

Jung D, PowellJR, Watson P, Perrerr D. Effect of dose on phenytoin absorption. Clin Pharmacol Ther. 1980; 28: 479-85.

Kargi AY, Merriam GR. Age-Related Changes in the Growth Hormone Axis and Growth Hormone Therapy in the Elderly. <http://www.endotext.org/aging>. 2011.

Klaassen C & Aleksunes L. Xenobiotic, Bile Acid and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. Pharmacol Rev. 2010; 62: 1-96.

Klotz U. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptics drugs. Pharmacokinetic and therapeutic implications. Clin Pharmacokinet 2007; 46(4): 271-9

Kudriakova TB, Sirota LA, Rozova GI, Gorkoc VA. Autoinduction and steady-state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites. Br. J. clin. Pharmac. 1992; 33: 611-15.

Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. N Engl J Med 2000; 342(5): 314-319.

Kwan P, Brodie MJ. Definition of refractory epilepsy: defining the indefinable? Lancet Neurol 2000; 9(1): 27-29.

Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen HW, Mathern G et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. Epilepsia 2009: 1-9.

Lado F, Laureta S, Moshé. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. Epileptic Disorders. 2002; 4: 83-97.

Läpple F, von Richter O, Fromm MF, et al. Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. Pharmacogenetics 2003; 13: 565-75

Lazarowski A, Czornyj L. Mecanismo de Resistencia Múltiple a Fármacos en Epilepsias Refractarias. Tópicos de actualización en neurobiología – Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades Neurodegenerativas: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales. 2010; 401-21

Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, Girardi E, Vazquez S, D'Giano C. ABC-transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epilepsy. Epilep. 2007; 48(5): 140-9, 2007.

Lazarowski A, Riveros D, Selver G, Massaro M, Rabinowicz A. High Expression of multidrug drug resistance gene (MDR-1) and persistent low levels of phenytoin (PHT) on a patient with refractory epilepsy due to tuberous sclerosis (TS). *J Neurol Sci.* 1997; 150, S28#1-17-22.

Le Couteur DG, McLean AJ. The aging liver: drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 359-73

Levy RH. Cytochrome P450 isozymes and antiepileptic drug interactions. *Epilepsia* 1995; 36(Suppl. 5): S8-S13

Lheureux P, Panazola A, Zahir S, Gris M. Science review : Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity. What is the evidence? *Critical Care.* 2005; 9: 431-40.

Ling V, Does P-glycoprotein predict response to chemotherapy? *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81:84-8518

Lombardo L, Pelliteri R, Balazy M, et al. Induction of nuclear receptor and drug resistance in the brain microvascular endothelial cells treated with antiepileptic drugs. *Curr Neurovasc Res* 2008; 5 82-92

López J, González M, Lorigados L, Morales L, Riverón G, Bauzá J. Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. *Clin Biochem.* 2007; 40(5-6):292-8.

Lorigados-Pedre L, Orozco Suarez S, Morales Chacón L, Rocha-Arrieta L. Excitotoxicidad y apoptosis epilepsia. *Tópicos de actualización en neurobiología – Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades Neurodegenerativas: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales.* 2010; 69-85.

Löscher W. & Potschka H. Role of Multidrug Transporters in Pharmaco-resistance to Antiepileptic Drugs. *JPET.* 2002; 301(1): 7 – 14.

Loscher W & Potschka H. Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs. *JPET.* 2002; 301(1): 7-14.

Loscher W & Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology.* 2005; 76: 22-76.

Maldonado C, Fagiolino P, Vázquez M, Rey A, Olano I, Eiraldi R, Scavone C. Therapeutic Carbamazepine (CBZ) and Valproic acid (VPA) Monitoring in Children Using Saliva as a Biologic Fluid. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 2008; 14(2): 55-58

Man M, Prachi M, Puneet P, Siddartha G. Valproate induced non hepatic hyperammonaemic encephalopathy (VNHE) – a study from tertiary care referral university hospital, North India. *Journal of Pakistan Medical Association*. 2008; 58: 627-31.

Marson AG, Appleton R, Baker GA, Chadwick DW, Doughty J, Eaton B et al. A randomised controlled trial examining the longer-term outcomes of standard versus new antiepileptic drugs. The Sanad trial. *Health Technol Assess* 2007; 11(37): iii-x, 1.

Marty J, Kilpatrick C, Moulds R. Intra-dose variation in plasma protein binding of sodium valproate in epileptic patients. *Br. J. clin. Pharmacol*. 1982; 14: 399-404

Matin S, Wan S, Karam J. Pharmacokinetics of Tolbutamide: prediction by concentrations in saliva. *Clin Pharmacol Ther*. 1974; 16: 1052-8.

Mauro LS, Mauro VF, Brown DL, Somani P. Enhancement of phenytoin elimination by multiple-dose activated charcoal. *Ann Emerg Med*. 1987; 16: 1132-5.

McLean AJ, Le Couteur DG. Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 163-84

McElnay JC, D'Arcy PF. Age and genetic factors in drug interactions. In: D'Arcy PF, McElnay JC, Welling PG, editors. *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 122: Mechanisms of drug interactions. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1996: 279-304

Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet* 2002; 41 (5): 329-42

Meinardi H, Scott RA, Reis R, Sander JW. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. *Epilepsia* 2001; 42(1): 136-49.

Mickisch G. Chemoresistance of renal cell carcinoma:1986-1994. *World J Urol* 1994; 12: 214-23.

Nakajima M, Sakata N, Ohashi N, Kume T, Yokoi T. Involvement of Multiple UDP-glucuronosyltransferase 1A Isoforms in Glucuronidation of 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in Human Liver Microsomes. *DMD*. 2002; 30(11): 1250-56.

Nakamura H, Nakasa H, Ishii I, Ariyoshi N, Igarashi T, Ohmori S, Kitada M. Effect of endogenous steroids on CYP3A4-mediated drug metabolism by human liver microsomes. *DMD* 2002; 30:534-40.

Nakayama & D. Kayamoto (2001) Arch Oral Biol. 46: 521-7.

Nooter K, Westerman AM, Flens MJ, Zaman GJ, Scheper RJ, van Wingerden KE, Burger H, Oostrum R, Boersma T, Sonneveld P, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. Clin Cancer Res. 1995, 1(11):1301-10.

Olano, I., M. Vázquez & P. Fagiolino Chronopharmacokinetics of carbamazepine and its metabolite 10,11-epoxide. J Pharm Clin. 1998; 17:153-6.

Owen A, Goldring C, Morgan P, Park B, Pirmohamed M. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by Carbamazepine and rifampicin: the role of nuclear hormone response elements. Br J Clin Pharmacol. 2006; 62(2):237-42.

Paine M, Hart H, Ludington S, Haining R, Rettie A, Zeldin D. The human intestinal cytochrome P450 "pie". DMD. 2006; 34:880-886.

Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. CNS Drugs. 2002; 16: 695-714.

Perucca E, Grimaldi R, Gatti G, Pirracchio S, Crema F, Frigo G. Pharmacokinetics of valproic acid in the elderly. Br J Clin Pharmacol. 1984; 16: 104-5.

Potschka H, Fedrewitz M, Löscher W, Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain-barrier function and restricts antiepileptic drug activity. J Pharmacol Exp Ther 2003; 306:124-31

Reyes G, Santiago C. Epilepsia refractaria. Acta Neurol Colomb 2010; 26: 34-46.

Riad LE, Chan KK, Wagner Jr. WE, Sawchuk RJ. Simultaneous first- and zero-order absorption of carbamazepine tablets in humans. J Pharm Sci 1986; 75 (9): 897-900.

Rojanasthien N, Chaichana N, Teekachilateans S, Kumsorn B, Sangdee C, Chanrachang S. Effect of doses in the bioavailability of phenytoin from a prompt-release and extended release preparation: single dose study. J Med Assoc Thai. 2007; 90: 1883-93.

Rost D, Kopplow K, Gehrke S, Mueller S, Friess H, Ittrich C, Mayer D, Stiehl A. Gender-specific expression of liver organic anion transporters in rat. Eur J Clin Invest 2005; 35(10): 635-43.

Scaramelli A, Ketzoian C, Coirola G, Rega I, Dieguez E. Prevalence of Epilepsy in the Population of Uruguay. Epilepsia. 1995; 36(3): 15.

Schmidt-Nielsen B. The pH in parotid and mandibular saliva. *Acta Physiol Scand.* 1946; 11: 104-10.

Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(2): 107-21.

Secretaría de Salud. Programa de Atención a la Epilepsia. Ref. Type: Internet Communication; 2005. http://www.salud.gob.mx/unidades/conadic/epi_frecmex.htm.

Segura-Bruna N, Rodríguez-Campello A, Puente V, Roquer J. Valproate-induced hyperammonemic encephalopathy. *Acta Neurol Scand.* 2006; 114: 1-7.

Sharom F. ABC Multidrug transporters: Structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(1):105-27.

Shorvon SD, Farmer PJ. Epilepsy in developing countries: a review of epidemiological, sociocultural, and treatment aspects. *Epilepsia* 1988; 29(Supl. 1): S36-S54.

Shugarts S, Benet L. The Role of Transporters in the Pharmacokinetics of Orally Administered Drugs. *Pharmaceutical Research* 2009; 9(3): 2039-2054.

Simon F, Iwahashi M, Hu L, Qadri I, Arias I, Ortiz D, Dahl R, Sutherland E. Hormonal regulation of hepatic multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) primarily involves the pattern of growth hormone secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290: G595-G608.

Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36: 86-106.

Soldin, O.P. & D.R. Mattison Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. (2009) *Clin Pharmacokinet.* 48(3):143-57

Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T. Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci* 2006; 79(5): 455-61

Tishler D, Weinberg K, Hinton D, Barbaro N, GERALYN A, COREY R MDR1 Gene expression in brain of patient with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36:1-6

Uematsu T, Yamaoka M, Matsuura T, Doto R, Hotomi H, Yamada A, Hasumi-Nakayama Y, Kayamoto D. P-glycoprotein expression in human major and minor salivary glands. *Arch Oral Biol.* 2001; 46: 521-7.

Vázquez S, D'Giano C, Carpintiero S, Coronel K, Ugarnes G, Lazarowski A. Increase in ^{99m}Tc---SESTAMIBI(MIBI) liver clearance could identify epileptic pharmacoresistant patients. A preliminary study. *Epilepsia*. 2004; 45: 120.

Vázquez, M, P. Fagiolino, M. Rubio & L. Maletta-Fraile (1993) *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. Special Issue: 169-73 (Proceeding of the 5th Eur Congr Biopharm Pharmacokinetic, April 1993, Brussel)

Volk H, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, Loscher W. (2004) Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neurosci*. 123:751-9.

Vollrath V, Wielandt A, Iruretagoyena M, Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J*. 2006; 395: 599-609.

von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbau M, Kivistö KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 75(3): 172-83

Wadzinski J, Franks R, Roane D, Bayard M. Valproate-associated hyperammonemic encephalopathy. *J Am Board Fam Med*. 2007; 20:499-502.

Walker M, Fish D. Preoperative evaluation and outcome of surgical treatment of epilepsy. In: Sander JW, editor, *Epilepsy 2009 from benchside to bedside*, 12 edition. Oxford: International League against Epilepsy and National Society for Epilepsy; 2009: 431- 433.

Werz MA. Pharmacotherapeutics of epilepsy: use of lamotrigine and expectations for lamotrigine extended release. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2008; 4(5): 1035-46.

World Health Organization (WHO). International programme on chemical safety. Environmental health criteria 144. Principles of evaluating chemical effects on the aged population. Geneva, 1993. Available online: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc_144.htm [Accessed 2004 Oct 19]

Referencias figuras

Figura 1.1 - <http://www.solvo.jp/Solvo%20Solutions/instestine.html>

Figura 1.2 - <http://www.solvo.jp/Solvo%20Solutions/liver.html>

Figura 1.3 - <http://www.solvo.jp/Solvo%20Solutions/kidney.html>

Figura 1.4 - <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/xenobiotics/drug-metabolism-tech-review.html>

Figura 2.1 - Mecanismos de resistencia múltiple a fármacos en epilepsias refractarias. Lazarowski A, Czornyj L. Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades Neurodegenerativas: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales. Tópicos de Actualización en Neurobiología. 2010; 401-21.

Figura 2.2 - Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. Remy S, Beck H. Brain. 2006; 129(1): 18-35.

Figura 2.3 - http://www.pharmacy.umn.edu/faculty/bauer_bjoern/home.html

Figura 4.6 - Metabolic pathways and proposed reactive metabolites of CBZ. Pathways of Carbamazepine Bioactivation in Vitro. III. The Role of Human Cytochrome P450 Enzymes in the Formation of 2,3-Dihydroxycarbamazepine. Pearce RE, Lu W, Wang YQ, Uetrecht JP, Correia MA, Leeder JS. DMD August 2008; 36(8): 1637-1649

Figura 8.1 – Disposition of Valproic acid in maternal, fetal, and newborn sheep II: metabolism and renal elimination. Kumar S, Wong H, Yeung S, Riggs W, Abbott F, Rurak D. DMD. 2000; 28: 857-64.

Figura 8.2 - Science review : Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity. What is the evidence? Lheureux P, Panazola A, Zahir S, Gris M. *Critical Care*. 2005; 9: 431-40.

Figura 8.3 - Hiperamoniemia secundaria a intoxicación aguda por ácido valproico. García D, Nogué S, Sanjurjo E, Espigol G. *Rev Toxicol*. 2003; 20: 43-45.

Figura 9.1 - Excitotoxicidad y apoptosis epilepsia. Lorigados-Pedre L, Orozco Suarez S, Morales Chacón L, Rocha-Arrieta L. *Tópicos de actualización en neurobiología – Excitotoxicidad y Cognición en Enfermedades Neurodegenerativas: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales*. 2010; 69-85.

Figura 9.2 - Cancer chemoprevention: scientific promise, clinical uncertainty. Sporn MB and Liby KT. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005; 2: 518–525.

Anexo 1

Protocolo experimental del estudio de fenotipificación de transportadores de membrana utilizando digoxina (DGX) y carbamazepina (CBZ)

INDICE

- I. Introducción.
- II. Criterios de Inclusión de los Voluntarios Sanos.
- III. Criterios de Exclusión de los Voluntarios Sanos.
- IV. Etapas y horarios de las tomas de muestras.
- V. Instrucciones para el muestreo y la ingesta de comidas y bebidas.

I. INTRODUCCIÓN

A los efectos de evaluar el comportamiento auto y heteroinductor metabólico de la CBZ en la posible sobre-expresión de transportadores de eflujo localizados en distintos tejidos, se procederá a analizar el impacto de un tratamiento de 400 mg diarios de CBZ durante una semana, sobre la absorción y eliminación de DGX administrada por vía oral.

El estudio consta de tres etapas con una duración total de 12 días, siguiendo un régimen de internación parcial en el lugar donde se hará la supervisión del ensayo clínico. Doce voluntarios de ambos sexos recibirán en la primer etapa DGX por vía oral. En una segunda etapa recibirán CBZ en comprimidos de liberación inmediata (mitad de hombres y mitad de

mujeres) o de liberación prolongada (las otras mitades de ambos grupos), durante una semana. En la tercer etapa se volverá a administrar DGX oral de igual forma que al inicio.

La administración de DGX será en dosis única de 0,5 mg (2 comprimidos) durante las etapas antes mencionadas, evaluando en cada caso la velocidad y la cantidad de DGX excretada en orina, así como su concentración en saliva en la fase de absorción.

II. CRITERIOS DE INCLUSION

- Haber firmado el Consentimiento Informado (Anexo 1) previa lectura y comprensión de este Protocolo.
- Haber presentado adecuadas pruebas de Laboratorio, con evaluación médica cardiológica y general sin inconvenientes (Anexo 2).
- Poseer una edad entre 21 y 40 años.
- En el caso de mujeres iniciar el estudio al séptimo día de haberse presentado la menstruación.

III. CRITERIOS DE EXCLUSION

- Apartarse de los criterios de inclusión.
- Mujeres cursando embarazo.
- Recibir tratamiento medicamentoso, excepto anticonceptivos.
- Beber diariamente más 250 mL de vino, o más de 500 mL de cerveza, o equivalente en bebidas alcohólicas.
- Presentar alguna patología al momento del estudio.

IV. ETAPAS Y HORARIOS DE LAS TOMAS DE MUESTRAS.

ETAPA 1: DIAS 1 Y 2, DIGOXINA EN DOSIS ÚNICA

Descripción general de la Etapa 1:

Tiene una duración de dos días.

En esta etapa se evaluará la actividad basal de los transportadores mediante la ingesta de 2 comprimidos (0,50 mg) de Digoxina (DGX). Se extraerán muestras de saliva en fase de absorción, se ingerirá un vaso de agua sin gas (250 mL) cada dos horas entre las 08:00 y las 24:00 horas. Se recogerán muestras de orina cada dos horas anotando en cada caso la diuresis (volumen de orina de cada intervalo), salvo durante el descanso nocturno previsto

entre las 24:00 y las 07:00 del día siguiente, período en el cual se procede a una única diuresis por la mañana o en su defecto a varias diuresis nocturnas que se juntan, determinando una única muestra.

Estarán controladas las actividades y la composición de las comidas, así como los horarios de cada evento, registrando cómo se procede, de tal forma de replicarlo en la etapa 3.

Cronología de la Etapa 1:

El día previo al inicio del estudio el voluntario cenará, y permanecerá en ayunas desde la hora 00:00 del día 1 del estudio.

DIA 1

El voluntario se presentará a la hora 07:30, en el lugar donde se desarrollará el ensayo clínico.

Entre las horas 07:30 y 08:00:

Se le recordarán las condiciones de muestreo, de ingesta de líquidos y comida y de actividad física. Se higienizará la boca mediante cepillado sin dentífrico. Salivará para muestras S1 y S2 de pre-dosis. Orinará y anotará el volumen de orina.

08:00

El voluntario ingerirá los dos comprimidos de DGX, se enjuagará la boca ingiriendo el agua del enjuague, todo el procedimiento deberá hacerse con un volumen de agua sin gas de 250 mL.

08:30, 09:00 y 09:30

Procederá en estos tiempos a la salivación para las muestras S1 y S2.

10:00

Procederá a la salivación S1 / S2. Orinará y anotará el volumen de orina. Tomará 250 mL de agua.

10:30 y 11:00

Procederá en estos tiempos a la salivación S1 / S2, siendo las últimas de esta etapa.

12:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá el almuerzo: 1 milanesa al pan, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá la higiene bucal con pasta dental, debiendo terminar el procedimiento a más tardar 12:30 horas.

14:00

Procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua.

16:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá la merienda consistente en: 2 bizcochos y 1 vaso de leche o 1 yogurt y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL). Deberá terminar el procedimiento a más tardar 16:30 horas, incluyendo la higiene bucal.

18:00 y 20:00

En cada caso procederá a la recolección de orina. Tomará 1 vaso de agua (250 mL) luego de cada muestra de orina. Luego de ingerir el agua correspondiente a la hora 20:00 se retirará a su domicilio, procediendo como se indica seguidamente.

22.00

Recolectará orina. Ingerirá la cena: 1 porción de pasta con tuco o salsa, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá la higiene bucal con pasta dental. Deberá terminar el procedimiento a la hora 22:30.

24:00

Procederá a la recolección de orina. Descanso nocturno. Si se levantara para orinar durante la noche, deberá recoger todas las diuresis de ese período hasta la hora 07:00 del día 2. Luego de recoger la orina del intervalo de 7 horas, se dirigirá al lugar donde se supervisará el ensayo clínico.

DIA 2

08:00

Ingerirá el desayuno consistente en: 2 bizcochos o tostadas con manteca y mermelada o un sándwich de jamón y queso con una taza de café con leche o café solo (o té) y agua (la

suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL). Se permitirá la higiene bucal con pasta dental. Deberá terminar el procedimiento a más tardar 08:30 horas

10:00

Procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua.

12:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá el almuerzo: carne o pollo con ensalada de arroz o verduras, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá la higiene bucal con pasta dental.

14:00

Procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua.

16:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá la merienda consistente en: 2 bizcochos y 1 vaso de leche o 1 yogurt y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL).

18:00 y 20:00

En cada caso procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua luego de cada muestra de orina. Luego de su actividad prevista para la hora 20:00 se retirará a su domicilio, debiendo proceder como se indica seguidamente.

22:00

Recolectará orina. Ingerirá la cena: 1 porción de pasta con tuco o salsa, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá la higiene bucal con pasta dental. Deberá terminar el procedimiento a más tardar 22:30 horas. A partir de este momento se prohibirá consumir cafeína y cualquier otra xantina.

24:00

Procederá a la recolección de orina. Descanso nocturno. Si se levantara para orinar durante la noche, deberá recoger todas las diuresis de ese período hasta la hora 07:00 del día 3. Luego de recoger la orina del intervalo de 7 horas se dirigirá rápidamente al recinto donde se supervisará el ensayo clínico.

ETAPA 2: DIAS 3 AL 9 INCLUSIVE, CARBAMACEPINA EN DOSIS MÚLTIPLE

Descripción general de la Etapa 2:

Durante esta etapa que posee una duración de 7 días, el voluntario estará expuesto a 400 mg por día de carbamacepina, sea de liberación prolongada o de liberación inmediata. La asignación será aleatoria pero la mitad de hombres y de mujeres recibirá una formulación, en tanto la otra mitad recibirá la otra formulación.

En este período se aspira a que se instale la inducción de enzimas y transportadores propia de la acción de la CBZ. De confirmarse este hecho la propia farmacocinética de la droga estará influida.

Esta es la razón por la que se hará una evaluación farmacocinética con la primera dosis (única ingesta de 400 mg en el día) y otra al final de la exposición (200 mg cada 12 horas por los siguientes 6 días).

En esta etapa el fluido de monitoreo es exclusivamente saliva, y se recolectarán muestras S1 y S2 como se indica en el apartado 5.

La ingesta de comida del día 3 y del día 9 deben ser totalmente similares en horarios y composición. Está absolutamente prohibido ingerir jugo de pomelo en cualquiera de sus variantes incluyendo bebidas gaseosas que lo contengan. La ingesta de agua es según necesidad del voluntario a lo largo de los 7 días.

DIA 3

07:30

Se presentará el voluntario al recinto donde se realizará la supervisión del estudio, en ayunas, con las muestra correspondientes de orina que obtuvo en su domicilio: 1) 22:00 horas y 2) desde las 24:00 horas del día 2 hasta las 07:00 del día 3.

Entre la hora 07:30 y las 08:00:

Se le recordarán las condiciones de muestreo, de ingesta de líquidos y comida y de actividad física. Se higienizará la boca mediante cepillado sin dentífrico.

08:00

Salivará para muestras S1 / S2 de pre-dosis de CBZ. El voluntario ingerirá los dos comprimidos de CBZ (200 mg cada uno), se enjuagará la boca ingiriendo el agua del enjuague, todo el procedimiento deberá hacerse con un volumen de agua sin gas de 250 mL.

08:30, 09:00 , 09:30, 10:00, 11:00

Procederá en estos tiempos a la salivación para las muestras S1 / S2.

12:00

Procederá a la salivación para obtener S1 y S2. Ingerirá el almuerzo: 1 milanesa al pan, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se realizará la higiene bucal sin pasta dental. Deberá terminar el procedimiento a más tardar 12:30 horas.

13:00, 14:00, 15:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2.

16:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2. Ingerirá la merienda consistente en: 2 bizcochos y 1 vaso de leche o 1 yogurt y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL). Deberá terminar el procedimiento a más tardar 16:30 horas, incluyendo la higiene bucal sin pasta dental.

17:00, 18:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2.

20:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2, retirándose luego a su domicilio para proceder como se indica seguidamente.

22.00

Ingerirá la cena: 1 porción de pasta con tuco o salsa, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se realizará la higiene bucal sin pasta dental.

24:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2. Descanso nocturno.

DIA 4

07:30

Arribará al lugar donde se realizará la supervisión clínica del ensayo.

08:00

El voluntario mantendrá su ayuno desde la medianoche anterior, se higienizará la boca mediante cepillado sin dentífrico, y luego de reposar sentado durante 15 minutos procederá a la salivación para las muestras S1 / S2. Posteriormente desayunará e ingerirá 1 comprimido de 200 mg de CBZ, retirándose del recinto hasta el día 9 del estudio.

Almorzará aproximadamente a la hora 12:00, merendará aproximadamente a la hora 16:00.

20:00

Ingerirá 1 comprimido de 200 mg de CBZ con 250 mL de agua sin gas.

Cenará aproximadamente hora 22:00 y se acostará aproximadamente hora 24:00

DIAS 5, 6, 7, 8

Durante estos días el voluntario ingerirá siempre un comprimido de CBZ hora 08:00 y otro hora 20:00.

Tratará de repetir el mismo horario de comidas y su composición. Podrá en este período tomar bebidas con xantinas, con excepción de la cena del día 8.

DIA 9

07:30

El voluntario ingresará al recinto donde se supervisará el ensayo clínico, habiendo ayunado desde la medianoche anterior, y se preparará para las actividades del día. Quince minutos antes del primer muestreo se cepillará los dientes sin pasta dental, enjuagándose la boca.

08:00

El voluntario salivará para muestras S1 / S2. Ingerirá un comprimido de CBZ de 200 mg se enjuagará la boca ingiriendo el agua del enjuague, todo el procedimiento deberá hacerse con un volumen de agua sin gas de 250 mL.

08:30, 09:00 , 09:30, 10:00, 11:00

Procederá en estos tiempos a la salivación para las muestras S1 / S2.

12:00

Procederá a la salivación para obtener S1 y S2. Ingerirá el almuerzo: 1 milanesa al pan, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se realizará la higiene bucal sin pasta dental. Deberá terminar el procedimiento a más tardar 12:30 horas.

13:00, 14:00, 15:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2.

16:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2.

Ingerirá la merienda consistente en: 2 bizcochos y 1 vaso de leche o 1 yogurt y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL). Deberá terminar el procedimiento a más tardar 16:30 horas, incluyendo la higiene bucal.

17:00, 18:00

Procederá en esos tiempos a la salivación para las muestras S1 / S2.

20:00

Procederá a la salivación para las muestras S1 / S2. Tomará el segundo comprimido de CBZ del día y el último de la etapa y del estudio, con 250 ml de agua sin gas. Se retirará a su domicilio para proceder como se indica seguidamente.

22.00

Ingerirá la cena: 1 porción de pasta con tuco o salsa, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá realizar la higiene bucal con pasta dental.

ETAPA 3: DÍAS 10 A 12, DIGOXINA EN DOSIS ÚNICA

Descripción general de la Etapa 3:

Esta etapa es totalmente similar a la etapa 1. El voluntario procederá de la misma forma en todo sentido:

Muestras de saliva y de orina.

Horas de ingesta de agua y de comida.

Actividad y reposo.

Se recalca la importancia de repetir la misma composición de cada una de las comidas.

Cronología de la Etapa 3:

DIA 10

El voluntario se presentará a la hora 07:30 en el recinto donde se supervisará el ensayo clínico con un ayuno obligatorio desde la medianoche previa.

Entre las horas 07:30 y 08:00:

Se le recordarán las condiciones de muestreo, de ingesta de líquidos y comida y de actividad física. Procederá a higienizarse la boca sin dentífrico. Salivará para muestras S1 / S2. Orinará y anotará el volumen de orina

08:00

El voluntario ingerirá los dos comprimidos de DGX, se enjuagará la boca ingiriendo el agua del enjuague, todo el procedimiento deberá hacerse con un volumen de agua sin gas de 250 mL.

08:30, 09:00 y 09:30

Procederá en estos tiempos a la salivación para las muestras S1 y S2.

10:00

Procederá en este tiempo a la salivación S1 / S2. Orinará y anotará el volumen de orina. Tomará 250 mL de agua.

10:30 y 11:00

Procederá en estos tiempos a la salivación S1 / S2.

12:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá el almuerzo: 1 milanesa al pan, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá la higiene bucal con pasta dental. No sobrepasar las 12:30 horas.

14:00

Procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua.

16:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá la merienda consistente en: 2 bizcochos y 1 vaso de leche o 1 yogurt y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL). Finalizará a más tardar a las 16:30.

18:00 y 20:00

En cada caso procederá a la recolección de orina. Tomará 1 vaso de agua (250 mL) luego de cada muestra de orina. Finalizada su ingesta de agua prevista para la hora 20:00 se retirará a su domicilio, realizando las acciones que se indican seguidamente.

22.00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá la cena: 1 porción de pasta con tuco o salsa, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá realizar la higiene bucal con pasta dental, debiéndose terminar la actividad a las 22:30.

24:00

Procederá a la recolección de orina. Descanso nocturno. Si se levantara para orinar durante la noche, deberá recoger todas las diuresis de ese período hasta la hora 07:00 del día 11. Luego se dirigirá al recinto donde se supervisará el estudio.

DIA 11

08:00

Ingerirá el desayuno consistente en: 2 bizcochos o tostadas con manteca y mermelada o un sandwich de jamón y queso con una taza de café con leche o café solo (o té) y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL y no más). Se permitirá la higiene bucal con pasta dental. Terminará 08:30.

10:00

Procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua.

12:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá el almuerzo: carne o pollo con ensalada de arroz o verduras, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se realizará la higiene bucal con pasta dental.

14:00

Procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua.

16:00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá la merienda consistente en: 2 bizcochos y 1 vaso de leche o 1 yogurt y agua (la suma de los líquidos ingeridos deberá ser de 250 mL y no más)

18:00 y 20:00

En cada caso procederá a la recolección de orina. Tomará 250 mL de agua luego de cada muestra de orina. Finalizados los actos previstos para la hora 20:00 se retirará a su domicilio, realizando las actividades indicadas seguidamente.

22.00

Procederá a la recolección de orina. Ingerirá la cena: 1 porción de pasta con tuco o salsa, 1 postre lácteo o una fruta, 1 vaso de agua. Se permitirá realizar la higiene bucal con pasta dental, debiéndose terminar la actividad a las 22:30.

24:00

Procederá a la recolección de orina. Descanso nocturno. Si se levantara para orinar durante la noche, deberá recoger todas las diuresis de ese período hasta la hora 07:00 del día 12.

V. INSTRUCCIONES PARA EL MUESTREO Y LA INGESTA DE COMIDAS Y BEBIDAS.

Muestreo en saliva:

A 15 minutos de la hora prevista para el primer muestreo de la mañana o inmediato a una comida, el voluntario procederá a cepillarse los dientes sólo con agua, enjuagándose y descartando el enjuague. Luego permanecerá sentado hasta la hora prevista de toma de muestras de saliva. En ese momento se colocará pocos cristales de ácido cítrico sobre la lengua, lo retendrá 5 segundos, y recogerá la saliva en un tubo de plástico previamente rotulado, hasta la marca del enrase (1-2 mL). Tapaná el tubo que contendrá la muestra de primera fracción de saliva (S1). Inmediatamente vuelve a colocarse otros cristales de ácido cítrico, y procederá de igual manera. Tapaná el tubo conteniendo la segunda fracción de saliva (S2). Deberá permanecer sentado durante los dos muestreos. Ambas muestras S1 y S2 se colocarán inmediatamente en freezer a -20°C .

Muestreo en orina e ingesta de agua:

A la hora prevista del muestreo en orina el voluntario concurrirá al baño con tres recipientes:

- recipiente sobre el que coleccionará la orina (vaso de Bohemia)
- probeta graduada para medir la diuresis
- tubo de plástico rotulado para recoger alícuota de orina.

Cuidando de no derramar orina, el voluntario procederá a realizar la micción en el vaso de Bohemia. Luego medirá con la probeta el volumen correspondiente a esa diuresis. Anotará esa medida. Traspasará 5 mL de esa orina al tubo de plástico correspondiente. Tapaná el tubo. Descartará el resto de orina de la probeta. Procederá a lavar el vaso de Bohemia y la probeta graduada, enjuagando abundantemente con agua y dejando ambos recipientes boca abajo para escurrir. Se lavará las manos. El tubo de orina tapado y rotulado se colocará inmediatamente en freezer a -20°C . Ingerirá un vaso de agua sin gas de 250 mL.

Cuando la hora de muestreo de saliva y de orina coincidan, se realizará primero la extracción de S1 y S2. Luego el muestreo en orina. De esta forma los desplazamientos inherentes al muestreo de orina no interfieren en la salivación.

Ingesta de agua y de comida:

En los días 1, 2, 3, 9, 10,11, se deberá prestar especial cuidado de no ingerir líquidos o sólidos conteniendo xantinas, a excepción del desayuno de los días 2 y 11 (café o café con leche), ya que podría haber una acción diurética afectando la excreción urinaria de DGX, o podría haber una acción cardiovascular que modificaría la distribución de flujos sanguíneos y la concentración salival de DGX o de CBZ.

La actividad física e ingesta de líquidos y comidas en las etapas 1 y 3 deberán ser totalmente similares. No estarán permitidas bebidas con jugo de pomelo, infusiones, zumos de frutas, ya que se puede estar modulando la actividad del transportador de manera no buscada.

Anexo 2

Revalidación de la técnica analítica para la determinación de carbamacepina – carbamacepina epoxido en saliva

TÉCNICA ANALÍTICA

Preparación de muestras

Solución de Estándar Interno. Pesar aproximadamente 20 mg de Prominal Estándar, disolver y llevar a 50,0 mL con metanol. Tomar 1,00 mL de la solución anterior y llevar a 10,0 mL con el mismo solvente (0.040 g/mL).

Solución Madre. Pesar aproximadamente en forma exacta 13 mg de Carbamacepina Estándar, disolver y llevar a 100 mL con metanol (0.13µg/mL).

Soluciones Metanólicas. Utilizar la solución madre como punto mas concentrado de la curva (A). De esta solución hacer diluciones al medio del tal forma de obtener soluciones de concentración 0.065 (B), 0.033 (C), 0.017 (D) y 0.0085 (E) µg/mL.

Soluciones Plasmáticas. Tomar 500 µL de la solución (A) y agregarlos a 10,0 mL de salina blanco, homogeneizar en vortex (A'). Repetir este paso para las otras cuatro soluciones.

Extracción y concentración. Tomar 1,00 mL de la solución (A'), colocarlo en un tubo de ensayo de capacidad adecuada y agregar en forma exacta 50 µL de Solución de Estándar Interno y homogeneizar. Agregar 3 mL de Acetato de Etilo y agitar en vortex durante 1 minuto. Centrifugar durante 5 minutos y transferir la capa orgánica (superior), mediante el uso de una pipeta Pasteur, a un tubo de ensayo limpio y seco. Llevar a sequedad

evaporando el solvente bajo corriente de nitrógeno y retomar la muestra con 50 μL de metanol. Repetir el procedimiento para el resto de las soluciones plasmáticas.

Conservar las soluciones metanólicas en heladera y protegidas de la luz.

Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizan mediante cromatografía líquida según las siguientes condiciones:

Cromatógrafo	Shimadzu LC-6A
Detector	Espectrofotométrico, Shimadzu SPD-6A,
Columna	Phenomenex, Spherex C18 (150 X 4.60 mm, 5 μm)
Fase Móvil	Agua:MeOH:CH ₃ CN (58:38:4)
Longitud de onda	240nm
Flujo	2.0 mL/min
Volumen de inyección	20 μL
Temperatura	37°C

Revalidación Analítica en Saliva

- Curva de Calibración Carbamacepina

Para preparar las soluciones se pesó 12.7 mg de Carbamacepina Estándar (Pot.= xx, %H = xx), resultando en las siguientes concentraciones:

	Concentraciones sol. Metanólicas ($\mu\text{g/mL}$)	Concentraciones Salivales ($\mu\text{g/mL}$)
A	127.0	5.80
B	63.50	2.90
C	31.75	1.45
D	15.88	0.72
E	7.940	0.36

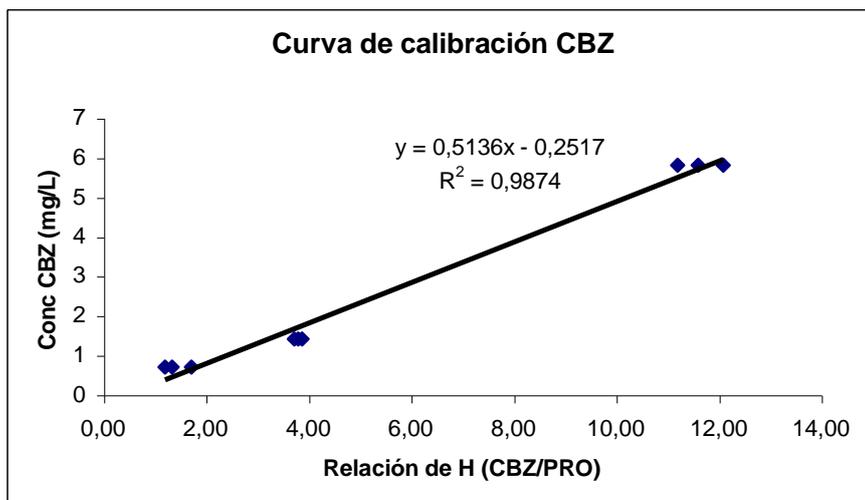
Para la solución de Estándar Interno se pesó 19,9 mg de Prominal, resultando en una concentración final de 0.0398 $\mu\text{g/mL}$.

Para la construcción de la curva de calibración se tomó en cuenta las alturas de los picos de Carbamacepina y Prominal, obteniéndose los siguientes valores:

Solución Salival	Relación de Alturas C/P *
A'	11.6
	12.2
	12.1
C'	3.88
	3.80
	3.72
D'	1.21
	1.34
	1.62

* C/P, cociente entre altura de pico de Carbamacepina y Prominal.

Para determinar la ecuación de la curva, se graficó las concentraciones de Carbamacepina vs. cocientes de alturas C/P:



- Linealidad

Ecuación del gráfico y tratamiento estadístico.

Pendiente	0.512
Ordenada	-0.239
R	0,9935 ($R^2 = 0,9874$)
F	538.09
Grados de Libertad	7
Error en la pendiente	2.2E-2
Error en la ordenada	0,157

La técnica analítica es lineal en el rango de concentraciones salivales de 0.36 a 5.80 $\mu\text{g/mL}$.

- Curva de Calibración Epóxido

Para preparar las soluciones se pesó 10.2 mg de Epóxido de Carbamacepina , resultando en las siguientes concentraciones:

	Concentraciones sol. Metanólicas ($\mu\text{g/mL}$)	Concentraciones Salivales ($\mu\text{g/mL}$)
A	20.4	0.93
B	10.2	0.46
C	5.10	0.23
D	2.55	0.11
E	1.27	0.057

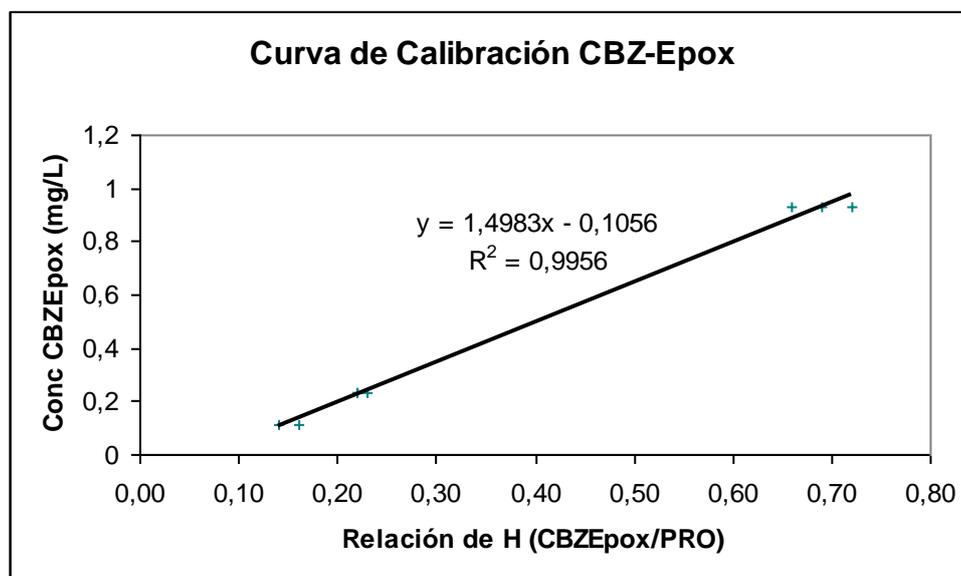
Para la solución de Estándar Interno se pesó 19,9 mg de Prominal, resultando en una concentración final de 0.0398 $\mu\text{g/mL}$.

Para la construcción de la curva de calibración se tomó en cuenta las alturas de los picos de Carbamacepina y Prominal, obteniéndose los siguientes valores:

Solución Salival	Relación de Alturas C/P *
A'	0.66
	0.69
	0.72
C'	0.23
	0.22
	0.22
D'	0.16
	0.14
	0.16

* C/P, cociente entre altura de pico de Carbamacepina-Epóxido y Prominal.

Para determinar la ecuación de la curva, se graficó las concentraciones de Carbamacepina-Epóxido vs. cocientes de alturas C/P:



- Linealidad

Ecuación del gráfico y tratamiento estadístico.

Pendiente	1.506
Ordenada	-0.110
R	0,9978 ($R^2 = 0,9956$)
F	1632
Grados de Libertad	7
Error en la pendiente	0,037
Error en la ordenada	0,016

La técnica analítica es lineal en el rango de concentraciones salivales de 0.057 a 0.93 $\mu\text{g/mL}$.

Anexo 3

Validación de técnica analítica para la determinación de lamotrigina en plasma y saliva

TÉCNICA ANALÍTICA EN PLASMA

Preparación de muestras

Solución de Estándar Interno. Pesar aproximadamente 40 mg de Trimetoprim Estándar, disolver y llevar a 50,0 mL con metanol. Tomar 5,00 mL de la solución anterior y llevar a 20,0 mL con el mismo solvente (200 µg/mL).

Solución Madre. Pesar aproximadamente en forma exacta 150 mg de Lamotrigina Estándar, disolver y llevar a 100 mL con metanol. Tomar 5,00 mL de la solución anterior y llevar a 50,0 mL con el mismo solvente (150 µg/mL).

Soluciones Metanólicas. Utilizar la solución madre como punto mas concentrado de la curva (A). De esta solución hacer diluciones al medio del tal forma de obtener soluciones de concentración 75,0 (B), 37,5 (C), 18,8 (D) y 9,38 (E) µg/mL.

Soluciones Plasmáticas. Tomar 500 µL de la solución (A) y agregarlos a 10,0 mL de plasma blanco, homogeneizar en vortex (A'). Repetir este paso para las otras cuatro soluciones.

Extracción y concentración. Tomar 1,00 mL de la solución (A'), colocarlo en un tubo de ensayo de capacidad adecuada y agregar en forma exacta 50 µL de Solución de Estándar Interno y homogeneizar. Agregar 1 mL de Hidróxido de Sodio 2M, 5 mL de Acetato de Etilo y agitar en vortex durante 1 minuto. Centrifugar la mezcla a 10800? r.p.m. durante 5 minutos y transferir la capa orgánica (superior), mediante el uso de una pipeta Pasteur, a un tubo de ensayo limpio y seco. Llevar a sequedad evaporando el solvente bajo corriente de nitrógeno

y retomar la muestra con 50 μL de metanol. Repetir el procedimiento para el resto de las soluciones plasmáticas.

Conservar las soluciones metanólicas en heladera y protegidas de la luz.

Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizan mediante cromatografía líquida según las siguientes condiciones:

Cromatógrafo	Shimadzu LC-6A
Detector	Espectrofotométrico, Shimadzu SPD-6A, 277 nm
Columna	Phenomenex, Spherex C18 (150 X 4.60 mm, 5 μm)
Fase Móvil	Agua:CH ₃ CN:Buffer Fosfato 0,5M* (79:20:1)
Longitud de onda	277nm
Flujo	1,6 mL/min
Volumen de inyección	20 μL
Temperatura	36 °C

* Buffer Fosfato, *Buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄*. Pesar 17.8g de *Na₂HPO₄.2H₂O* y 23.4g *NaH₂PO₄.2H₂O* y disolver en 500mL de H₂O destilada.

Validación Analítica en Plasma

- Curva de Calibración

Para preparar las soluciones se pesó 156.8 mg de Lamotrigina, resultando en las siguientes concentraciones:

	Concentraciones sol. Metanólicas ($\mu\text{g/mL}$)	Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/mL}$)
A	156.8	7.47
B	78.40	3.73
C	39.20	1.87
D	19.60	0.933
E	9.800	0.467

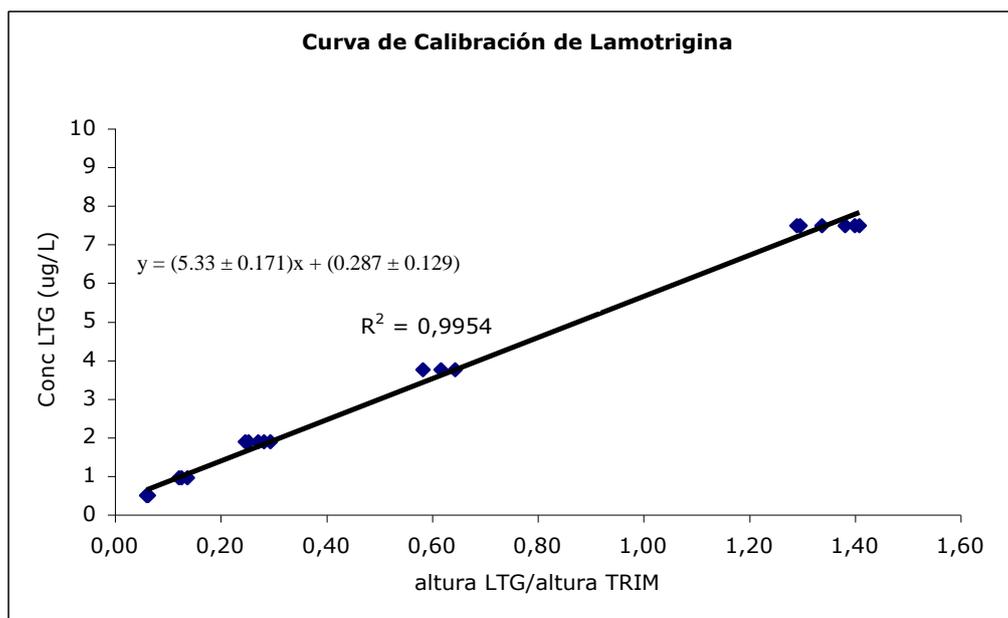
Para la solución de Estándar Interno se pesó 39,7 mg de Trimetoprim Estándar, resultando en una concentración final de 198,5 µg/mL.

Para la construcción de la curva de calibración se tomó en cuenta las alturas de los picos de Lamotrigina y Trimetoprim, obteniéndose los siguientes valores:

Solución Plasmática	Relación de Alturas L/T *
A' (RSD 3,8%)	1,2915
	1,3396
	1,4099
	1,4012
	1,3837
B'	1,2975
	0,6190
	0,5845
	0,6455
C' (RSD 7,3%)	0,2722
	0,2962
	0,2489
	0,2838
	0,2543
D'	0,1283
	0,1391
	0,1229
E' (RSD 1,7%)	0,0642
	0,0619
	0,0623
	0,0629
	0,0640

* L/T, cociente entre altura de pico de Lamotrigina y Trimetoprim.

Para determinar la ecuación de la curva, se graficó las concentraciones de Lamotrigina vs. cocientes de alturas L/T:



- Linealidad

Ecuación del gráfico y tratamiento estadístico.

Pendiente	5,33
Ordenada	0,291
R	0,9976 ($R^2 = 0,9954$)
F	4243,5
Grados de Libertad	20
Error en la pendiente	0,0819
Error en la ordenada	0,0620
Varianza residual de la regresión	0,0430
Varianza de X	6,01
IC 95% pendiente	0,171
IC 95% Ordenada en el origen	0,129

La técnica analítica es lineal en el rango de concentraciones plasmáticas de 0,467 a 7,47 µg/mL, con una ordenada en el origen que difiere significativamente de cero.

- Precisión

Precisión intradía

Nivel de Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
A' 7.47	3.8
C' 1.87	7.3
E' 0.467	6.4

Precisión interdía

Nivel de Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
A' 7.47	5.1
C' 39,20	8.1
E' 9,800	11.0

- Exactitud

Solución	Media de concentraciones	Valor verdadero	
A	7,73	7.47	103.6
C	1,83	1.87	98.3
E	0,495	0.467	106

- Especificidad

Se seleccionaron una serie de anticonvulsivantes que son generalmente coadministrados con Lamotrigina.

Fenitoína: No se observó pico

Fenobarbital: No se observa pico después de extracción.

Carbamacepina: Se observa pico a 27 min.

Epóxido de Carbamacepina: Se observa pico a los 10.4min pero en concentraciones mucho mayores a las terapéuticas.

TÉCNICA ANALÍTICA EN SALIVA

Preparación de muestras

Solución de Estándar Interno. Pesar aproximadamente 40 mg de Trimetoprim Estándar, disolver y llevar a 50,0 mL con metanol (Solución A). Tomar 5,00 mL de la solución anterior y llevar a 50,0 mL con el mismo solvente Solución C (80 µg/mL).

Solución Madre. Pesar aproximadamente en forma exacta 150 mg de Lamotrigina Estándar, disolver y llevar a 100 mL con metanol. Tomar 5,00 mL de la solución anterior y llevar a 50,0 mL con el mismo solvente (150 µg/mL).

Soluciones Metanólicas. De la solución madre se hace una dilución al medio y se toma como punto más concentrado de la curva (solución A 75mg/L). De esta solución hacer diluciones al medio del tal forma de obtener soluciones de concentración 37,5 (B), 18,8 (C), 9,38 (D) y 4.69 (E) µg/mL.

Soluciones Salivales. Tomar 500 µL de la solución (A) y agregarlos a 10,0 mL de saliva blanco, homogeneizar en vortex (A'). Repetir este paso para las otras cuatro soluciones.

Extracción y concentración. Tomar 1,00 mL de la solución (A'), colocarlo en un tubo de ensayo de capacidad adecuada y agregar en forma exacta 50 µL de Solución de Estándar Interno y homogeneizar. Agregar 1 mL de Hidróxido de Sodio 2M, 5 mL de Acetato de Etilo y agitar en vortex durante 1 minuto. Centrifugar la mezcla a 10800? r.p.m. durante 5 minutos y transferir la capa orgánica (superior), mediante el uso de una pipeta Pasteur, a un tubo de ensayo limpio y seco. Llevar a sequedad evaporando el solvente bajo corriente de nitrógeno y retomar la muestra con 50 µL de metanol. Repetir el procedimiento para el resto de las soluciones plasmáticas.

Conservar las soluciones metanólicas en heladera y protegidas de la luz.

Condiciones cromatográficas

Las muestras se analizan mediante cromatografía líquida según las siguientes condiciones:

Cromatógrafo	Shimadzu LC-6A
Detector	Espectrofotométrico, Shimadzu SPD-6A, 277 nm
Columna	Phenomenex, Spherex C18 (150 X 4.60 mm, 5µm)
Fase Móvil	Agua:CH ₃ CN:Buffer Fosfato 0,5M* (79:20:1)
Longitud de onda	277nm
Flujo	1,6 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura	36 °C

* Buffer Fosfato, Buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄. Pesar 17.8g de Na₂HPO₄·2H₂O y 23.4g NaH₂PO₄·2H₂O y disolver en 500mL de H₂O destilada.

Validación Analítica en Saliva

- Curva de Calibración

Para preparar las soluciones se diluye la solución madre de LTG al medio obteniéndose una solución A de concentración 78.4 µg/mL.

	Concentraciones sol. Metanólicas (µg/mL)	Concentraciones salivales (µg/mL)
A	78.40	3.73
B	39.20	1.87
C	19.60	0.933
D	9.800	0.467
E	4.900	0.233

Para la solución de Estándar Interno se tomó 5mL de solución madre de Trimetoprim y se lo llevó a 50mL con MeOH obteniéndose una solución 0.0794 mg/mL.

Para la construcción de la curva de calibración se tomó en cuenta las alturas de los picos de Lamotrigina y Trimetoprim, obteniéndose los siguientes valores:

Solución Salival	Relación de Alturas L/T *
A'	2.70
	2.88
	2.81
B'	1.41
	1.21
	1.25
C'	0.583
	0.609
	0.586
D'	0.233
	0.263
	0.257
E'	0.142
	0.153
	0.127

* L/T, cociente entre altura de pico de Lamotrigina y Trimetoprim.

Para determinar la ecuación de la curva, se graficó las concentraciones de Lamotrigina vs. cocientes de alturas L/T:

- Linealidad

Ecuación del gráfico y tratamiento estadístico.

Pendiente	1.28
Ordenada	0.131
R	0.997
F	3731.11
Grados de Libertad	13
Error en la pendiente	0.021
Error en la ordenada	0.027
Varianza residual de la regresión	6.54E-03

Varianza de X	14.77
IC 95% Pendiente	+/-4.46E-02
IC 95% Ordenada en el origen	+/-5.84E-02

La técnica analítica tiene comportamiento rectilíneo en el rango de concentraciones plasmáticas de 0,233 a 3.73 $\mu\text{g/mL}$, con una ordenada en el origen que difiere significativamente de cero.

- Precisión

Precisión intradía

Nivel de Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
A'	5.5
C'	6.3
E'	12.7

Precisión interdía

Nivel de Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
A'	7.5
C'	8.4
E'	13.3

- Exactitud

Solución	Media de concentraciones	Valor verdadero	
A	3.59	3.73	96.4
C	0.91	0.93	97.9
E	0.25	0.23	109.1

- Especificidad

Se seleccionaron una serie de anticonvulsivantes que son generalmente coadministrados con Lamotrigina.

Fenitoína: No se observó pico

Fenobarbital: No se observa pico después de extracción.

Carbamacepina: Se observa pico a 27 min.

Epóxido de Carbamacepina: Se observa pico a los 10.4min pero en concentraciones mucho mayores a las terapéuticas.