



Tesis de Doctorado en Química
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Química – Universidad de la República



Influencia del Efecto Autoinductivo/Autoinhibitorio en la Respuesta Farmacocinética de la Fenitoína

Silvana Alvariza

Co-tutores: Prof. Pietro Fagiolino
Prof. Marta Vázquez

Montevideo, 22 de setiembre de 2014

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar a mis directores de tesis: Prof. Pietro Fagiolino y Prof. Marta Vázquez por su apoyo y dirección científica y académica.

A mis compañeros: Manuel Ibarra, Cecilia Maldonado, Leticia Caligaris, Rosa Eiraldi, Natalia Guevara, Laura Magallanes, Raquel González y Beatriz González.

A la Dra. Sandra Orozco, la Dra. Iris Feria y todos los estudiantes y personal que colaboraron durante mi estancia en la Unidad de Investigación Médica en enfermedades Neurológicas del Instituto mexicano del Seguro Social: Vinni, Miguel, Angélica, David y Carmelita.

A la Dra. Luisa Rocha y a Argelia Rosillo de la Torre del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

A mi familia y amigo, en especial a Vero que me ayudó con la edición final de esta tesis.

Otra vez a Manuel por su apoyo constante durante todos estos años

Índice

Capítulo 1:	Introducción.....	4
Capítulo 2:	Estudio de la inducción de transportadores de eflujo concentración dependiente mediada por fenitoína	16
Capítulo 3:	Efecto del verapamilo sobre la farmacocinética de la fenitoína.....	28
Capítulo 4:	Efecto del verapamilo sobre la transferencia de fenitoína hacia el cerebro.....	35
Capítulo 5:	Estudio del efecto de diferentes frecuencias de administración de fenitoína en voluntarios sanos.....	42
Capítulo 6:	Impacto de las diferentes frecuencias de administración de fenitoína en voluntarios sanos	61
Capítulo 7:	Conclusiones.....	69
Anexo I:	Dosificación de fenitoína y p-hidroxifenilhidantoína en plasma de rata.....	73
Anexo II:	Técnica inmunohistoquímica para la determinación de Pgp.....	78
Anexo III:	Técnica analítica para determinación de Fenitoína en dializado cerebral de ratas.....	79
Anexo IV:	Consentimiento informado	80
Anexo V:	Ficha de aptitud física y bioquímica de voluntarios participantes del ensayo clínico	95
Anexo VI:	Técnica analítica para determinación de Fenitoína en saliva y plasma, y p-hidroxifenilhidantoína en plasma humano.....	99
Anexo VII:	Procedimiento y técnica analítica para ensayo de disolución de especialidades farmacéuticas conteniendo fenitoína.....	106
Anexo VIII:	Análisis de polimorfismos rs1051740 y rs2234922 en el gen Epóxido Hidrolasa y del gen COMT.....	110

Capítulo I: Introducción

Son numerosos los ejemplos de drogas cuya administración crónica es capaz de modificar su farmacocinética. Estas sustancias pueden mostrar cambios en sus perfiles a lo largo del tiempo o bien provocar que las concentraciones halladas en el fluido de medida más utilizado, el plasma, pierda correlación con los niveles presentes en la biofase, verdaderos causantes de los efectos farmacológicos.

Es sabido que la existencia de enzimas como las de la familia del Citocromo P450 y de transportadores de eflujo (Pgp, MRPI, MRP2) situados a lo largo del intestino, riñón e hígado juegan un importante rol en el *clearance* (CL) y biodisponibilidad (BD) de distintas drogas, pudiendo determinar la extensión de la absorción y eliminación de sus moléculas sustrato (Shugarts and Benet, 2009).

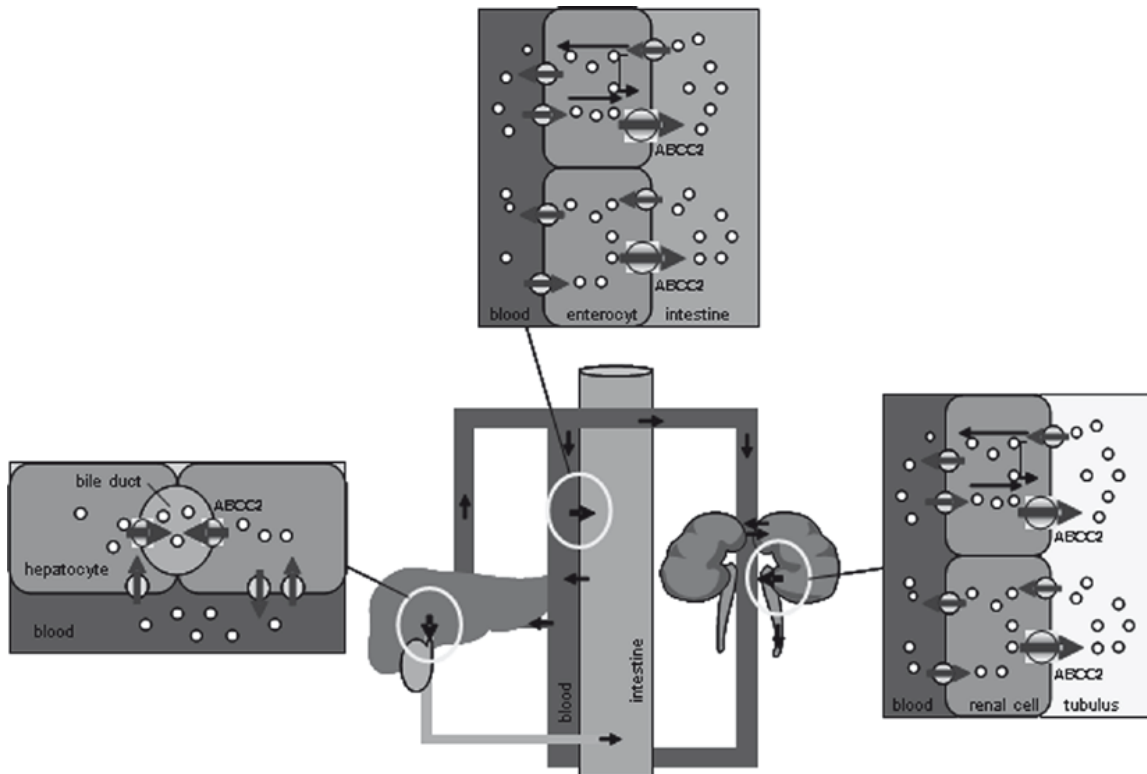


Figura 1.1: Ubicación de Pgp en células de la membrana apical de intestino, riñón e hígado y su rol en la absorción y disposición de sustratos. Tomado de Multi-drug resistance in cancer (2010), pág. 107.

Los transportadores de eflujo constituyen una familia de proteínas de membrana que se expresan en diferentes tejidos, donde trabajando concertadamente con diversos sistemas enzimáticos limitan la concentración intracelular de sus sustratos extruyéndolos activamente fuera de la célula a través de un mecanismo ATP- Ca^{2+} dependiente.

La Pgp fue el primer transportador descubierto y de los mejores estudiados hasta el momento. Se lo identificó en un principio como un mecanismo de resistencia de las células tumorales a la terapia antineoplásica, para ser luego descrita como constitutiva de una variedad de tejidos como hígado, intestino, riñón, páncreas, barrera hematoencefálica (BHE), plexos coroideos, placenta, testículos, etc. (Staud *et al.*, 2010). En estas barreras biológicas, la Pgp se ubica en la cara apical de las células desde donde limita el influjo y facilita el eflujo de sus sustratos evitando la acumulación intracelular. Ubicados en estos sitios, es de esperar que tanto Pgp como otros transportadores de eflujo tengan un significativo impacto en la farmacocinética de las drogas que son sus sustratos. Basándose en su distribución anatómica, se le atribuyen a la Pgp tres funciones fundamentales: limita la absorción de xenobióticos; una vez que los mismos han accedido a la circulación sistémica limita su entrada a órganos y tejidos sensibles, y facilita la eliminación de la droga sus metabolitos y conjugados hacia la bilis y orina.

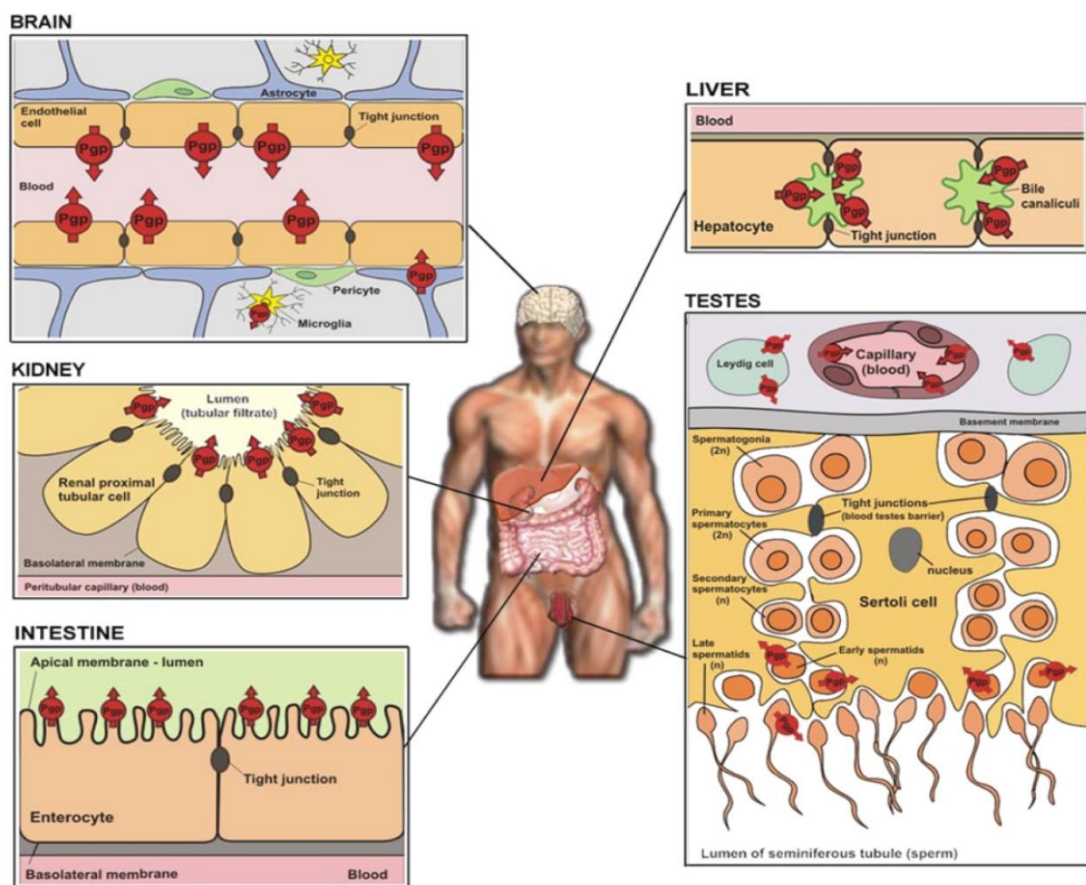


Figura 1.4: Localización de Pgp en tejidos humanos. Tomado de Multi-Drug resistance in cancer (2010), pág. 201.

Los sustratos de la Pgp son química y estructuralmente muy diversos y no se ha podido aún establecer una relación estructura-afinidad para los mismos. Parecería que la lipofilidad de la molécula y el número de enlaces de hidrógeno que es capaz de establecer

son propiedades importantes en la afinidad entre Pgp sus sustratos. Aunque muchos de ellos son moléculas no cargadas o bases débiles, algunos compuestos acídicos pueden ser también transportados (Seelig and Landwojtowicz, 2000). Además de los anticonvulsivantes varios grupos farmacoterapéuticos han sido catalogados como sustratos de Pgp y/o otros transportadores. Tal es el caso de los fármacos antirretrovirales inhibidores de proteasa, antibióticos, opioides, etc. (Fromm, 2004).

Fagiolino *et al.* (2011) proponen para algunos fármacos anticonvulsivantes clásicos, drogas conocidas por sus cinéticas no lineales, un único modelo que explicaría sus comportamientos farmacocinéticos si estos, además de ser inductores enzimáticos, fueran inductores de los transportadores de eflujo.

En el transcurso de esta investigación se pretende confirmar este modelo y para ello se ha elegido como droga de estudio a la fenitoína (DFH), anticonvulsivante ampliamente utilizado en la terapéutica y extensamente estudiado a causa de su farmacocinética no lineal en la que incrementos de dosis provocan un aumento no proporcional de sus concentraciones plasmáticas, fenómeno hasta hoy explicado como consecuencia de una limitada capacidad de metabolización de las enzimas involucradas en su depuración (cinética de Michaelis-Menten).

Si bien Michaelis-Menten, provee de una herramienta útil a la hora de implementar ajustes posológicos en la práctica habitual, surgen inconsistencias con respecto al marco teórico que lo soportan. Por ejemplo, ha sido referenciado que dosis únicas orales comprendidas entre 100 y 300 mg de DFH mostraron una respuesta farmacocinética lineal, con disminución de la velocidad de absorción, pero no de la cantidad absorbida, a medida que se incrementaba la dosis administrada (Rojanasthien *et al.*, 2007). Es decir que las áreas bajo la curva 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 a 13 h).

Por otra parte, Jung *et al.* (1980) informaron que la administración de dosis únicas comprendidas entre 400 y 1600 mg mostraba una pérdida progresiva de BD, cada vez más evidente con el aumento de la dosis, resultando claro además el progresivo retraso en alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) cuando se administraron dosis altas en una única toma, fruto de la saturación del fluido intestinal durante la disolución de la droga y del consecuente cambio de cinética de absorción pasando de un proceso de

primer orden a un proceso de orden cero. Sin embargo, la dosis de 1600 mg administrada en forma fraccionada, 400 mg cada 3 horas, recuperó la BD registrada para dosis bajas y permitió alcanzar una C_{max} acorde con el pronóstico lineal de concentración *versus* dosis. Los autores de esta investigación reafirmaron, en dosis única, la clásica cinética de Michaelis-Menten que se reporta para DFH cuando se administra en tratamientos crónicos. Sus resultados mostraban también un cambio en la velocidad de decaimiento de concentraciones plasmáticas luego de una única dosis intravenosa de 15 mg/kg (aproximadamente 1200 mg), por lo que informaron un CL concentración-dependiente, con parámetros característicos de dicho comportamiento cinético: $K_m = 9,43 \text{ mg/L}$ y $V_{max} = 8,25 \text{ mg/kg/día}$.

Existen fuertes evidencias que indican una importante secreción de DFH desde la sangre hacia el tracto digestivo, tras lo cual la droga volvería a absorberse al organismo desde la luz intestinal. Observaciones de segundos picos de concentraciones plasmáticas luego de administrar dosis intravenosas de DFH demuestran la importante contribución de la recirculación entre medio interno y lumen gastrointestinal en la farmacocinética de esta droga (Handley, 1970; Glick *et al.*, 2004). Esto podría explicar el aumento de la velocidad de eliminación registrado tras la administración intravenosa de 1200 mg en única dosis ya que muy probablemente el perfil de concentraciones plasmáticas estuviese enmascarando reabsorciones de DFH cada vez menos intensas con el transcurso del tiempo a causa de las menores concentraciones remanentes en el organismo, que se estarían dando naturalmente por la progresiva biotransformación de la droga.

Una explicación alternativa para el incremento de la velocidad de eliminación tras la dosis intravenosa de DFH podría también hacerse en base a la capacidad inductora que esta droga posee sobre diferentes enzimas, incluidas aquellas involucradas en su propio metabolismo, fenómeno que se manifestaría a los pocos días de activada la biosíntesis del RNA mensajero que codifica la correspondiente proteína (Chaudhry *et al.*, 2010). Sin embargo esta hipótesis no encaja con la acumulación 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 ocurrir si la inducción enzimática fuera la causa de la farmacocinética no lineal de este fármaco.

En virtud de las inconsistencias antes mencionadas es que en la hipótesis propuesta por Fagiolino *et al.* (2011) se 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 a nivel enzimático sino a nivel de los transportadores de eflujo que rigen la transferencia hepato-biliar y el pasaje hacia la luz intestinal desde los enterocitos. El transportador involucrado sería, entre otros, la Glicoproteína-P (Pgp), bomba de eflujo mediante la que se estaría secretando intensamente la droga hacia la luz del tracto digestivo, propiciando así la autoinducción de su expresión, lo que 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 existente en los enterocitos (Läpple *et al.*, 2003), reduciéndose así el CL de manera concentración-dependiente tal como se verifica durante los tratamientos crónicos.

Para una mejor comprensión de lo explicado, en la Figura 1.2 (A) se muestra un modelo farmacocinético multicompartimental para DFH en estado basal de expresión de enzimas y transportadores. Se incluyó en este modelo a la vesícula biliar ya que juega un importante rol en los procesos de circulación enterohepática.

La DFH, luego de su administración oral va a transitar por diferentes zonas de pHs a medida que se va absorbiendo por difusión pasiva a lo largo del tracto gastrointestinal. Al no ser relevante para esta droga el metabolismo presistémico, y ya que debido a sus propiedades fisicoquímicas ($pka = 8.3$) puede absorberse a lo largo de todo el intestino, la presencia de transportadores de eflujo en el epitelio intestinal da lugar a ciclos entero-entéricos, que no afectan su BD pero generan un retardo en su absorción.

En su pasaje por el hepatocito, ya sea durante su absorción o disposición, la droga por medio de transportadores de eflujo puede ser enviada a la vesícula biliar desde donde podrá ser oportunamente descargada en la luz intestinal y desde donde podrá ser reabsorbida originando procesos de recirculación enterohepática. A su vez la DFH podría volver a la circulación sistémica durante su almacenamiento en el órgano como muestra la figura 1.2.

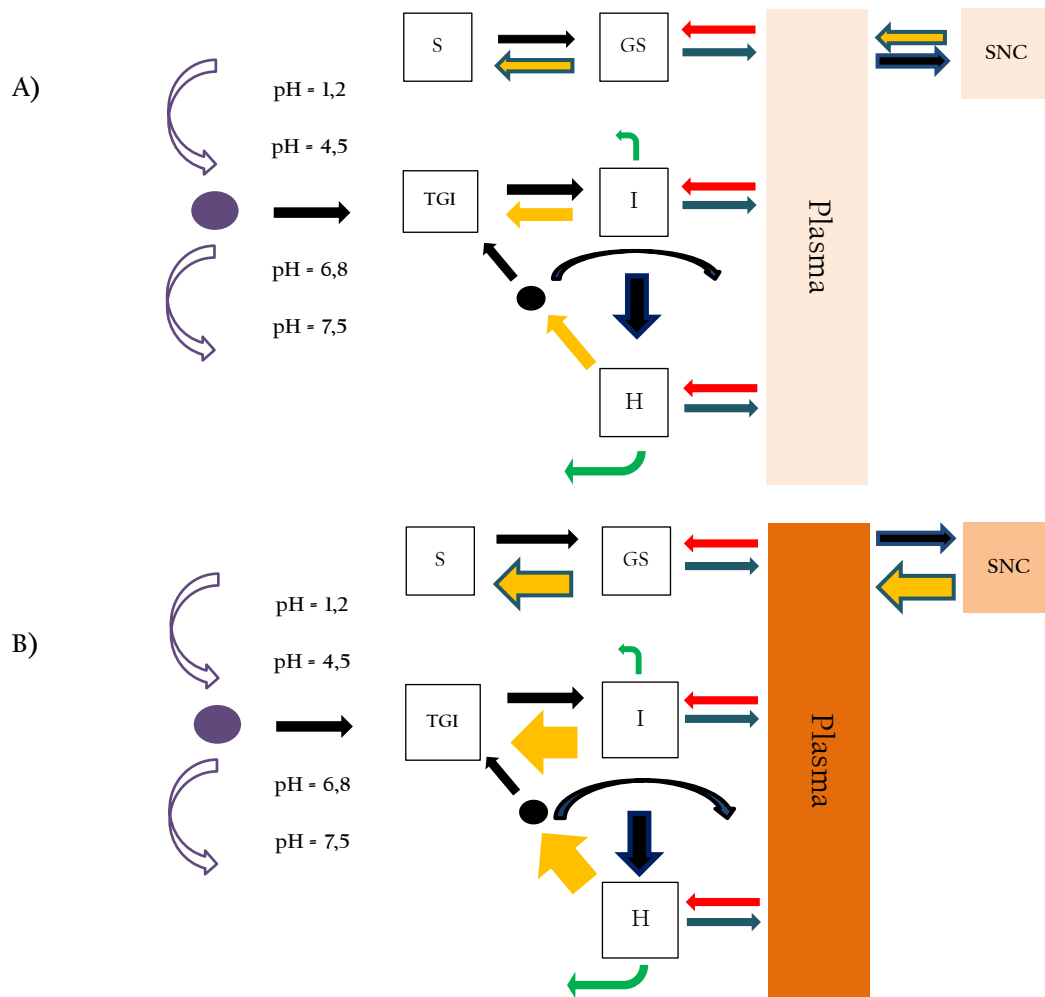


Figura 1.2: Modelo farmacocinético multicompartmental para DFH en estado basal de expresión de enzimas y transportadores de eflujo (A) y en estado de sobreexpresión de los mismos (B). TGI: luz del tracto gastrointestinal; I: Intestino; H: hígado; G: glándula salival; SNC: sistema nervioso central. El círculo negro representa a la vesícula biliar. El círculo violeta muestra a la forma farmacéutica conteniendo DFH administrada por vía oral y los diferentes pHs a los cuales se libera y absorbe el fármaco. Las flechas amarillas representan las transferencias mediadas por transportadores de eflujo, las negras transferencias por difusión pasiva y las flechas rojas y azules las transferencias por sangre arterial y venosa respectivamente. Las flechas curvas verdes indican pro esos de eliminación.

En este escenario, una inducción concentración-local dependiente del transporte de eflujo provocado por la propia droga, aumentaría todos los procesos que prolongan su permanencia en la zona esplácnica (Figura 1.2 (B)). De este modo disminuiría la cantidad de fármaco metabolizada a nivel hepático, ya que un mayor porcentaje del mismo entrará en el proceso de recirculación enterohepática, enviando a la DFH vía hepatobiliar a un sitio de escasa metabolización, por su bajo contenido de CYP2C9 y CYP2C19 como el intestino, desde el cual podrá volver a ingresar al organismo.

Este efecto de continua reentrada, motivado por una intensa recirculación enterohepática, podría entonces ser el responsable tanto de la escasa oscilación pico-valle que muestra la DFH en estado estacionario, como del aumento desproporcional de sus concentraciones

con los aumentos de dosis, y no la saturación enzimática como clásicamente se ha propuesto.

A la vez que la sobreexpresión de transportadores a nivel esplácnico conduciría a un aumento de las concentraciones plasmáticas del anticonvulsivante, a nivel del SNC, estas se verían disminuidas por aumento del eflujo hacia el exterior del cerebro.

Sobreexpresión del Transporte de Eflujo y Refractariedad Terapéutica

Según el Informe Sobre la Epilepsia en América Latina y el Caribe de la OMS del año 2013, la refractariedad al tratamiento farmacológico afecta alrededor de un 30 % de los pacientes epilépticos. Se ha propuesto a la sobreexpresión de los transportadores de eflujo en el cerebro como una de las causas del fracaso del tratamiento farmacológico (Tishler *et al.*, 2005). Debido a que muchas de las drogas anticonvulsivantes comúnmente utilizadas son sustratos de estas bombas, su entrada a ciertas zonas del cerebro se halla limitada llevando a bajas concentraciones del fármaco en sus sitios de acción. Este es el caso de la DFH, anticonvulsivante que a pesar de poseer demostrada eficacia en cuadros clínicos severos en fase convulsiva aguda, no escapa al fenómeno de la aparición de resistencia farmacológica durante el transcurso de tratamientos crónicos en ciertos pacientes susceptibles.

Por otra parte, existe evidencia que sugiere que algunas drogas, incluidas las anticonvulsivantes pueden ser también responsables de la sobreexpresión de los transportadores de eflujo (Geissmann *et al.*, 2004; Maldonado *et al.*, 2011).

Pudiendo ser el fármaco uno de los responsables de la sobreexpresión del transporte de eflujo, es posible que en el uso crónico pudiera perderse su efectividad, requiriéndose cada vez mayores dosis, que originarían mayor sobreexpresión de transportadores, hasta llegar a una situación de escaso margen de maniobra para el ajuste posológico debido a su conocida cinética no-lineal, que hace que pequeños aumentos en la dosis administrada conduzcan a grandes aumento en sus concentraciones plasmáticas y a la aparición de efectos tóxicos tan severos como las propias crisis convulsivas. Si bien en estos pacientes la entrada al cerebro de la droga estaría disminuida, se ha visto en animales de experimentación que la sobreexpresión se circunscribe a determinadas áreas (hipocampo y corteza parahipocampal) en las que se verifica una disminución de las concentraciones de drogas anticonvulsivantes, mientras que en otros lugares como el área septal del hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo, la expresión de Pgp no se ve afectada así como

tampoco las concentraciones locales de fármaco (Van Vliet *et al.*, 2007). Esta sobreexpresión regioespecífica explica porque en algunas áreas del cerebro las concentraciones pueden ser inefectivas al tiempo que en otros sectores se presenta toxicidad.

Varias estrategias se han propuesto a fin de solucionar la resistencia al tratamiento farmacológico de la epilepsia provocada por sobreexpresión del transporte de eflujo, como ser la modulación ya sea funcional, por uso de bloqueantes del transporte de eflujo, como de sus mecanismos de transcripción (Bauer *et al.*, 2005, Van Vliet *et al.*, 2010). Se ha trabajado también en el desarrollo de nuevas drogas no sustrato de transportadores (Di Ianni *et al.*, 2012). Otra alternativa ha sido el uso de sistemas de liberación de las drogas basadas en nanopartículas cargadas del fármaco como forma de sortear la actividad aumentada de transportadores (Rosillo de la Torre *et al.*, 2014)

En esta tesis se explora la utilización de regímenes posológicos alternativos de una de las drogas anticonvulsivantes clásicas más utilizada, como manera de mejorar su eficacia aumentando su penetración a través de la BHE.

Objetivos de la Investigación

Como se mencionó al principio de este capítulo, el objetivo de esta investigación es verificar la hipótesis de la inducción del transporte por DFH, su rol determinante en su comportamiento farmacocinético y sus implicancias en la terapéutica.

En primer lugar se recurrió a la utilización de modelos animales para la verificación de la capacidad inductiva concentración-dependiente de DFH sobre Pgp a nivel de diferentes tejidos en los que se expresa constitutivamente.

Para determinar el efecto de esta sobreexpresión de transportadores en la farmacocinética de la DFH se determinó el efecto que tiene sobre la misma la coadministración de un conocido bloqueante de Pgp como Verapamilo (VPM), tanto en el inicio de los tratamientos como en tratamientos crónicos en los que está operando la inducción de las proteínas transportadoras. El impacto del bloqueo de Pgp fue también estudiado a nivel del SNC mediante la medición de concentraciones cerebrales de DFH por la técnica de microdiálisis

En una segunda etapa, se realizó un ensayo clínico en voluntarios sanos utilizando dos tratamientos tal que entregando la misma dosis total pero bajo diferentes esquemas

posológicos generara diferentes estados inductivos medios sobre transportadores de eflujo. En este estudio a través la medición simultánea de la droga en saliva y plasma permitió la verificación de los estados de inducción de Pgp a los que se arribado luego de la administración de cada esquema posológico y proveyendo de datos relevantes en favor de la hipótesis planteada en esta tesis.

Referencias

Bauer B., Hartz A., Fricker G., Miller D. (2005). Modulation of P-Glycoprotein Transport Function at the Blood-Brain Barrier. *Exp Biol Med*; 230: 118-127

Chaudhry A., Urban T., Lamba J., Birnbaum A., Remmel R., Subramanian M, Strom S., You J., Kasperaviciute D., Catarino C., Radtke R., Sisodiya S., Goldstein D., Schuetz E. (2010). CYP2C*1B promoter polymorphism, in linkage with CYP2C19*2, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 332(2): 599-611

Di Ianni M., Enrique A., Palestro P., Gavernet L., Alan Talevi., Bruno-Blanch L. (2012). Several new diverse anticonvulsant agents discovered in a virtual screening campaign aimed at novel antiepileptic drugs to treat refractory epilepsy. *J. Chem. Inf. Model.*; 52, 3325-3330

Fagiolino P., Vázquez M., Eiraldi R., Maldonado C. Scaramelli A. (2011). Influence of efflux transporters on drug metabolism. Theoretical approach for bioavailability and clearance prediction. *Clin Pharmacokinet*; 50 (2): 75-80

Fromm M. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*; 25:423-429

Giessmann T., May K., Modess C., Wegner D., Hecker U., Zschiesche M., Dazert P., Grube M., Schroeder E., Warzok R., Cascorbi I., Kroemer H., Siegmund W. (2004). Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*; 76(3): 192-200

Glick T., Workman T., Gaufberg S. (2004). Preventing phenytoin intoxication: Safer use of a familiar anticonvulsant. *J Family Practice*; 53: 197-202.

Handley AJ. (1970). Phenytoin tolerance tests. *British Med J*; 3: 203-4.

Jung D., Powell J., Walson P., Perrier D. (1980). Effect of dose on phenytoin absorption. *Clin Pharmacol Ther*; 28: 479-85.

Läpple F., Von Richter O., Fromm M., Richter T., Thon K., Wisser H., Griese E., Eichelbaum M., Kivistö K. (2003). Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics*; 13(9): 565-75.

Maldonado C., Fagiolino P., Vázquez M., Eiraldi R., Alvariza S., Bentancur C., Álvarez P. (2011). Time-dependent and concentration-dependent upregulation of carbamazepine efflux transporter. A preliminary assessment from salivary drug monitoring. *Latin American Journal of Pharmacy*; 30:908-912.

Rojanasthien N, Chaichana N, Teekachunhatean S, Kumsorn B, Sangdee C, Chankrachang S. (2007). Effect of doses on the bioavailability of phenytoin from a prompt-release and an extended-release preparation: Single dose study. *J Med Assoc Thai*; 90: 1883-93.

Rosillo-de la Torre A., Luna-Bárceñas G., Orozco-Suárez S., Salgado-Ceballos H., García P., Lazarowski A., Rocha L. (2014). Pharmacoresistant epilepsy and nanotechnology. *Frontiers in Bioscience*; E6, 329-340

Seelig A., Landwojtowicz E. (2000). Structure activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur J Pharm Sci*; 12:31-40

Schwartz J. (2003). The influence of sex on pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*; 42 (2): 107-121.

Shugarts S. and Benet L. (2009). The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical Research*; 26, 2039-2054.

Staud F., Ceckova M., Micuda S., Pavek P. (2010). Expression and function of P-Glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. In *Multi-Drug Resistance in Cancer*. Zhou J (Ed). Human Press. New York.

Tishler D., Weinberg K., Hinton D., Barbaro N., Annett G., Raffel C. (1995) MDR gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia*; 36 (1): 1 - 6

Van Vliet E., Van Schaik R., Edelbroek P.M., Voskuyl R., Redeker S., Aronica E., Wadman W., Gorter J. (2007). Region-specific overexpression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier affects brain uptake of phenytoin in epileptic rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 322, 141-147.

Van Vliet E., Zibell G., Pekcec A., Schlichtiger J., Edelbroek P., Holtman L., Aronica E., Gorter J., Potschka H. (2010). COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*; 58 404-412

Capítulo 2: Estudio de la inducción de transportadores de eflujo concentración-dependiente mediada por fenitoína

Con el fin de cumplir con el primer objetivo de esta investigación: probar la hipótesis de que la sobreexpresión de transportadores de eflujo como Pgp puede ser mediada por fenitoína (DFH) y que esta inducción es dependiente de su concentración, se recurrió a la administración crónica del fármaco en animales de experimentación utilizando dos vías diferentes de administración: oral e intraperitoneal.

Esta etapa se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Todos los procedimientos utilizados en este experimento fueron realizados en acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199) y aprobados por el Comité de Ética de la Comisión Nacional de Investigación Científica.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron cuarenta y dos ratas hembras adultas de la cepa Sprague Dawley (SD), con pesos entre 250 y 300 g. Los animales fueron sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiente mantenida a 22° C y con libre acceso a agua y comida.

Administración Oral

Tres grupos de ratas hembras adultas SD, con 6 animales cada uno (G1, G2 y G3) fueron tratados con dosis orales de 25, 50 y 75 mg/kg/6h de DFH (EPAMIN® Suspensión oral, Pfizer Laboratories) durante 3 días. Fue incluido un grupo control de ratas SHAM (tratamiento simulado), al que se le administró 2 mL de solución de Dextrosa al 8% siguiendo el mismo esquema posológico.

Al 4to día de tratamiento, muestras sanguíneas de las venas caudales de los animales fueron extraídas con el fin de construir una curva de concentraciones plasmáticas. Para esto, cada grupo fue dividido en tres pares de individuos a los que se les tomó muestra en forma alternada. El muestreo fue efectuado cada 20 minutos durante 4 horas. Las muestras fueron recogidas en tubos Minivacutainer®, conteniendo EDTA como

anticoagulante y el plasma obtenido por centrifugación fue almacenado a -80°C hasta el momento del análisis.

Inmediatamente después de finalizada la extracción de muestras sanguíneas, 3 animales de cada grupo fueron sacrificados y muestras de tejido cerebral (hipocampo derecho), glándula parótida, hígado (lóbulo derecho) e intestino delgado (duodeno) fueron extraídos para el análisis de expresión de Pgp. Los restantes animales fueron sacrificados e igualmente analizados en su expresión de Pgp una semana después de interrumpido el tratamiento con DFH.

Biodisponibilidad Oral

Con el fin de determinar la biodisponibilidad (BD) oral de la solución administrada, otros dos grupos de tres individuos cada uno fueron tratados con dosis únicas de 100 mg/Kg por vía oral (G4) e intraperitoneal (G5) de DFH (EPAMIN™, suspensión oral o solución inyectable, Laboratorios Pfizer). Muestras sanguíneas de 150 μL fueron recolectadas cada 20 minutos durante 3 horas y cada 1 hora hasta las 6 horas de la vena caudal de cada animal y vertidas en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante (Minivacutainer™) y el plasma obtenido por centrifugación fue almacenado a -80°C hasta el momento del análisis.

Administración intraperitoneal

Para determinar la influencia de la ruta de administración y el esquema posológico sobre la inducción de los transportadores de eflujo, dos grupos de seis ratas cada uno se sometieron a tratamiento con DFH en una posología de 25 mg/kg/6h (G6) o 100 mg/kg/24h (G7) durante 4 días. Al cuarto día muestras sanguíneas de 150 μL fueron extraídas cada 20 minutos durante 3 horas de la vena caudal de cada animal y recolectadas en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante (Minivacutainer™) y el plasma obtenido por centrifugación fue almacenado a -80°C hasta el momento del análisis.

Inmediatamente después de finalizada la extracción de muestras sanguíneas, se procedió al sacrificio de los animales y muestras de tejido cerebral (hipocampo derecho), glándula parótida, hígado (lóbulo derecho) e intestino delgado (duodeno) fueron extraídos para el análisis de expresión de Pgp.

Técnica analítica

La técnica analítica para la dosificación de DFH y la determinación de Pgp por método inmunohistoquímico se adjuntan en los anexos I y II respectivamente.

Análisis farmacocinético y estadístico

Las áreas bajo la curva de concentraciones plasmáticas (AUC) fueron calculadas por el método de los trapecios desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo ($AUC_{\text{trapecios}}$), y extrapoladas a infinito en el caso de la determinación de la biodisponibilidad (G4 y G5), sumándole a las $AUC_{\text{trapecios}}$ el término C_{180}/β , siendo C_{180} la concentración obtenida en el último tiempo de muestreo (180 minutos) y β la constante de velocidad de eliminación, calculada como la pendiente de la regresión lineal del logaritmo neperiano de la concentración versus tiempo ($\ln(C)$ vs. t)

La comparación entre las expresiones de Pgp en los diferentes tejidos se realizó utilizando el test de Student para muestras no pareadas, luego de verificar homogeneidad de varianzas.

Resultados

Administración Oral

Las concentraciones medias de DFH para el 4to día de tratamiento obtenidas para cada uno de los grupos G1, G2 y G3 fueron 2,6, 5,5 y 7,2 mg/L respectivamente. La figura 2.1 muestra los perfiles plasmáticos obtenidos.

A pesar de las bajas concentraciones plasmáticas de DFH alcanzadas, el efecto inductivo sobre los transportadores de eflujo se pudo observar en los 3 grupos para la glándula salival, intestino e hígado, encontrándose una mayor expresión con el aumento de dosis (Figura 2.2).

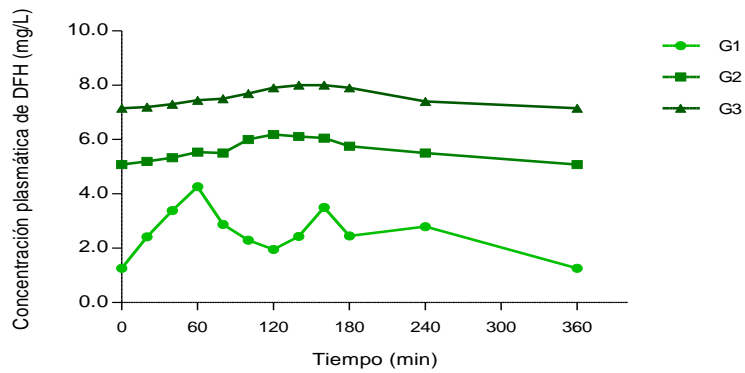


Figura 2.1: Concentraciones plasmáticas de DFH luego de cuatro días de administración de dosis orales de 25 (G1); 50 (G2) y 75 (G3) mg/kg/6h

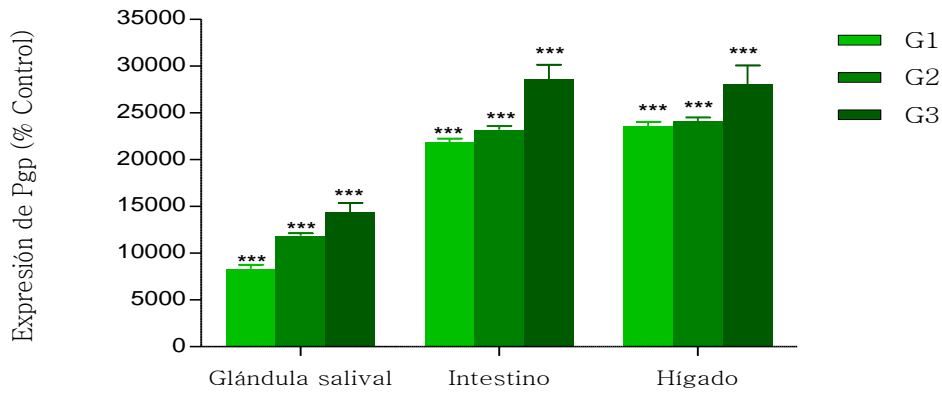


Figura 2.2: Intensidad de inducción de Pgp en los diferentes tejidos luego de la administración de dosis orales de 25 (G1); 50 (G2) y 75 (G3) mg/kg/6h expresadas como porcentaje respecto al control. Los grupos fueron significativamente diferentes del control (**p < 0.001) y entre sí.

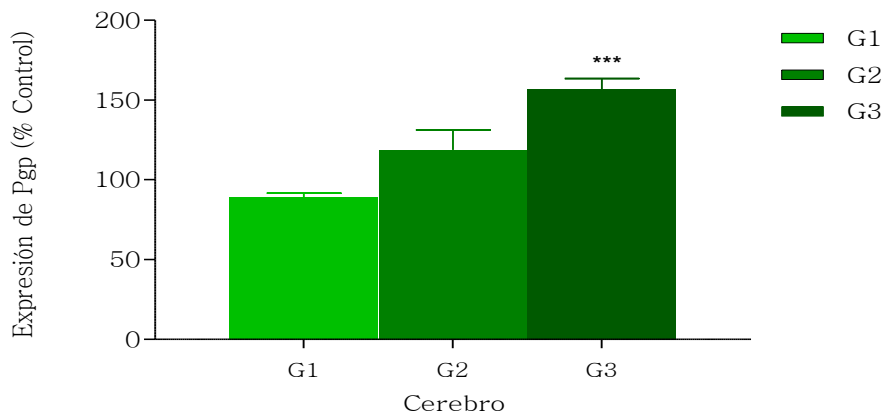


Figura 2.3: Intensidad de inducción de Pgp cerebral (expresada como porcentaje respecto al valor control (píxeles/mm²)) luego de la administración de dosis orales de 25 (G1); 50 (G2) y 75 (G3) mg/kg/6h de DFH. G3 resultó ser el único grupo en diferenciarse significativamente del control (**p < 0.001).

En el caso del cerebro, la inducción de Pgp fue significativamente mayor a la expresión basal del órgano únicamente para el grupo que recibió la dosis más alta (G3)

Se puede observar en los gráficos de barra que la mayor sobreexpresión se observa a nivel de intestino e hígado seguidos por glándula salival y cerebro. En el hígado la sobreexpresión se observa a nivel de vasos y hepatocitos; en intestino la Pgp se ubica a nivel de los enterocitos; en la glándula salival a nivel de los acinos; y en el cerebro únicamente a nivel de las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica (BHE).

Las figuras 2.4 y 2.5 muestran la sobreexpresión de Pgp a nivel de BHE e intestino. En el grupo de animales sacrificados una semana luego de la discontinuación del tratamiento se observó un retorno a los niveles basales de expresión, salvo en el caso del intestino en la que, aunque en menor medida, se mantenía vigente la inducción en el grupo que recibía la mayor dosis.

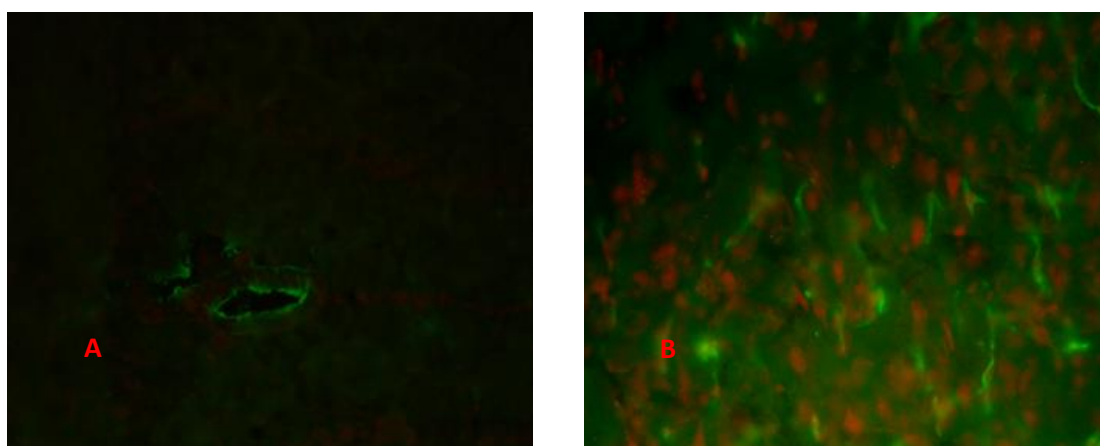


Figura. 2.4: Microfotografías de vasos sanguíneos a nivel de hipocampo dorsal Pgp: A) expresión basal de Pgp en color verde (Alexa fluor 486, molecular probes) en grupo control (GC); B) expresión Pgp luego de cuatro días de tratamiento crónico con DFH 75 mg/kg/6h (G3); El color rojo corresponde al yoduro de propidio, utilizado para contrastar la imagen

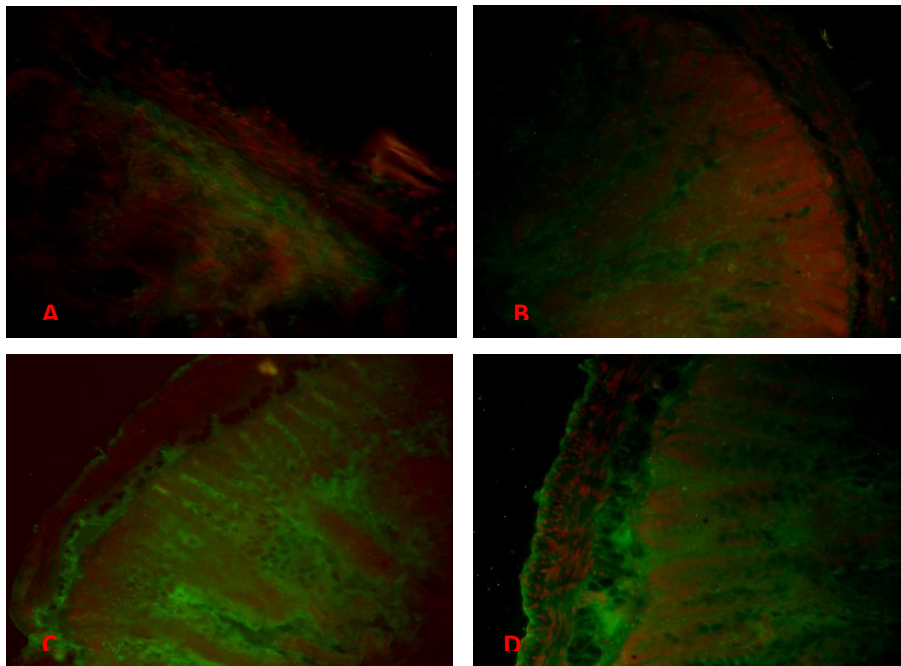


Figura. 2.5: Microfotografías de membrana intestinal mostrando la expresión de Pgp: A) expresión basal de Pgp en color verde (Alexa fluor 486, molecular probes) en grupo control (GC); B) expresión Pgp luego de cuatro días de tratamiento crónico con DFH 25 mg/kg/6h (G1); C) expresión Pgp luego de cuatro días de tratamiento crónico con DFH 50 mg/kg/6h (G2); D) expresión Pgp luego de cuatro días de tratamiento crónico con DFH 75 mg/kg/6h (G3). El color rojo corresponde al yoduro de propidio, utilizado para contrastar la imagen.

Biodisponibilidad oral

La figura 2.6 muestra las curvas promedio de concentraciones plasmáticas obtenidas luego de la administración oral e intraperitoneal de dosis de 100 mg/kg de DFH.

La AUC promedio para la administración intraperitoneal fue ocho veces mayor que para la administración oral. Ya que las β promedio fueron similares para ambas administraciones, esta diferencia en AUC puede ser atribuida a diferencias en la BD.

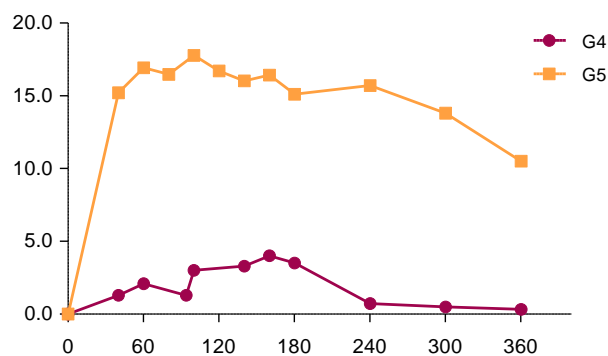


Figura 2.6: Concentraciones plasmáticas de DFH tras la administración de una dosis única de 100mg/kg por vía oral (G4) o intraperitoneal (G5)

Administración intraperitoneal

Las concentraciones plasmáticas medias de DFH para el cuarto día de tratamiento fueron de 22,2 y 17,5 mg/L para el G6 (25/mg/kg/6h) y G7 (100 mg/kg/24h) respectivamente, diferencia que no resultó estadísticamente significativas. El análisis inmunohistoquímico de los tejidos para estos animales mostró para la posología de 100 mg/kg/24h mayor sobreexpresión de transportadores a nivel de órganos esplácnicos (intestino e hígado) y menor sobreexpresión para cerebro (Figura 2.7), respecto a la posología de 25 mg/kg/6h.

La comparación de las intensidades de sobreexpresión de Pgp para las dosis de 25/mg/kg/6h de DFH por diferentes rutas (G1 vs G6) muestra una muy menor expresión del transportador a nivel de la glándula salival para la vía intraperitoneal con el concomitante aumento de la expresión a nivel cerebral. En el caso del intestino hay una menor expresión para la vía intraperitoneal mientras que las diferencias no son significativas para el hígado (Figura 2.8).

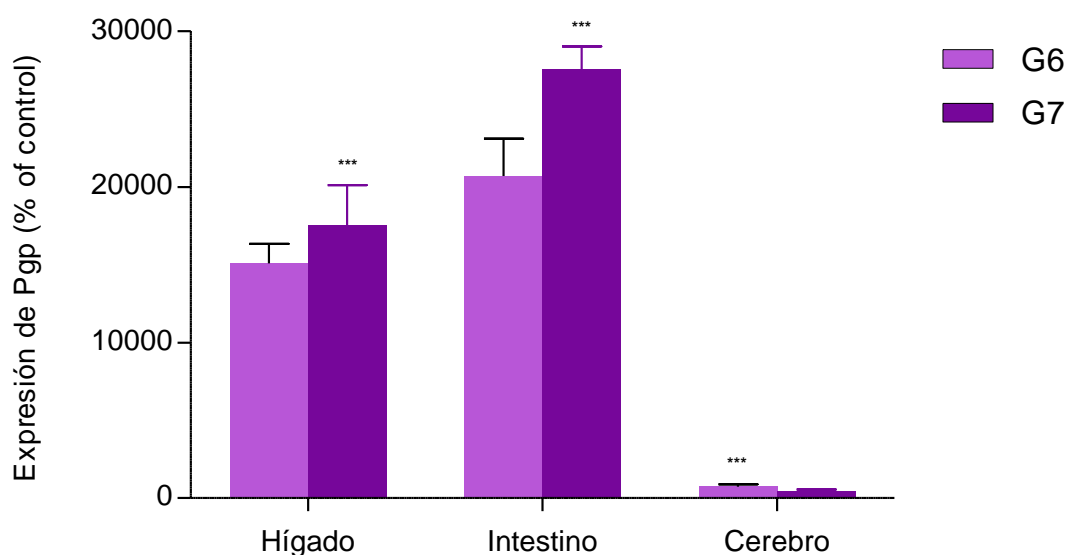


Figura 2.7: Sobreexpresión de Pgp luego de 4 días de administración de 25/mg/kg/6h (G6) o 100 mg/kg/24h (G7) de DFH por vía intraperitoneal. Los tratamientos resultaron significativamente diferentes para todos los tejidos (**p<0.01 y ***p<0.001)

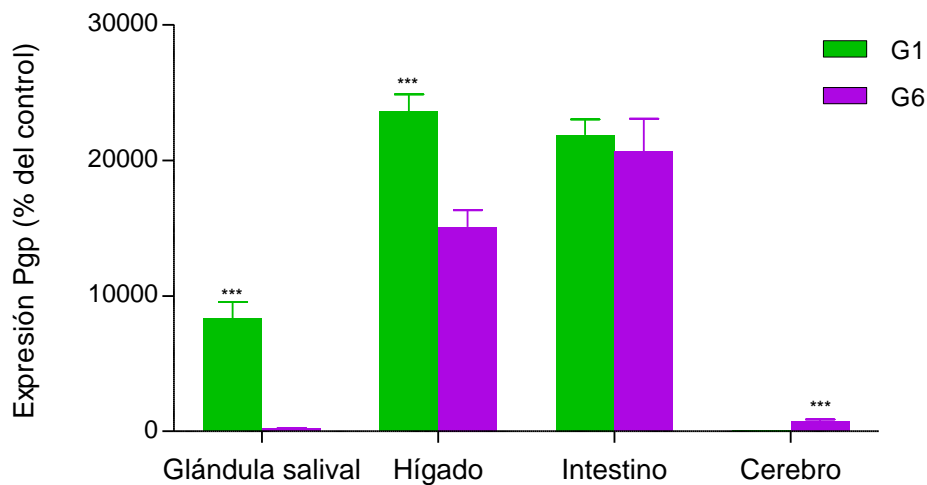


Figura 2.8: Sobreexpresión de Pgp luego de 4 días de administración de 25 mg/kg/6h de DFH vía oral (G1) o vía intraperitoneal (G6). Los tratamientos resultaron significativamente diferentes para todos los tejidos excepto intestino (***) $p < 0.001$).

Discusión de resultados

Las bajas concentraciones alcanzadas tras la administración oral en relación a las obtenidas con la administración intraperitoneal, pueden ser atribuidas a una significativa pérdida de BD. Lindell *et al.* (2003), reportaron que en ratas de la cepa SD la presencia de los sistemas enzimáticos CYP2C6 y CYP2C11 a nivel intestinal, responsables de la parahidroxilación de la DFH, es tan abundante como en el hígado. Esto podría conducir a importantes pérdidas presistémicas, rindiendo bajas concentraciones plasmáticas cuando la dosis es administrada por vía oral. La figura 2.6 muestra la diferencia en los perfiles plasmáticos obtenidos tras la administración de dosis únicas de DFH por ambas rutas.

Las administraciones orales de DFH revelaron un incremento menor al proporcional en las concentraciones plasmáticas, al pasar de 50 a 75 mg/kg/6h, mostrando un comportamiento similar al que presenta la carbamacepina en seres humanos (Kudrakova *et al.*, 1992) (Figura 2.1). La sobreexpresión de proteína transportadoras, trabajando cooperativamente con las enzimas presentes a nivel intestinal en la rata, podrían aumentar el metabolismo presistémico de DFH llevando a una autoinducción de su metabolismo de forma también dependiente de concentraciones locales. Este efecto no sería observable en humanos, aun cuando se ha referenciado a la DFH como

autoinductor enzimático (Chaudhry *et al.*, 2010), debido a la baja expresión intestinal de enzimas CYP2C en nuestra especie (Läpple *et al.*, 2003).

En el caso de la administración intraperitoneal, es posible que una fracción de la droga pueda acceder a la circulación sanguínea vía sistema linfático, sorteando así el primer pasaje hepático. Esto explicaría la disminución en la expresión de Pgp respecto de la administración oral a nivel del hígado. En cuanto a la expresión intestinal de transportadores, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes vías de administración. Este hecho se podría explicar por las similares concentraciones intracelulares de fármaco obtenidas en ambas rutas, ya que la concentración en el interior del enterocito es el resultado de la difusión pasiva de parte de la droga depositada en la cavidad peritoneal del animal a través de la membrana basal (en el caso de la administración intraperitoneal), o la difusión de la droga absorbida a través de la membrana apical del enterocito en el caso de la vía oral. La actividad de las bombas de eflujo ubicadas en la cara apical del enterocito disminuyendo la concentración intracelular de DFH, compensaría la menor fracción de la droga que accede a estas células cuando el ingreso se da por la cara basal de las mismas durante la administración intraperitoneal. Esto daría como resultando similares concentraciones intracelulares del fármaco y por lo tanto similares valores de expresiones de Pgp.

Respecto del alto nivel de inducción observado en la glándula salival, se debe aclarar que la administración oral se realizó administrando la droga en la cavidad bucal del animal, teniendo especial precaución de que la totalidad de la droga fuera ingerida. Este resultado refuerza la importancia de las concentraciones locales en la inducción de expresión de transportadores de eflujo.

El análisis de la sobreexpresión de Pgp a nivel cerebral muestra que cuando se administraron dosis orales crecientes solo el grupo que recibió la mayor dosis, y alcanzó por tanto concentraciones más altas, logró diferenciarse del grupo control, lo que sugiere la existencia de un nivel umbral de concentraciones inductoras.

La comparación entre las administraciones intraperitoneales de 25 mg/kg/6h y de 100 mg/kg/24h, muestra que a pesar de que los animales recibieron la misma dosis total diaria y que las concentraciones medias no difirieron significativamente, el tratamiento en el que las dosis eran administradas más frecuentemente provocó una inducción de

Pgp cerebral mayor que el tratamiento en el que la dosis se administró una sola vez al día. Es posible que la menor oscilación pico valle que se genera en el G6, haga que las concentraciones se mantengan permanentemente sobre los umbrales mínimos inductivos (Figura 2.9).

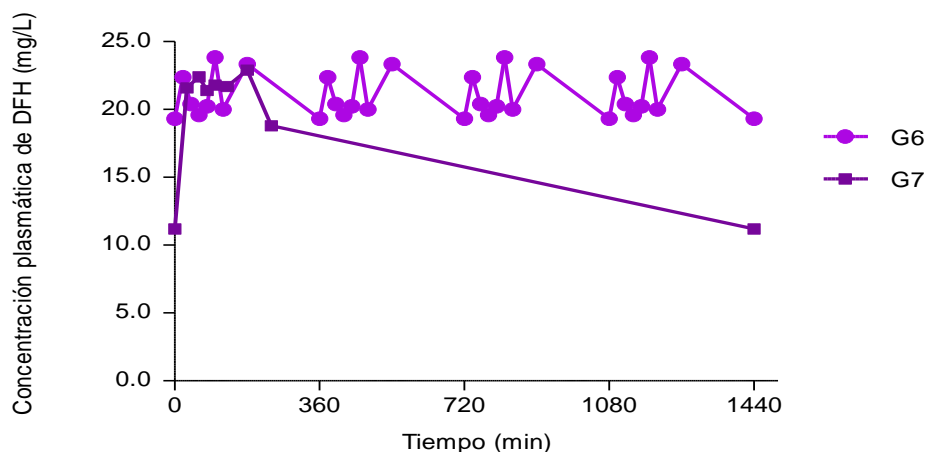


Figura 2.9: concentraciones plasmáticas de DFH luego de cuatro días de administración de dosis intraperitoneales de 25 mg/kg/6h (G6) y 100 mg/kg/24h (G7).

Anteriormente, publicaciones como la de Wen *et al.* (2008) referenciaron que administrando dosis de 25 mg/kg/12h de DFH, 21 días de tratamiento fueron necesarios para observar sobreexpresión de Pgp a nivel cerebral. El mayor plazo que reporta este estudio respecto a nuestro experimento puede deberse a la menor dosis diaria recibida por los animales. Por su parte Seegers *et al.* (2002) reportaron la ausencia de inducción de Pgp cuando administraron un 50% más de dosis (30mg/kg), pero a intervalos doble de tiempo (24h). En nuestro experimento la administración cada 24 h pudo registrar una sobreexpresión cerebral de Pgp en virtud de que la dosis diaria (100 mg) fue mayor que la utilizada por Seegers *et al.*

Conclusiones

La inducción de transportadores de eflujo mediada por DFH ocurre de un modo concentración-local dependiente. Los análisis realizados sobre animales sacrificados 7 días después de la discontinuación del tratamiento mostraron un retorno a niveles basales de Pgp comprobando el carácter reversible de la sobreexpresión.

Los tratamientos anticonvulsivantes habituales en clínica humana con DFH lograrían perfiles de concentración con escasa oscilación pico-valle (intervalos de administración de 8 a 12 horas), pudiéndose generar niveles plasmáticos que se ubicasen constantemente por sobre los niveles mínimos inductivos, y así provocar una constante inducción de transportadores.

Referencias bibliográficas

Chaudhry A., Urban T., Lamba J., Birnbaum A., Remmel R., Subramanian M., Strom S., You J., Kasperaviciute D., Catarino C., Radtke R., Sisodiya S., Goldstein D., & Schuetz E. (2010). CYP2C9*1B promoter polymorphisms, in linkage with CYP2C19*2, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 332, 599-611.

Kudrakova T., Sirota L., Rozova G., Gorkov V. (1992). Autoinduction and steady state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 33, 611-615.

Läpple F., Von Richter O., Fromm M., Richter T., Thon K., Wisser H., Griese E., Eichelbaum M., Kivistö K. (2003). Differential expression and function of CYP2 isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics*; 13, 565-575.

Lindell M., Lang M., Lennernäs H. (2003). Expression of genes encoding for drug metabolising cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in the rat small intestine; comparison to the liver. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*; 28, 41-48.

Seegers U., Potschka H. Löscher P. (2002). Lack of effects of prolonged treatment with phenobarbital or phenytoin on the expression of P-glycoprotein in various rat brain regions. *European Journal of Pharmacology*; 451, 149-155.

Wen T, Liu Y., Yang H., Liu H., Liu X., Wang G., Xie L. (2008) Effect of 21-day exposure of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin on P-glycoprotein expression and activity in the rat brain. *Journal of the Neurological Sciences*; 270, 99-106

Capítulo 3: Efecto del verapamilo sobre la farmacocinética de fenitoína

Diversas moléculas bloqueantes de transportadores de eflujo, entre ellas el verapamilo (VPM) han sido propuestas con el fin de aumentar las concentraciones intracerebrales de drogas anticonvulsivantes y con ello su eficacia en casos de epilepsia refractaria. Es así que se ha referenciado el aumento de concentraciones de fenitoína (DFH) cuando el VPM se administra por perfusión intracerebral en ratas (Potschka y Löscher, 2001), y el aumento de la BD oral de DFH cuando el VPM fue administrado por vía oral, por inhibición de Pgp a nivel de la BHE y del epitelio intestinal respectivamente.

Estos estudios a los que se hace referencia fueron realizados con dosis únicas tanto de DFH como de VPM, por lo que no prevén el efecto que pueden tener cuando los tratamientos son realizados de forma crónica, en los que como vimos en el capítulo anterior opera un fenómeno de regulación ascendente de la expresión de transportadores dependiente de la concentración local del fármaco. Nos propusimos entonces comparar el efecto informado por anteriores investigaciones con el efecto provocado por un bloqueante del transporte de eflujo en un sistema en el que el fenómeno inductivo se haya operado.

Todos los procedimientos utilizados en este experimento fueron realizados en acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199) y aprobados por el Comité de Ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) la Comisión Nacional de Investigación Científica-IMSS, México.

Materiales y métodos

Animales

Dos grupos de animales (A y B) de seis ratas SD hembras adultas cada uno, con pesos de entre 250-300 g fueron alojados en cajas contiguas mantenidas a una temperatura de 25° C y sometidas a ciclos de 12 horas de luz-oscuridad durante todo el experimento.

Tratamiento

El grupo A fue tratado con 0.5 mL diarios de una solución vehículo durante 3 días. Al cuarto día del experimento, los animales recibieron una dosis intraperitoneal de DFH de 100 mg/kg (EPAMIN[®] SP, solución inyectable, Laboratorios Pfizer), y muestras sanguíneas de 150 µL fueron recolectadas cada 20 minutos durante 3 horas y luego cada 60 minutos hasta completar 6 horas de muestreo. La sangre fue obtenida de la vena caudal de cada animal y recolectada en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante (Minivacutainer[™]). El plasma obtenido por centrifugación fue almacenado a -80 ° C hasta el momento del análisis. Al día 5 del experimento una dosis de 40 mg/kg de VPM fue administrada intraperitonealmente una hora antes de una nueva dosis de 100 mg/kg de DFH. Muestras sanguíneas fueron colectadas siguiendo el mismo esquema que para el 4to día de experimento.

El Grupo B fue sometido a un tratamiento de 100 mg/kg/24 hs de DFH (EPAMIN[®] SP, solución inyectable, Laboratorios Pfizer) por tres días. En los días cuatro y cinco los animales fueron sometidos al mismo tratamiento y esquema de muestreo que el Grupo A.

Ambos grupos fueron administrados con 0,5 mL/hora de solución salina isotónica subcutánea a fin de prevenir la hipovolemia.

Este protocolo experimental expuso a ambos grupos de animales al mismo nivel de estrés en su manipulación, pero arribaba en ambos grupos a diferentes estados de inducción de enzimas y transportadores de eflujo debido a la diferencia en la duración del tratamiento con DFH: menos de dos días para el Grupo A y más de tres días para el Grupo B, los cuales ya habían sido probados como suficientes para inducir sobreexpresión como se mostró en el Capítulo 2.

Bajo este diseño cada animal pudo funcionar como su propio control en la evaluación del efecto del VPM sobre la farmacocinética del anticonvulsivante. Esto fue posible ya que las semividas de eliminación para DFH han sido referenciadas entre 2,6 (luego de una primera dosis) y 7,7 horas (al quinto día de tratamiento) cuando dosis de 100 mg/kg/24 h fueron administradas intraperitonealmente a ratas SD (Lolin *et al.*, 1994). Por lo tanto, no era de esperar la acumulación de dosis entre administraciones. Los

perfiles de concentración plasmática de DFH *versus* tiempo serían similares a los obtenidos en dosis únicas y solamente afectados por el estatus en la expresión de enzimas y transportadores.

Con el fin de evaluar los cambios en el metabolismo de DFH, su principal metabolito, la p-hidroxifenitoína (p-HPPH) fue también cuantificado.

Técnica analítica

La técnica analítica para la determinación de las concentraciones plasmáticas de DFH y p-HPPH se adjunta en el Anexo I.

Análisis farmacocinético y estadístico

Las áreas bajo la curva de concentraciones plasmáticas de DFH y p-HPPH (AUC) fueron calculadas por el método de los trapecios desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo.

La comparación entre el primer y segundo día de tratamiento con DFH para el grupo A, o el cuarto y quinto día para el grupo B, fue realizada mediante el test de Student para datos pareados.

Resultados

Las figuras 3.1 y 3.2 muestran los perfiles de concentraciones plasmáticas de DFH luego de la administración de dosis de 100 mg/kg correspondientes a los días 1 y 2 de administración de DFH en el grupo A y para los días 4 y 5 en el grupo B respectivamente.

Los valores de AUC para la DFH y su metabolito se muestran en la Tabla 3.1. Las diferencias no resultaron significativas para las áreas bajo la curva de p-HPPH en ambos grupos.

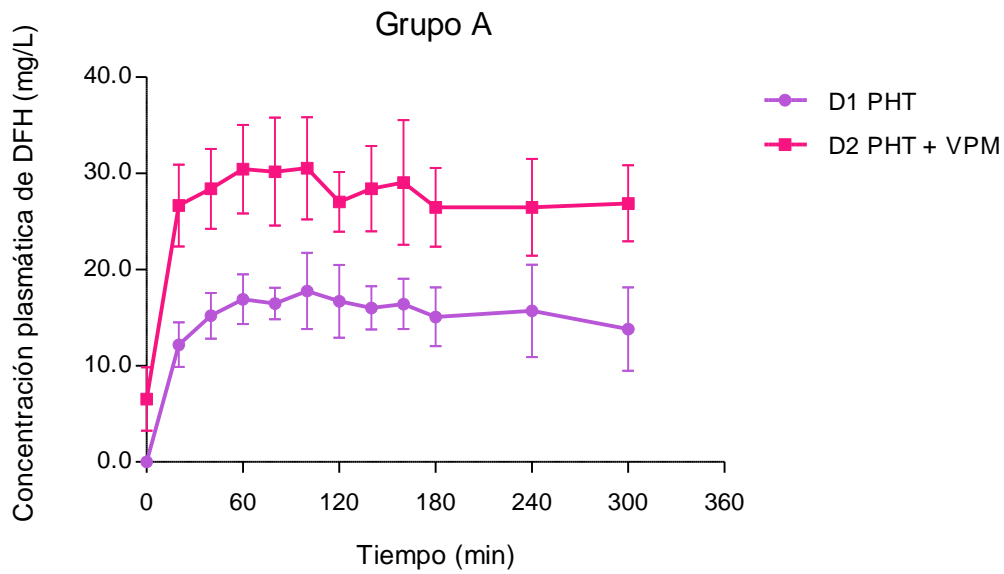


Figura 3.1: Perfiles de concentraciones plasmáticas de DFH tras la primera administración de 100 mg/kg de DFH (D1) y una segunda administración de 100 mg/kg de DFH + 40 mg/kg de VPM (D2)

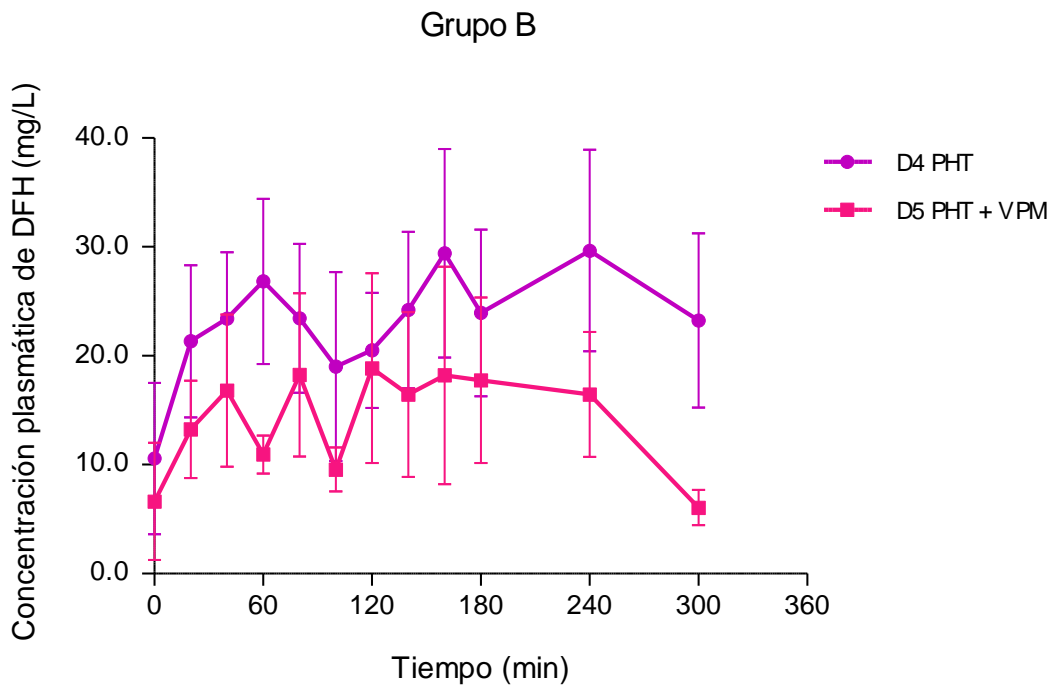


Figura 3.2: Perfiles de concentraciones plasmáticas de DFH tras la administración de 100 mg/kg/24 h para el 4to día de tratamiento (D4) y 100 mg/kg de DFH + 40 mg/kg de VPM para el 5to día de tratamiento (D5)

AUC promedio (mg*min*L ⁻¹)			
		DFH	p-HPPH
Grupo A	D1	3540 ± 1030**	195 ± 57
	D2	6510 ± 2900**	212 ± 64
Grupo B	D4	7580 ± 5710*	457 ± 267
	D5	4340 ± 3540*	331 ± 106

Tabla 3.1: Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas de DFH y p-HPPH (+DS) para los días 1 y 2 en el grupo A y para los días 4 y 5 en el grupo B. Significancia estadística: ** p < 0.01 y * p < 0.05.

Discusión

La importante presencia de los sistemas enzimáticos que metabolizan DFH en el intestino de la rata, junto con la presencia de Pgp, generan una importante pérdida de BD oral como se mostró en el capítulo 2, pero también un relevante aporte intestinal en el *clearance* (CL) total de la droga. Los resultados obtenidos para el grupo A, concuerdan con reportes previos como los de Neerati *et al.* (2011) en los que la coadministración de DFH con VPM, inhibidor de Pgp resultaba en mayores concentraciones de DFH al aumentar la BD y/o disminuir el CL del anticonvulsivante. En la presente investigación ambas drogas fueron administradas intraperitonealmente, por lo que el principal mecanismo que explicaría tanto el aumento de la BD como la disminución de CL de DFH en presencia de VPM sería la inhibición de Pgp interfiriendo sobre la circulación enterohepática.

Como se puede ver en la figura 3.1, los perfiles de DFH comienzan prácticamente de cero luego de la administración de la segunda dosis mostrando una acumulación despreciable del fármaco administrado 24 hs antes. Esto permite asumir una interacción de VPM sobre DFH en situación de dosis única, y por tanto reproduce lo obtenido por Neerati *et al.* (2011).

En el grupo B vemos que la coadministración de DFH y VPM provocó un resultado opuesto, es decir, una caída de los niveles de DFH. En este caso, pudo haberse dado durante los cuatro días previos de administración del anticonvulsivante una fuerte inducción de los sistemas enzimáticos hepáticos (Chaudhry *et al.*, 2010) además de la inducción de los transportadores de eflujo. La interrupción del transporte hepatobiliar en este estado de alta expresión de enzimas hepáticas podría provocar una intensa

metabolización al interior del hepatocito, y así arribar a un importante aumento del CL total de la droga. En otras palabras, con la administración de VPM se estaría anulando la fuga que desde el hígado se estuvo gestando durante la administración crónica de DFH, como consecuencia de inducirse las circulaciones enterohepáticas con subsecuentes reabsorciones de la droga desde el intestino hacia la circulación sistémica.

Esta situación es similar a la que ocurre cuando se coadministra Ciprofloxacina, también sustrato de transportadores de eflujo (Haritov *et al.*, 2006), a pacientes que reciben DFH, los cuales experimentan descensos en los niveles plasmáticos del anticonvulsivante (Brouwers *et al.*, 1997; McLeod and Trinkle, 1998).

Estos resultados concuerdan con la teoría planteada en los objetivos de esta tesis, comprobando la gran influencia de la sobreexpresión de transportadores de eflujo en el comportamiento cinético de DFH, y muy posiblemente de otras drogas que también sean inductores y sustratos de los mismos.

En cuanto al metabolito p-HPPH no se observaron variaciones en sus concentraciones antes y después de la administración de VPM en ninguno de los dos grupos, por lo que el bloqueo de Pgp no estaría modificando el cociente BD/CL independientemente del estado inductivo sobre enzimas y transportadores.

Conclusiones

El efecto de VPM sobre la farmacocinética de DFH parecería ser dependiente del nivel de inducción de transportadores y enzimas a nivel hepático. Debido a que la inducción enzimática se daría al igual que la de transportadores de eflujo de un modo tiempo-dependiente, la inhibición del mismo desde el hígado hacia el intestino podría llevar a un aumento o a una disminución del CL de DFH dependiendo de si la inducción de enzimas y transportadores se halle o no operativa.

Referencias bibliográficas

Chaudhry A., Urban T., Lamba J., Birnbaum A., Remmel R., Subramanian M., Strom S., You J., Kasperaviciute D., Catarino C., Radtke R., Sisodiya S., Goldstein D., Shuetz E. (2010). CYP2C9*1B promoter polymorphisms, in linkage with CYP2C19*2, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*; 332, 599-611.

Lolin Y., Ratnaraj N., Hjelm M., Patsalos P. (1994). Antiepileptic drug pharmacokinetics ad neuropharmacokinetics in individual rats by repetitive withdrawal of blood and cerebrospinal fluid: Phenytoin. *Epilepsy Research*; 19, 99-110.

Neerati P., Ganji D., Bedada S. (2011). Study on in situ and in vivo absorption kinetics of phenytoin by modulating P-glycoprotein with verapamil in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 44, 27-31.

Potschka H. and Löscher W. (2001). In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats. *Epilepsia*; 42, 1231-1240.

Capítulo 4: Efecto del verapamilo sobre la transferencia de fenitoína hacia el cerebro

Introducción

La técnica de microdiálisis es una herramienta útil en el análisis de las concentraciones libres de moléculas ubicadas en el espacio extracelular de diversos tejidos. Esta técnica se basa en la difusión pasiva de sustancias a través de una membrana de diálisis provocada por su gradiente de concentración. Para esto, una solución buffer fisiológica se perfunde lentamente a través de dicha membrana, por medio de una cánula previamente implantada en el sitio de interés, llevándose consigo moléculas pequeñas provenientes del espacio intersticial (Tsai, 2011).

En el Capítulo 3 se describieron los efectos sistémicos de la administración crónica de fenitoína (DFH) con un bloqueante de Pgp como verapamilo (VPM). En este capítulo se mostrarán los efectos de la inhibición del transporte de eflujo a nivel del cerebro a través de los resultados obtenidos en la medición de las concentraciones de DFH por microdiálisis cerebral en las ratas sometidos a tratamiento subcrónico con DFH.

Materiales y métodos

Cinco animales del Grupo B (GB), bajo tratamiento subcrónico con DFH, sometidos al protocolo experimental descrito en el Capítulo 3, fueron utilizados para la determinación de las concentraciones cerebrales de DFH. Si bien en los dos grupos de animales estudiados en el Capítulo 3 fueron medidas las concentraciones cerebrales de DFH, no se incluirán los resultados obtenidos para los animales del grupo A (GA) del anterior capítulo (que recibieron únicamente 2 dosis de 100 mg/kg de DFH) ya que no se logró para el mismo un número de individuos que permitiera arribar a resultados con significación estadística.

Para esto se implantó una cánula guía en el hipocampo ventral derecho de los animales de acuerdo a las siguientes coordenadas respecto a bregma: -5.3 mm anteroposterior, 5.2 mm lateral y 4.3 mm de profundidad desde la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 2007). La cirugía de implantación se realizó bajo anestesia con Xilacina (15 mg/kg i.m) y ketamina (100 mg/kg i.p). Se estableció, luego de la cirugía, un período de recuperación

de 5 días en el que los animales recibieron tratamiento antibiótico con penicilina benzatínica 1.200.000 UI/5mL de 0.5 mL el día de la cirugía y 0.3 mL durante 4 días vía IM.

Las cánulas de microdiálisis fueron elaboradas en el laboratorio y consistieron en una cánula externa de acero inoxidable (grosor calibre 24) y una cánula interna de fibra de vidrio (75 µm de diámetro interno y 150 µm de diámetro externo). La parte permeable de la cánula consistió de una membrana de poliacrilonitrilo con un tamaño de poro de 40,000 Da y 3 mm de largo sellada con resina epóxido.

Las cánulas de microdiálisis fueron colocadas el día de la realización de las mediciones. Luego de un período de estabilización de 1 hora tras su colocación se procedió a la administración de DFH. Este tiempo fue necesario para asegurarse de que las concentraciones de la droga no fueran medidas en condiciones en las que un aumento de la permeabilidad de la BHE, provocado por un daño inducido durante la implantación de la cánula, afectara sus niveles (Rollena y Chaurasia, 2007). Las muestras fueron recogidas cada 20 min, luego de la administración de DFH, hasta las 6 horas postdosis.

El líquido de perfusión consistió en una solución compuesta por: NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, NaH₂PO₄ 0.5 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, MgCl₂.6H₂O 1 mM, Ác. Ascórbico 0.2 mM y CaCl₂ 1.2 mM; el cual fue perfundida a una velocidad de 2 µL/min.

La recuperación (R) in vitro fue estimada perfundiendo las cánulas a través de una solución de prueba de concentración conocida de 5,0 y 100,0 mg/L de DFH y calculando el cociente entre la concentración de DFH obtenida en el dializado y la concentraciones de DFH de las soluciones de prueba. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada nivel de concentración.

$$R (\%) = \frac{\text{Concentracion de DFH del dializado}}{\text{Concentración de DFH de la solución de prueba}} \times 100$$

Técnica analítica

Las técnicas analíticas para la determinación de DFH en líquido extracelular cerebral y en plasma se adjuntan en los anexos I y III respectivamente

Cálculos farmacocinéticos

Las áreas bajo la curva de concentraciones cerebrales de DFH fueron calculados por el método de los trapecios desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo.

La comparación entre las áreas bajo la curva de las concentraciones plasmáticas (AUCp) y cerebrales (AUCc) entre el cuarto y el quinto día fue realizada mediante el test t de Student para datos pareados.

Resultados

La tabla 4.1 muestra los valores del cociente cerebro/plasma (C/P) de concentraciones de DFH para cada animal, el promedio de la diferencia de los C/P y la significación estadística.

N° de Rata	Cocientes cerebro/plasma (C/P) de concentraciones de DFH	
	C/P (D4: DFH)	C/P (D5: DFH + VPM)
4	0.157	0.226
5	0.161	0.255
8	0.436	0.449
9	0.215	0.418
14	0.277	0.335
DFH – (DFH +VPM)	- 0.094	
DE	0,069	
Significación	p < 0,01	

Tabla 4.1: cocientes de concentraciones de DFH cerebro/plasma GB antes y después de la administración de VPM. D4: día de la cuarta administración de DFH para los animales del GB; D5: día de la quinta administración de DFH+ administración de VPM; DFH-(DFH+VPM): C/P correspondiente a D4 - C/P correspondiente a D5; DE (desviación estándar)

En el gráfico de barras de la figura 4.1 se muestran los valores medios de los cocientes C/P.

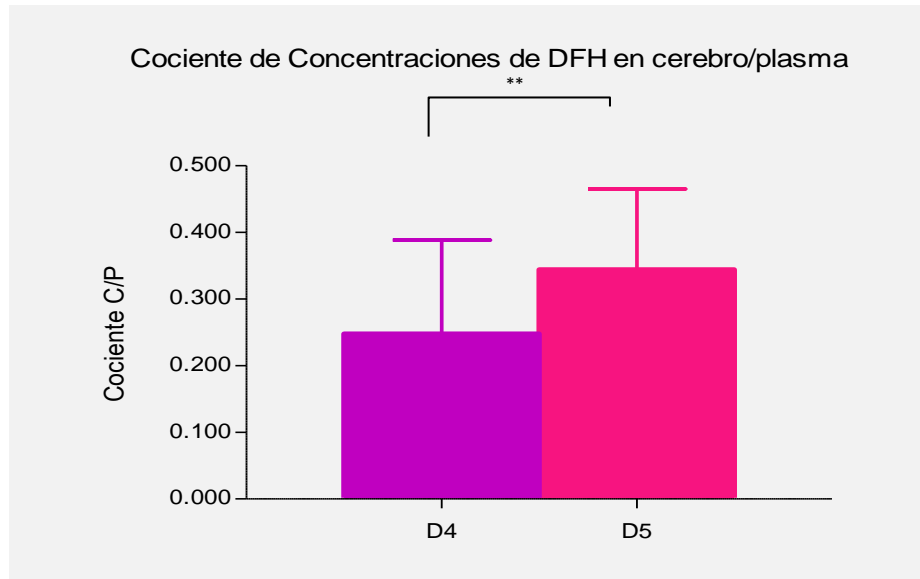


Figura 4.1: Cocientes de concentraciones cerebro/plasma de DFH para el Día 4 y Día 5. Significación estadística: $p < 0.01$ (**).

La figura 4.2 muestra los valores medios de la AUC cerebrales y plasmáticas para los días 4 y 5.

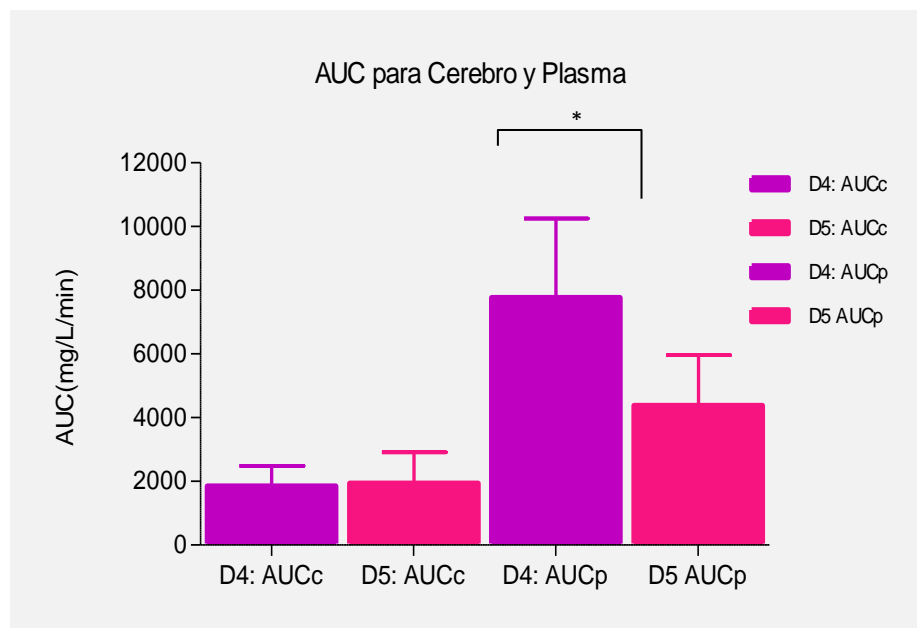


Figura 4.2: Áreas bajo la curva de concentraciones cerebrales (AUCc) y plasmáticas (AUCp) de DFH para Día 4 y el Día 5. Significación estadística $p < 0.05$ (*)

Discusión

Se puede observar que en el caso del tratamiento subcrónico, como al que fueron sometidos estos animales, se encuentran diferencias entre el 4^{to} y 5^{to} día de tratamiento, con un aumento del cociente C/P de DFH tras la administración del bloqueante de Pgp.

En la figura 4.2 se puede ver cómo mientras que los niveles de DFH a nivel cerebral mantuvieron sus valores tras la administración de VPM (diferiendo tan solo en un 5%), las concentraciones a nivel plasmático descienden drásticamente (44% en promedio), dando como resultado un aumento significativo del cociente C/P de DFH.

Este resultado tendría dos explicaciones posibles, una de ellas es que al inducir la expresión de Pgp, la DFH autolimita su ingreso al cerebro de modo que al administrar un bloqueante de la proteína transportadora como el VPM aumenta su pasaje hacia el cerebro.

Sin embargo, otra explicación sería el tiempo que insume el equilibrio entre el plasma y el compartimiento cerebral. Como se explicó en el Capítulo 3, la administración intraperitoneal de VPM, lleva a la caída de las concentraciones plasmáticas de DFH debido al bloqueo de Pgp a nivel esplácnico. Sería esperable, que al igual que la sobreexpresión de proteínas transportadoras provocada por DFH, el bloqueo de estas bombas de eflujo por inhibidores como VPM se produzca de un modo concentración-local dependiente (Postcher and Löscher, 2001) lo que hace posible, al tratarse de una administración intraperitoneal, que la cantidad de bloqueante administrada pueda ocuparse mayoritariamente en los transportadores presentes en la zona esplácnica quedando pocas moléculas disponibles para ejercer su efecto a nivel de la BHE. De este modo lo que realmente estaríamos midiendo son concentraciones que no han alcanzado aún el nuevo equilibrio de transferencia entre cerebro y plasma, y por tanto el cociente C/P evolucionaría a un nuevo valor si se mantuviera la coadministración de DFH y VPM.

Esta fue la primer experiencia de trabajo con la técnica de microdiálisis cerebral y en la misma no se logró un número de animales suficiente que proveyera de datos confiables de concentraciones cerebrales en el grupo que recibió únicamente dos dosis de DFH

(GA), por lo que no se cuenta con datos complementarios que permitan corroborar o refutar alguna de las hipótesis propuestas.

Si bien la utilización de moléculas bloqueantes de proteínas transportadoras es vista, entre otras, como una posible alternativa de tratamiento en los casos de epilepsias refractarias (Van Vilet *et al.*, 2006), es necesario tener en cuenta que, como se mostró en el Capítulo 3, la coadministración de estas moléculas conlleva un cambio en las transferencias a todos los niveles en los que los transportadores de eflujo se expresen, provocando grandes cambios no solo en la farmacocinética del anticonvulsivante, sino también de cualquier otro sustrato exógeno o incluso endógeno, provocando así alteraciones de la fisiología del paciente que podrían ser inconvenientes.

Referencias bibliográficas

Paxinos G., Watson Ch. (2007). *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. 6th Ed. Amsterdam. Elsevier.

Postchka H. and Löscher W. (2001). In Vivo Evidence for P-glycoprotein-Mediated Transport of Phenytoin at the Blood-Brain Barrier of Rats. *Epilepsia*; 42 (10): 1231-1240.

Rollema H. and Chaurasia C. (2007). Westernik B, Cremers T (Eds) *Handbook of Microdialysis: Methods, Application and Perspectives*. Elsevier Science (Chapter 6.2)

Van Vilet E., Van Schaik R., Edelbroek., Redker S., Aronica E., Wadman W., Vezzani A., Gorter J. (2006). Inhibition of the multidrug transporters P-glycoprotein Improves Seizure Control in Phenytoin Treated Chronic Epileptic Rats. *Epilepsia*; 47 (4): 672 - 680

Tsai Tung Hu (2011). Introduction to Applications of Microdialysis in Pharmaceutical Sciences. In Tsai Tung-Hu (Ed). *Application of Microdialysis in Pharmaceutical Science*. Wiley, New Jersey.

Capítulo 5: Estudio del efecto de diferentes frecuencias de administración de fenitoína en voluntarios sanos

Introducción

En el marco de un proyecto de Iniciación a la Investigación financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República, se realizó un ensayo clínico sobre voluntarios sanos titulado “*Ensayo Clínico para Demostrar la Inducción de Transportadores de Membrana en la Respuesta Farmacocinética No Lineal y en el Desarrollo de Tolerancia a la Respuesta Antiepiléptica Durante Tratamientos Crónicos con Fenitoína*” con el fin de determinar la influencia de la inducción de transportadores de eflujo en la farmacocinética de la fenitoína (DFH) y de comprender su impacto en la generación de la resistencia al tratamiento farmacológico que se observa en la Epilepsia Refractaria.

En primer lugar se buscó demostrar el diferente grado de autoinhibición del metabolismo que la DFH ocasionaría luego de ser administrada bajo 2 posologías diferentes, aun manteniendo la misma tasa de ingreso al organismo. La verificación de este objetivo solo podría alcanzarse si la autoinhibición respondiera al perfil de concentraciones de fármaco obtenido tras ambas posologías.

En segundo lugar se buscó demostrar que el perfil de concentraciones de DFH tiene significativa correlación con la inducción del transporte de membrana. Esta meta se daría por verificada si tras perfiles de concentración oscilantes existiesen oscilantes grados de inducción, en tanto perfiles poco variantes en el tiempo mantuviesen un grado de inducción estable.

Para evaluar el grado de inducción, se utilizó como método indirecto la medición de las concentraciones salivales del fármaco. Con este fin la extracción de saliva se llevó a cabo por estimulación con ácido cítrico y recolección en dos fracciones, la primera fracción (S1), corresponde al contenido de la glándula en el momento de la estimulación, y la segunda fracción (S2), fruto de un ultrafiltrado rápido de los capilares que irrigan la glándula salival.

Bajo este esquema, se puede asumir que la concentración S1 es representativa de la concentración libre venosa, mientras que la concentración S2 subroga la concentración

libre arterial de sustancias (Fagiolino *et al.*, 2013). De este modo es de esperar que mientras procesos de absorción estén vigentes, las concentraciones arteriales (S2) superen a las venosas (S1) (Fagiolino *et al.*, 2013).

Por otro lado, como se vio en el Capítulo 2, los transportadores de eflujo se hallan constitutivamente a nivel de los acinos en las glándulas salivales y son capaces de aumentar su expresión bajo la influencia de sustancias inductoras como DFH. Ubicados en este lugar pueden jugar un importante rol en la composición del fluido salival en lo que respecta a la concentración de sus sustratos.

En condiciones basales, la concentración salival S1 de DFH es muy cercana a la concentración plasmática libre como se mencionó anteriormente, por lo que el valor del cociente saliva/plasma (S1/P) se aproxima al valor de fracción libre del fármaco. Estando el organismo en un estado en la que los transportadores de eflujo se han sobreexpresados por la administración crónica de un agente inductor, es de esperar que las concentraciones salivales aumenten y con ellas el cociente S1/P. De este modo este cociente puede indicarnos el estatus de inducción del organismo.

En el Capítulo 2 se vio como, en ratas, debido a la presencia de umbrales de concentración inductiva necesarios para provocar y mantener la inducción de las proteínas transportadoras, el tratamiento que entregaba la dosis a intervalos más cortos lograba a nivel cerebral un grado de inducción mayor que aquellos animales que habían recibido una dosis que generaba una importante oscilación pico-valle. Por esta razón, en este experimento en el que se propusieron tratamientos análogos a los realizados sobre ratas, se esperaba observar un mayor cociente S1/P para el tratamiento que generara menor oscilación pico valle, como subrogante de un mayor nivel de inducción del transporte de eflujo.

Con el fin de evaluar los cambios en el metabolismo de DFH, su principal metabolito, la p-hidroxifenilhidantoína (p-HPPH) también fue cuantificada.

Protocolo Experimental

Voluntarios sanos

Doce voluntarios sanos de ambos sexos (6 hombres y 6 mujeres), de edades comprendidas entre 18 y 50 años, fueron reclutados para participar de un estudio de dosis orales múltiples de fenitoína, involucrando 2 tratamientos (A y B) con iguales velocidades de administración (dosis/intervalo) pero diferentes intervalos posológicos. Los criterios de inclusión y de exclusión, así como la información y el consentimiento informado recabado de los sujetos siguió el formato aplicado en el CEBIOBE. Los mismos se adjuntan en los Anexos IV y V.

Diseño del ensayo clínico

El estudio fue realizado según un diseño en 2 periodos (I y II), con 2 tratamientos (A y B), con asignación aleatoria de las secuencias (AB y BA), cruzado y compensado (una mitad de sujetos en secuencia AB y la otra mitad de sujetos en secuencia BA), dejando 5 días para el lavado de fármaco entre cada período. El tiempo total de la investigación abarcó 4 semanas aproximadamente. Cada período del ensayo involucró 10 días de administración del fármaco según los diferentes tratamientos. El ensayo clínico fue realizado en dos etapas. La primera fase se llevó a cabo entre los meses de julio y agosto de 2012 con 6 voluntarios (3 hombres y 3 mujeres) y la segunda en el mismo período del año 2013 con otros 6 voluntarios con igual número de hombres y mujeres.

Formulaciones conteniendo DFH

En la primera fase del ensayo clínico se utilizó Epanutin® (Laboratorios Pfizer) como marca comercial administrada a los voluntarios. Durante la segunda fase del estudio fue necesario cambiar el producto por Comitoina® (Laboratorio Roemmers) debido a la discontinuación de la comercialización del producto original en la plaza local.

Tratamientos

El Tratamiento A consistió en una dosis oral de 600 mg de fenitoína cada 3 días, durante 10 días. En total, los sujetos recibieron 4 dosis (1^{er}, 4^{tº}, 7^{mo}, 10^{mo} día del período). Cada dosis consistió en 200 mg con 200 mL de agua a la hora 08:00, seguido de igual

administración a la hora 10:00, y seguido de una tercera e igual administración a la hora 12:00.

Tratamiento B, consistió en una dosis oral de 100 mg de fenitoína cada 12 horas, durante 10 días. En total, los sujetos recibieron 20 dosis o administraciones de 100 mg (horas 08:00 y 20:00) junto a 100 mL de agua.

Alimentación

El primer día de cada período los sujetos se presentaron en el CEBIOBE (hora 07:00) con un ayuno de al menos ocho horas, recibiendo luego a la hora 07:30 un desayuno, previo a la administración correspondiente de la hora 08:00. Al mediodía (hora 12:00) almorzaron, y luego cada 4 horas recibieron merienda (16:00) y cena (20:00) respectivamente. Los sujetos bajo tratamiento B cenaron a las 19:30. A la mañana siguiente todos los sujetos desayunaron a las 07:30, y aquellos bajo tratamiento B tomaron la tercera dosis de fármaco a la hora 08:00.

El décimo día de cada período los sujetos repitieron exactamente el mismo cronograma establecido para las primeras 24 horas del período (intervalo 07:30 – 07:30) en cuanto a la alimentación.

Tiempos de muestreo:

Muestreo salival

Durante el primer/segundo día de cada período los sujetos colectaron muestras salivales a las 20:00 (día 1) y 08:00 (día 2).

Durante el décimo día de cada período los sujetos recogieron muestras salivales a los siguientes tiempos reloj: 08:00 (inmediatamente antes de administrarse fenitoína), 09:00, 10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 18:00, 20:00, 21:00, 22:00, 23:00, 24:00. Desde el día 11 hasta el día 14 se tomaron muestras cada doce horas: 00:00, 20:00, 08:00, 20:00, 08:00, 20:00, 08:00. Las muestras de saliva se conservaron a -25°C hasta el momento del análisis.

Muestreo plasmático

Durante el primer/segundo día de cada período los sujetos fueron sometidos a extracciones sanguíneas de 5 mL cada una, en tubos heparinizados, en forma simultánea al muestreo salival: 20:00 (día 1) y 08:00 (día 2). El plasma sanguíneo fue separado por centrifugación y conservado a -25°C hasta el momento del análisis.

Durante el 10^{mo} y hasta el 14^{to} día de cada período, los sujetos fueron sometidos a extracciones sanguíneas de 5 mL, en tubos heparinizados, a los siguientes tiempos reloj:

Día 10: 09:00, 10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 18:00, 20:00, 21:00, 22:00, 23:00, 24:00.

Días 11; 12; 13; 14: 08:00, 20:00; 08:00; 08:00; 08:00.

Internación de voluntarios

Los voluntarios participantes del ensayo se internaron en dependencias del CEBIOBE los días 1 y 10 de cada período, permaneciendo allí para recibir la alimentación, dosis, y para extracciones de muestras, según lo indicado en el protocolo experimental, desde la hora 07:00 hasta la hora 08:00 del día 2 y 11 respectivamente. Las muestras sanguíneas previstas para los días 11, 12, 13, y 14, fueron extraídas en el CEBIOBE, y por tanto los voluntarios regresaron a sus instalaciones 30 minutos antes de las horas indicadas.

Las muestras salivales previstas a horas en la que los voluntarios no permanecían internados en el CEBIOBE, fueron tomadas domiciliariamente.

Metodología analítica

Las concentraciones plasmáticas de DFH y p-HPPH y la concentración salival de DFH fueron determinadas por Cromatografía líquida de alta presión según la técnica analítica que se detalla en el Anexo VI.

Estudio de disolución in vitro

El ensayo de disolución de las formulaciones conteniendo DFH utilizadas en este estudio se realizó de acuerdo a la USP 32 NF 27. La técnica se detalla en el Anexo VII.

Tratamiento de datos

Las concentraciones plasmáticas medias de estado estacionario de DFH y p-HPPH para cada tratamiento A y B (C_{ssDFH} , $p\text{-HPPH}_{ss}$) se calcularon como el cociente entre el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas (AUC) de 0 a T (siendo T de 72 hs para el Tratamiento A y de 24 hs para el Tratamiento B) sobre su respectivo T. Las AUC fueron calculadas por el método de los trapecios.

Del mismo modo fueron calculadas $S1_{ss}$ y $S2_{ss}$ (concentración salival de DFH en la fracción S1 y S2 en estado estacionario) para los tratamientos A y B.

Las constantes de velocidad de eliminación β fueron calculadas como el inverso de la pendiente de la regresión lineal del logaritmo neperiano de las concentraciones para los puntos terminales de la curva de concentraciones plasmáticas versus el tiempo. La semivida de eliminación ($t_{1/2(\beta)}$) fue calculada como $0,693/\beta$.

Las comparaciones entre valores medios de los distintos parámetros fueron procesados mediante test paramétricos: test t- Student y ANOVA.

Resultados

Durante la primer fase se suscitó el contratiempo de la aparición de fiebre y rash en 4 de los 6 voluntarios participantes del estudio (3 mujeres y 1 hombre), efecto adverso asociado a DFH que obligó a excluir a dichos voluntarios del ensayo clínico apenas detectado. Esto produjo que únicamente dos voluntarios hombres completaran los dos períodos del ensayo, siendo sometidos al tratamiento A y al tratamiento B. El voluntario masculino excluido completó únicamente el tratamiento A, mientras que las voluntarias femeninas completaron únicamente el período correspondiente al tratamiento B.

Durante la segunda fase del estudio, dos voluntarios de sexo femenino debieron ser excluidos del ensayo clínico al presentar reacciones cutáneas, una de ellas completó un período bajo el tratamiento A.

La Tabla 5.1 muestra los resultados obtenidos en los parámetros farmacocinéticos medios según tratamiento para el total de los voluntarios participantes del proyecto, hayan o no completado el protocolo experimental. El único parámetro que mostró

diferencia significativa es el cociente SI/P, indicador del estado medio de inducción de los transportadores de eflujo a nivel de las glándulas salivales.

Tratamiento	Parámetros farmacocinéticos medios \pm IC 95 %						
	C _{ss} DFH (mg/L)	C _{ss} p-HPPH (mg/L)	SI _{ss} DFH (mg/L)	S2 _{ss} DFH (mg/L)	SI/S2 DFH _{ss} (mg/L)	SI/P DFH _{ss} (%)	p-HPPH _{ss} /DFH (%)
A: 600 mg /72 h (N=8)	3,85 \pm 2,31	0,0815 \pm 0,0247	0,338 \pm ,186	0,371 \pm ,192	90,8 \pm 9,4	8,91 \pm 1,04	2,72 \pm 1,22
B: 100 mg /12 h (N=9)	2,81 \pm 1,53	0,0762 \pm 0,0250	0,294 \pm 0,132	0,308 \pm 0,137	96,0 \pm 7,4	11,1 \pm 1,49	3,40 \pm 1,30
Significación	NS	NS	NS	NS	NS	p<0,05	NS

Tabla 5.1. Parámetros farmacocinéticos medios según tratamiento: concentración plasmática media de estado estacionario para DFH y pHPPH (C_{ss}); concentración salival media de estado estacionario de DFH obtenida en fracciones 1 y 2 (SI_{ss} y S2_{ss} respectivamente); cociente fracción SI_{ss}/S2_{ss} (SI/S2); cociente SI_{ss}/C_{ss} (SI/P) y cociente C_{ss} DFH/C_{ss} p-HPPH (p-HPPH_{ss}/DFH). NS: no significativo.

Las Figuras 5.1 a 5.4 muestran los perfiles de concentraciones medias plasmáticas y salivales según el tratamiento para cada una de las marcas comerciales ensayadas

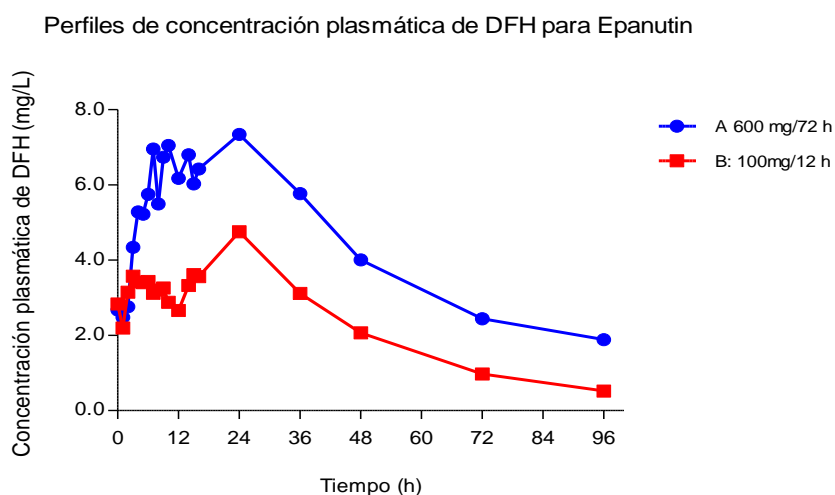


Figura 5.1: Perfiles de concentraciones plasmáticas de DFH obtenidas tras la administración de Epanutin para ambos tratamientos en el total de individuos participantes del estudio

Se puede observar en los perfiles de concentración salival cómo los niveles de S2 se mantienen por encima de los de S1 durante una parte importante del tiempo, evidenciando los procesos de recirculación que llevan a que la droga este en constante reabsorción.

Perfiles de concentración salival de DFH para Epanutin

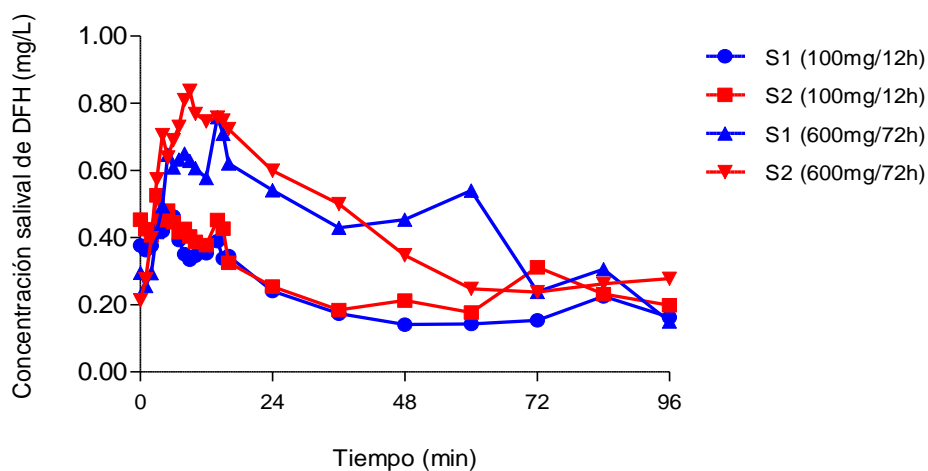


Figura 5.2: Perfiles medios de concentraciones salivales de DFH obtenidos tras la administración de Epanutin para ambos tratamientos para el total de individuos participantes del estudio

Perfiles de concentración plasmática de DFH para Comitoína

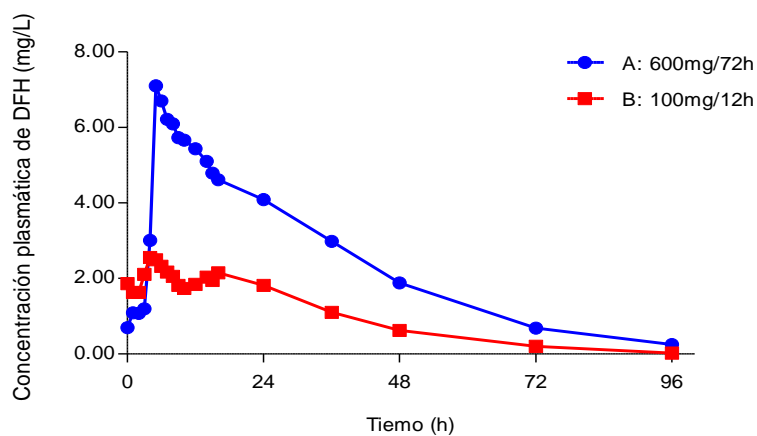


Figura. 5.3: Perfiles medios de concentración plasmática de DFH obtenidos tras la administración de Comitoína® para ambos tratamientos

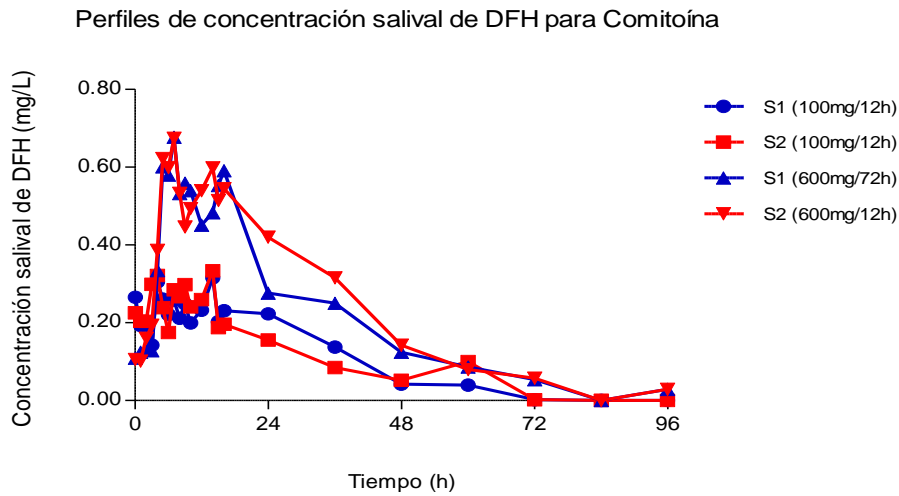


Figura 5.4: Perfiles medios de concentraciones salivales de DFH obtenidos tras la administración de Comitoína para ambos tratamientos para el total de individuos participantes del estudio

Debido a que el Voluntario 1 (de sexo masculino) que completó las dos etapas de la primer fase del estudio, llevada a cabo con Epanutin (identificado como E1-H) presentaba características farmacocinéticas excepcionales en cuanto a las altas concentraciones alcanzadas, se muestran a continuación las Figuras 5.5 a 5.8 que comparan los rendimientos obtenidos por las diferentes marcas con la inclusión y exclusión respectivamente de este individuo.

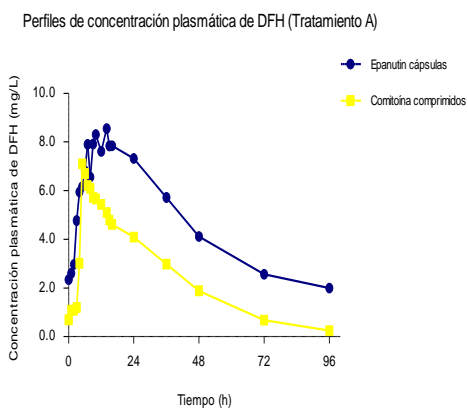


Figura 5.5: Perfiles medios de concentración plasmática de DFH tras la administración de 600 mg/72 h de Epanutin o Comitoína incluyendo al voluntario E1 -H

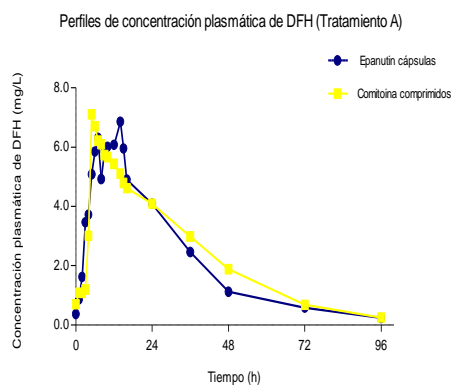


Figura 5.6: Perfiles medios de concentración plasmática de DFH tras la administración de 600 mg/72 h de Epanutin o Comitoína excluyendo al voluntario E1 -H

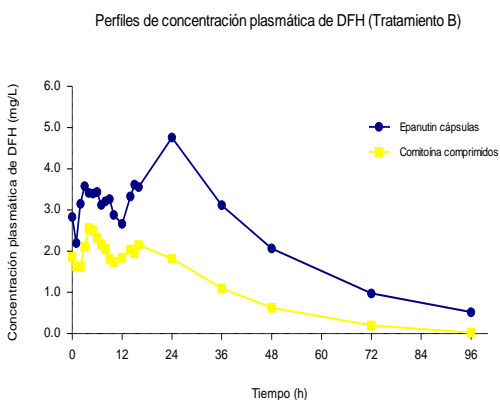


Figura 5.7: Perfiles medios de concentración plasmática obtenidos tras la administración de 100 mg/12 h de Epanutin o Comitoína incluyendo al voluntario E1 -H.

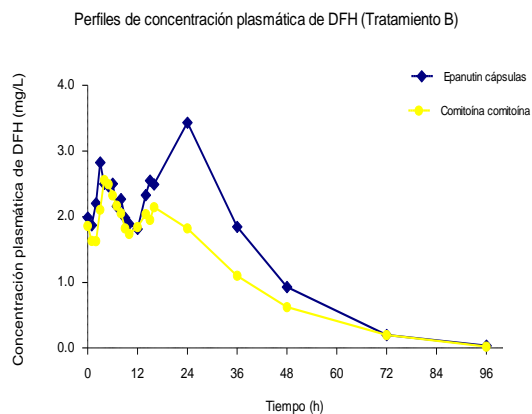


Figura 5.8: Perfiles medios de concentración plasmática obtenidos tras la administración de 100 mg/12 h de Epanutin o Comitoína excluyendo al voluntario E1 -H

La figura 5.9 muestra los perfiles de disolución *in vitro* en agua destilada a $37 \pm 0,5$ °C de los dos productos utilizados. Se puede ver como Epanutin presenta una disolución sensiblemente más rápida que los comprimidos de Comitoína.

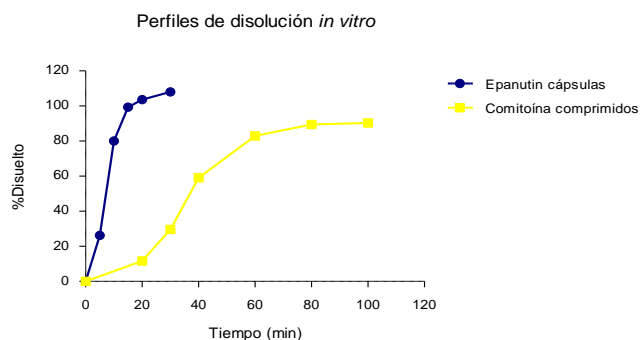


Figura 5.9: Perfiles medios de disolución para Epanutin y Comitoína en agua destilada a $37 \pm 0,5$ °C.

Discusión

Al igual que en los resultados obtenidos en ratas, en los que el análisis de dos grupos de animales sometidos paralelamente a dos tratamientos análogos a los implementados en este Ensayo Clínico, no mostraron diferencias en las concentraciones plasmáticas medias de estado estacionario, tampoco aquí se observaron diferencias en los parámetros farmacocinéticos obtenidos para ambos tratamientos. También en este caso se observaron diferencias en los grados de inducción alcanzados por los diferentes tratamientos. En el caso de los experimentos sobre animales, esto se desprende claramente del análisis inmunohistoquímico realizado directamente sobre los tejidos, mientras que en el caso de los voluntarios sanos esta afirmación se sustenta en la comparación del cociente SI/P, que como se explicó al inicio del capítulo puede funcionar como subrogante del estado de inducción de los transportadores de eflujo. Se observa entonces como un tratamiento de 100 mg cada 12 horas produce una inducción de los transportadores de eflujo mayor que el tratamiento de 600 mg cada 72 horas, lo que llevaría a pensar en una mayor eficacia de este último tratamiento.

En el análisis por marca comercial podemos ver que tal como era previsible según los perfiles de disolución de las especialidades farmacéuticas utilizadas (Figura 5.9), Epanutin, comienza a detectarse antes en el plasma sanguíneo de los voluntarios. En cuanto a la evaluación de los rendimientos de ambos productos, el mismo no puede ser certeramente evaluado debido a que no se trata de un ensayo cruzado como lo exige un estudio de bioequivalencia, y al bajo número de voluntarios disponibles para la comparación. No obstante se observa que, aun excluyendo al voluntario El-H, que presenta concentraciones particularmente altas, si analizamos las AUC para el tratamiento B (100 mg/12h) con 4 individuos en cada grupo (1 hombre y tres mujeres para Epanutin y 3 hombres y 1 mujer para Comitoína) podemos ver que no se observan claras diferencias para la curva de concentraciones plasmáticas luego de la administración matutina, pero si son muy notorias las diferencias luego de la administración nocturna (Figura 5.10).

Si se calculan las AUC de DFH, vemos que Epanutin presenta en promedio un AUC apenas 9.4% mayor tras la administración diurna (entre las 0 y las 12 h post-dosis) y un 37.9% mayor tras la administración nocturna (12 a 24 h post-dosis).

Perfiles de concentración plasmática de DFH para un intervalo de 24 hs

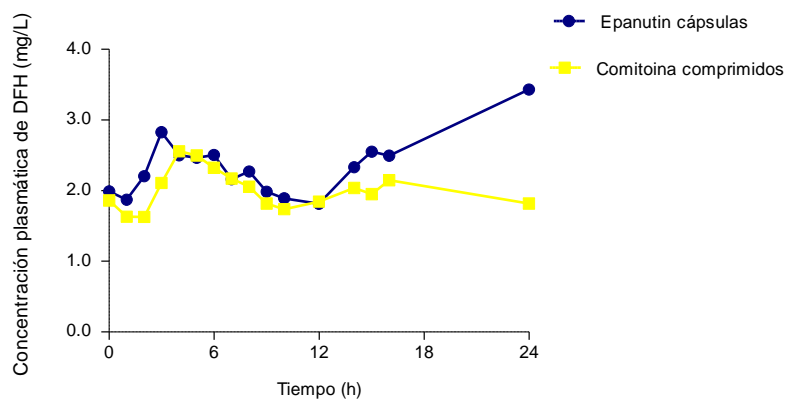


Figura. 5.10: Perfiles medios de concentración plasmática de DFH en un intervalo de 24 hs para Epanutin® y Comitoína®.

Este hecho podría relacionarse con los ritmos circadianos de la fisiología digestiva, alterando al individuo en su capacidad para discriminar a los productos por sus características farmacotécnicas.

La disminución de la motilidad intestinal y el enlentecimiento del vaciamiento gástrico que se da durante la noche (Belanger *et al.*, 1997) pueden haber disminuido más aun la velocidad de disolución de Comitoína, provocando una sensible pérdida de BD tras su administración

Reacción Cutánea por Fenitoína

Como se mencionó anteriormente, 6 de los 12 sujetos que participaron del estudio (1 hombre y 5 mujeres) mostraron reacciones cutáneas (1 hombre y 1 mujer recibiendo Tratamiento A y 3 mujeres recibiendo Tratamiento B respectivamente). La voluntaria restante mostró la reacción adversa el segundo día de administración bajo el tratamiento A

Las reacciones cutáneas son un efecto adverso común asociado a las drogas antiepilépticas (DAE) como DFH, carbamacepina, fenobarbital o lamotrigina y es una causa frecuente de interrupción de los tratamientos. Estas reacciones van desde erupciones cutáneas leves hasta afecciones más graves como el Síndrome de Stevens-Johnson o la Necrólisis Epidérmica Tóxica (Leeder, 1998). En el caso de DFH por

ejemplo, las erupciones en la piel ocurren en hasta un 16% de los pacientes al inicio del tratamiento (Chadwick D *et al.*, 1984) y en un porcentaje más bajo con la administración crónica (7%), mientras que el Síndrome de Hipersensibilidad es mucho menos común siendo su incidencia de 1 en 5000 a 10000 pacientes (Pirmohamed, 1984). Las lesiones se presentan en general durante las primeras semanas de tratamiento y son a menudo precedidas por la aparición de fiebre y linfadenopatía (Ghaffarpour, 2005; Bessmertny *et al.*, 2002).

En el caso de todos los fármacos mencionados, se cree que la generación de metabolitos reactivos, como los arenóxidos y *o*-quinonas, es esencial en el desarrollo de estas reacciones de hipersensibilidad al unirse covalentemente con macromoléculas para formar haptenos y desencadenar así la reacción inmunológica.

Aunque se reconoce al hígado como el órgano metabólico más importante y principal responsable de la biotransformación de fármacos, es probable que el metabolismo extrahepático de xenobióticos (por ejemplo, a nivel de la piel) tenga un rol importante en este tipo de reacciones. El hígado es el órgano primordialmente expuesto a las especies altamente reactivas incapaces de sobrevivir mucho tiempo en la circulación, pero quizás no sea el primer órgano en ser dañado, ya que los altos niveles de glutatión y de N-acetilcisteína lo hacen un órgano privilegiado (Sanderson *et al.*, 2006). La piel, menos protegida, podría manifestar antes la injuria.

Para aclarar este concepto en la Figura 5.11 se muestra la ruta metabólica de la DFH.

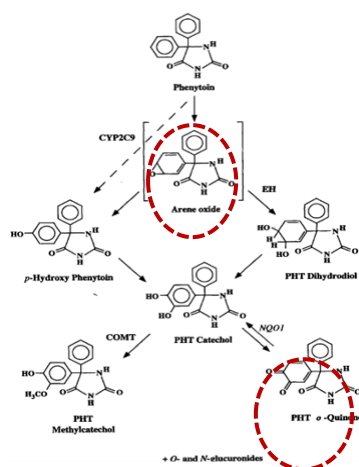


Fig. 5.11: Ruta metabólica de DFH. En líneas punteadas rojas se muestran los compuestos responsables de desencadenar reacciones de hipersensibilidad.

Como se puede ver su principal ruta de biotransformación es la para-hidroxilación (vía arenóxido) para formar 5-(4-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína (p-HPPH). La oxidación adicional de p-HPPH conduce a la formación de catecol (3'-4'-diHPPH), por varias enzimas del citocromo P450. El catecol espontáneamente se oxida para formar una *o*-quinona reactiva que puede ser metabolizado de nuevo a catecol por una enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1). El catecol también se puede metabolizar a metilcatecol por la catecol-*o*-metil transferasa (COMT), el cual se eliminará posteriormente en la orina (Leeder, 1989). Esta enzima reduce la cantidad de catecol que puede ser oxidado a *o*-quinona. Por otro lado, el arenóxido también se puede convertir a la fenitoína *trans*-dihidrodiol a través de epóxido hidrolasa microsomal (EPHX), que también puede conducir a la formación de catecol.

Las enzimas implicadas en esta ruta metabólica como la EPHX, NQO1 y la COMT se expresan polimórficamente en seres humanos (Wormhoudt *et al.*, 1999). En el caso de EPHX, dos de estos polimorfismos 113 Tyr-His en el exón 3 (SNP rs 1051740, EPHX1) y 139 His-Arg en el exón 4 (SNP rs 2234922, EPHX2) se han asociado con una disminución o aumento de la actividad de la enzima respectivamente. Aunque la reacción catalizada por la EPHX forma parte de una vía de detoxificación, y la inhibición o disminución de actividad provocan el aumento del intermediario arenóxido, la formación de algunos compuestos más reactivos y mutagénicos como los metabolitos *o*-quinona se puede incrementar si se aumenta su actividad.

En el caso de la COMT, la actividad de la enzima presenta una distribución trimodal: baja, intermedia y alta (Männistö and and Kaakkola, 1999). El Val / Val tiene la mayor actividad, Val / Met intermedio y Met / Met la más baja. Este último genotipo puede incrementar la formación del metabolito *o*-quinona.

Ante la inesperada aparición de esta reacción, dado la baja incidencia que indica la bibliografía de este fenómeno, los 12 individuos fueron genotipificados para evaluar la actividad de las enzimas EPHX y en aquellos 6 individuos en los que se presentó la reacción cutánea se realizó además la genotipificación de la COMT.

Los 6 sujetos afectados presentaron reacciones leves que se limitaban a tronco y piernas. En 2 de los voluntarios la erupción cutánea estuvo precedida por fiebre. En ninguno de

los afectados la paraclínica mostró elevación de las transaminasas, anormalidades relevantes en la función hepática o el hemograma. En todos los casos los sujetos fueron excluidos del ensayo clínico y tratados con antihistamínicos H₁ mostrando todos una completa recuperación luego de la discontinuación del tratamiento.

Las tablas 5.2 y 5.3 muestran parámetros farmacocinéticos como la C_{ss}DFH, C_{ssp}-HPPH y las β y t_{1/2} de DFH, y la actividad enzimática determinada.

Voluntario	Sexo	DFH _{ss} (mg/L)		p-HPPH _{ss} (mg/L)		β DFH (h ⁻¹)		τ _{1/2} (h)		Reacción cutánea		Actividad de EPHX	Actividad de COMT
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
E1	M	10,6	7,5	0,063	0,064	0,0158	0,0198	44	35	No	No	Disminuída	-----
E2	M	2,9		0,13		0,0630		11		Si		Disminuída	Aumentada
E3	M	2,5	1,6	0,125	0,070	0,0272	0,0408	25	17	No	No	Intermedia	-----
E4	F		4,6		0,138		0,0578		12		Si	Disminuída	Intermedia
E5	F		1,7		0,088		0,0693		10		Si	Disminuída	Aumentada
E6	F		1,9		0,118		0,0770		9		Si	Disminuída	Intermedia

Tabla 5.2: Parámetros farmacocinéticos y genéticos para los voluntarios que recibieron Epanutin® (E)

Voluntario	Sexo	[DFH] _{ss} (mg/L)		[p-HPPH] _{ss} (mg/L)		β DFH (h ⁻¹)		τ _{1/2} (h)		Reacción cutánea		Actividad de EPHX	Actividad de COMT
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
C1	M	2,59	1,84	0,066	0,042	0,058	0,027	12	26	No	No	Intermedia	-----
C2	M	2,72	3,34	0,051	0,048	0,053	0,043	13	16	No	No	Aumentada	-----
C3	M	2,50	1,48	0,072	0,062	0,058	0,063	12	11	No	No	Aumentada	-----
C4	F		1,61		0,132		0,049		14		Yes	Disminuída	Intermedia
C5	F	4,11	1,3	0,080	0,027	0,024	0,054	29	13	No	Yes	Aumentada	Intermedia
C6	F	1,91	2,31	0,054	0,069	0,069	0,058	10	12	No	No	Aumentada	-----

Tabla 5.3: Parámetros farmacocinéticos y genéticos para los voluntarios que recibieron Comitoína® (C)

Como se puede ver en las tablas 5.2 y 5.3 todos los sujetos que experimentaron reacciones cutáneas presentaban alteraciones en la actividad de la enzima EPHX (aumento o descenso en su actividad).

Aunque por lo general la hidrólisis del arenóxido constituye un mecanismo de detoxificación, algunas de las moléculas formadas sufren pasos metabólicos adicionales resultando en compuestos mucho más reactivos como las *o*-quinonas que pueden causar daño al unirse al ADN. La enzima NQO1 no fue investigada en estos sujetos ya que ninguno de ellos presentó deficiencias a nivel de la COMT y únicamente la combinación de baja actividad de COMT y de NQO1 puede conducir a la acumulación de metabolitos *o*-quinona (Wormhoudt *et al.*, 1999). Por lo tanto, un aumento de arenóxido, ya sea por aumento en su producción y/o una disminución en su depuración, debió ser lo que disparó la respuesta inmune dando lugar a la aparición de la reacción cutánea

Análisis de los voluntarios bajo tratamiento con Epanutin

En el caso de los voluntarios participantes de la primera etapa del estudio, los cuatro sujetos que presentaron reacción cutánea tenían relación de parentesco (3 hermanos y una prima) y en todos ellos se encontró una baja actividad de EPHX confirmándose una predisposición genética a este tipo de reacciones. Los 2 voluntarios restantes no presentaron ningún tipo de reacción a pesar de que uno de ellos (E1) mostró una actividad disminuida de la EPHX. Este sujeto también presentaba un menor valor de β para DFH, lo que hace probable que la baja actividad de la enzima se viera compensada por una baja velocidad de formación del metabolito tóxico, el cual no se acumuló en cantidad suficiente como para desatar la reacción de hipersensibilidad.

Análisis de los voluntarios bajo tratamiento con Comitoína

En el caso de Comitoína, dos voluntarias (C4 y C5) presentaron reacciones cutáneas, de las cuales una, la voluntaria C4, presentaba un descenso en la actividad de EPHX además de, al igual que los sujetos afectados que recibieron Epanutin, un alto valor de β para DFH. En el caso de la voluntaria C5, la aparición del efecto adverso se podría explicar tal vez por la terapia hormonal anticonceptiva que la misma recibía, ya que al ser los estrógenos moléculas aromáticas, generan en su metabolismo intermediarios arenóxidos. La acumulación de este metabolito proveniente de la biotransformación de dos diferentes xenobióticos podría ser la causa de la erupción cutánea en este caso.

Influencia de la velocidad de disolución de las especialidades farmacéuticas.

Como se mencionó anteriormente y puede verse en la figura 5.9, Comitoína presenta una menor velocidad de disolución que el Epanutin y sus concentraciones en plasma ascienden más lentamente que para este último (Figuras 5.5 a 5.8). El hecho de que se hayan presentado más reacciones de hipersensibilidad con Epanutin que con Comitoína podría deberse al rápido ascenso de los niveles plasmáticos de DFH en combinación con un rápido decaimiento de la droga hacia la formación del arenóxido.

Influencia del sexo de los individuos

De los 6 voluntarios afectados, 5 fueron mujeres. Algunos autores informan que las mujeres en edad fértil son más propensas a sufrir reacciones cutáneas provocadas por DAEs debido a que las hormonas sexuales femeninas aumentan la respuesta inmune (Alvestad *et al.*, 2007), hipótesis que se ve reforzada por el hecho de que no se encuentran diferencias en la incidencia de este fenómeno entre sexos para pacientes mayores de 50 años (Baszczy *et al.*, 2013).

En suma, la génesis de las reacciones de hipersensibilidad a DFH parecería depender de varios factores: la predisposición genética en cuanto a la actividad de la enzima EPHX; el sexo del individuo: mujeres en edad fértil o bajo terapia hormonal; una mayor velocidad de formación del arenóxido debido a un rápido ingreso de la droga o a un aumento de la velocidad de transformación de la misma en el metabolito tóxico.

Referencias bibliográficas

- Alvestad S., Lydersen S., Brodtkorb E. (2007). Rash from antiepileptic drug: Influence by gender, age and learning disability. *Epilepsia*; 48 (7):1360 – 1365
- Baszczy B., Szpringer M., Czuczward S., Lason W. (2013). Single centre 20 year survey of antiepileptic drug-induced hypersensitivity reaction. *Pharmacological Reports*; 65: 399-409
- Belanger P., Bruguerolle B., Labrecque G. (1997). Rhythms in pharmacokinetics: absorption, distribution, metabolism, and excretion. Physiology and pharmacology of biological rhythms. *Handbook of Experimental Pharmacology*; 125: 177-204
- Bessmertny O. and Pham T. (2002). Antiepileptic hypersensitivity syndrome: clinicians beware and be aware. *Current Allergy and Asthma Reports*; 2(1): 34-39
- Chadwick D., Shaw M., Foy P., Rawlins M., Turnbull D. (1984). Serum anticonvulsant concentration and the drug-induced skin eruptions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*; 47: 642 – 644.
- Fagiolino P., Vázquez M., Maldonado C., Ruiz M., Volonté M., Orozco-Suárez S., Lazarowski A. (2013) Usefulness of salivary drug monitoring for detecting efflux transporter overexpression. *Curr. Pharm. Des.*; 19: 6767-6774
- Fagiolino P., Vázquez M., Eiraldi R. (2013). Clearance and bioavailability study through arterio-venous drug concentrations relationship. *Eur. J. Pharm. Sci.*; 48: 825-829
- Ghaffarpour M., Hejazie S., Harirchian M., Pourmahmoodian H. (2005). Phenytoin, carbamazepine, sodium valproate and lamotrigine induced cutaneous reactions. *Acta Medica Iranica*; 4 (1):37-42.
- Leeder J. (1998). Mechanisms of idiosyncratic hypersensitivity reactions to antiepileptic drugs. *Epilepsia*; 39(7):S8-S16

Männistö P. and Kaakkola S. (1999). Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological reviews*; 51(4): 593-628.

Pirmohamed M. (2006). Genetic factors in the predisposition to drug-induced hypersensitivity reactions. *The AAPS Journal*; 8 (1): E20-E26.

Sanderson J., Naisbitt D., Park B. (2006). Role of bioactivation in drug-induced hypersensitivity reactions. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*; 8 (1) E55-E54.

Wormhoudt L., Commandeur J., Vermeulen N. (1999). Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-s-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*; 29(1):59-124.

Capítulo 6: Impacto de las diferentes frecuencias de administración de fenitoína en voluntarios sanos

En el capítulo 5 se analizaron los datos obtenidos en la totalidad de los voluntarios que participaron en un ensayo clínico con el fin de demostrar la influencia de los transportadores de membrana en la respuesta farmacocinética de la fenitoína (DFH).

En este capítulo se analizarán los resultados obtenidos en los sujetos que completaron ambas fases de este estudio.

Resultados

La Tabla 6.1 resume algunos parámetros farmacocinéticos de DFH y p-hidroxifenilhidantoína (p-HPPH) para ambos tratamientos (A (600 mg/72h) – B (100 mg/12h)) para los 6 voluntarios que completaron el protocolo experimental y el resultado del análisis estadístico pareado para las diferencias entre tratamientos.

Voluntario	C _{ss} DFH (mg/L)		C _{ss} p-HPPH (mg/L)		S _{1ss} DFH (mg/L)		S _{2ss} DFH (mg/L)		S ₁ /S ₂ (%)		S ₁ /P (%)		t _{1/2} (h)		p-HPPH/DFH (%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
E 1-H	10.5	7.47	0.0633	0.0635	0.864	0.700	0.902	0.719	95.8	97.5	8.19	9.38	43.5	35.4	0.600	0.850
E 3-H	2.52	1.59	0.124	0.0700	0.174	0.165	0.194	0.209	89.9	79.0	6.93	10.4	25.5	17.2	4.93	4.39
C 1-H	2.59	1.89	0.0661	0.0415	0.246	0.191	0.326	0.183	75.3	104	9.46	10.1	13.7	25.8	2.55	2.19
C 2-H	3.34	2.72	0.0483	0.0505	0.323	0.326	0.296	0.328	109	99.4	9.66	11.1	16.2	11.3	1.45	4.16
C 3-H	2.50	1.48	0.0720	0.0615	0.220	0.178	0.232	0.157	94.9	113	8.78	12.1	13.0	11.3	2.88	4.16
C 6-M	2.31	1.91	0.0686	0.0543	0.192	0.193	0.230	0.208	83.4	92.7	8.28	10.1	11.5	10.4	2.97	2.85
Promedio	1,12		0,02		0,04		0,06		-6,22		-1,98		2,00		0,54	
DE	0.96		0.02		0.06		0.09		15.62		1.16		7.55		1.25	
Significación	p < 0,01		P < 0.05		NS		NS		NS		p < 0,001		NS		NS	

Tabla 6.1: Comparación de los parámetros farmacocinéticos medios obtenidos para un mismo voluntario según tratamiento. Concentración plasmática media de estado estacionario para DFH y pHPPH (C_{ss}); concentración salival media de estado estacionario de DFH obtenida en fracciones 1 y 2 (S_{1ss} y S_{2ss} respectivamente); cociente fracción S_{1ss}/S_{2ss} (S₁/S₂); cociente S_{1ss}/C_{ss} (S₁/P) y cociente C_{ss} DFH/C_{ss} pHPPH (pHPPH/DFH). DE: desviación estándar; NS: no significativo.

En este análisis se hace significativa la diferencia entre las concentraciones plasmáticas medias de estado estacionario para DFH y p-HPPH obtenidas en los distintos tratamientos.

La figura 6.1 muestra los perfiles plasmáticos de estado estacionario de DFH para ambos tratamientos para cada individuo que completó el estudio.

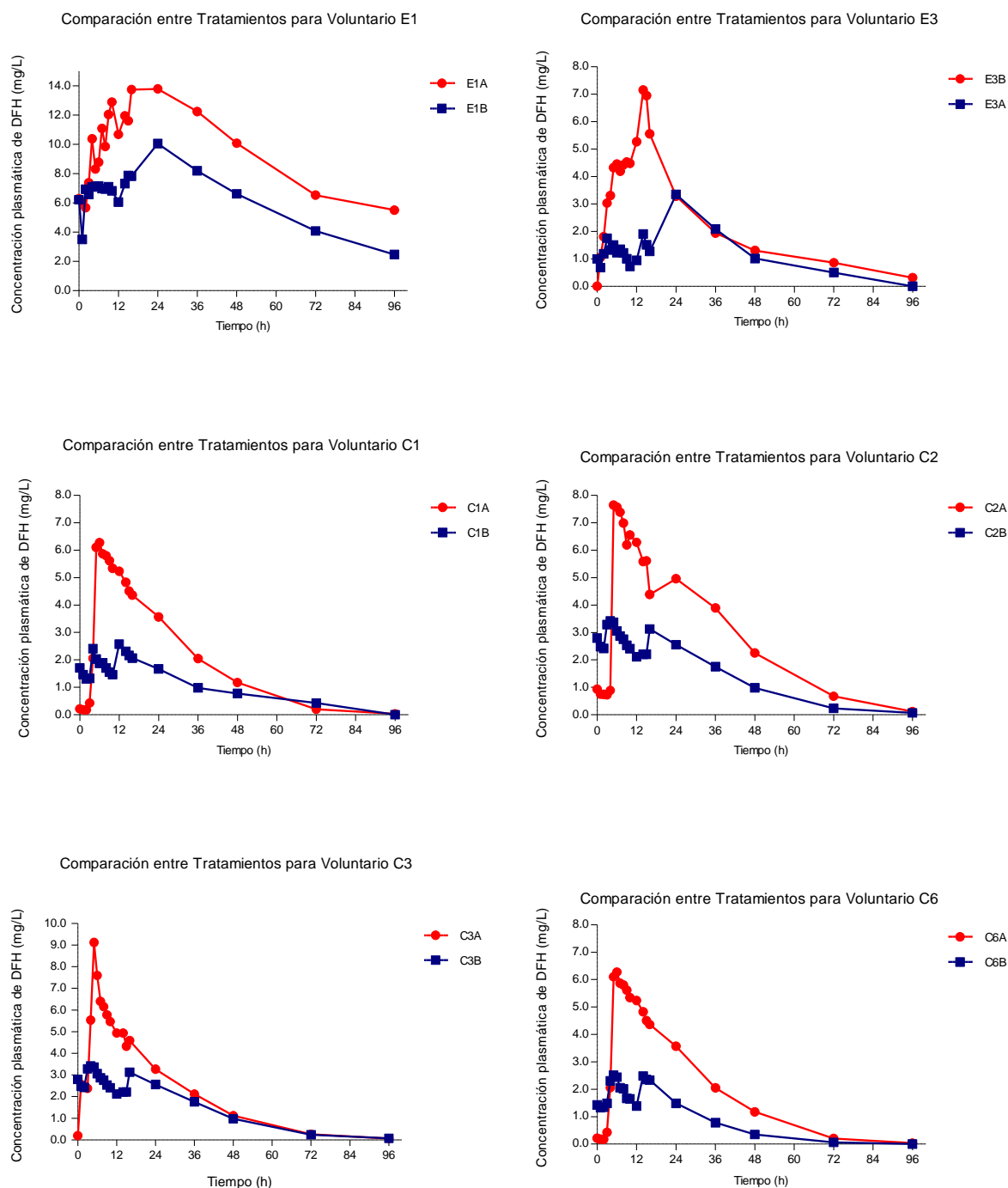


Figura 6.1: Perfiles de concentración plasmática de DFH obtenidos luego de 10 días de administración de 600 mg/72 h (Tratamiento A) y de 100 mg/12h (Tratamiento B) para los 6 voluntarios que completaron el ensayo.

La figura 6.2 muestra los perfiles de concentraciones plasmáticas y salivales de DFH para cada uno de los tratamientos luego de 10 días de administración.

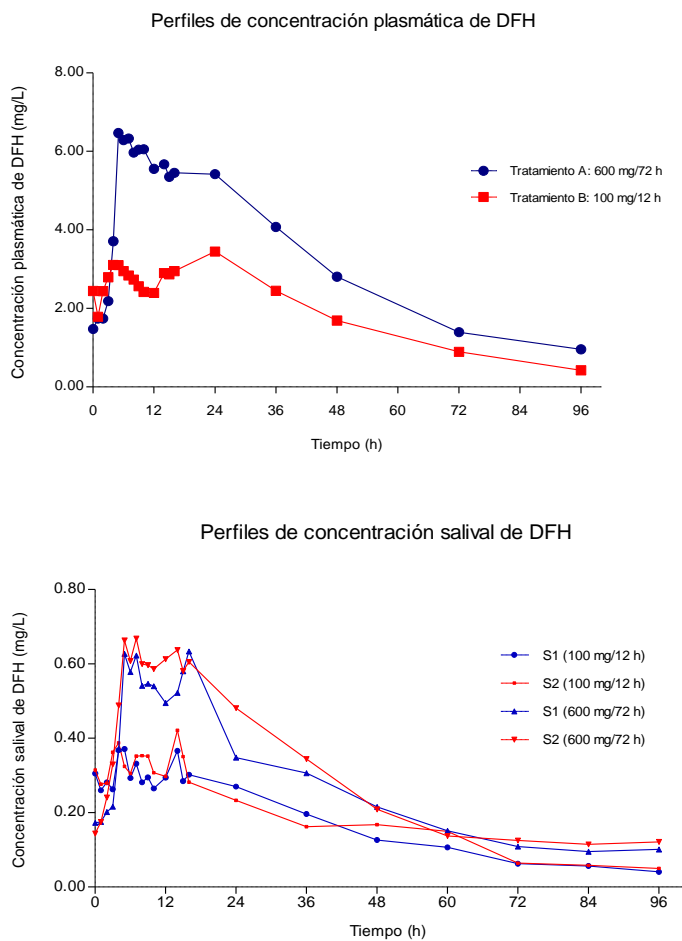


Figura 6.2: Perfiles medios de concentraciones plasmáticas y salivales de DFH obtenidos luego de 10 días de administración de 600 mg/72 h (Tratamiento A) y de 100 mg/12h (Tratamiento B) para los 6 voluntarios que completaron el ensayo.

En la figura 6.3 se pueden ver los perfiles plasmáticos de estado estacionario para ambos tratamientos para un intervalo de 72 hs.

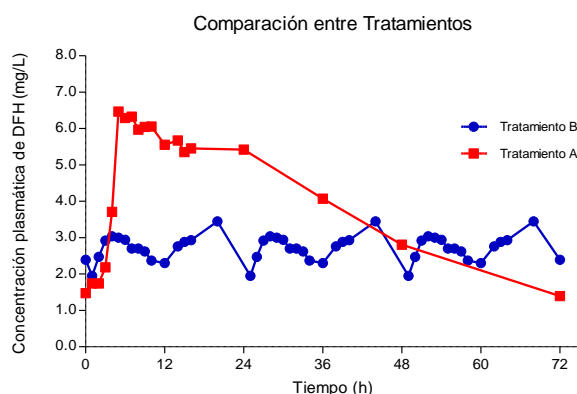


Figura 6.3: Perfiles medios de concentración plasmática de estado estacionario de DFH obtenidos tras la administración de 600 mg/72 h (Tratamiento A) y 100 mg/12h (Tratamiento B) para los 6 voluntarios que completaron el ensayo para un intervalo de 72 h

Discusión

Al realizar la comparación mediante análisis estadístico para muestras pareadas de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por los voluntarios bajo los distintos tratamientos, surgen diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas medias de estado estacionario tal como se prevé según la cinética no lineal que muestra la DFH. Esta diferencia se podría deber, como ya fue explicado, a los diferentes estados inductivos de las proteínas transportadoras, sobre todo a nivel de los órganos espláncnicos que genera cada uno de los tratamientos. Es probable que el Tratamiento A genere una mayor inducción de los transportadores de eflujo a nivel de los órganos digestivos que el Tratamiento B y esto resulte en una recirculación enterohepática más intensa que conduzca a valores de concentración significativamente mayores.

En el caso del metabolito p-HPPH, las concentraciones medias de estado estacionario también se hacen significativamente distintas en este análisis, lo cual sugiere, en contraposición a lo reportado por Bourgeois y Wad, (1985) que esta molécula también presentaría una cinética no lineal, lo que dada su similitud estructural con DFH podría deberse a que también el metabolito es sustrato de transportadores de eflujo.

Los perfiles de concentraciones plasmáticas mostrados para ambas posologías muestran la presencia de numerosos picos secundarios de concentración. La presencia de estos picos a tiempos lejanos a la administración pone en evidencia procesos de recirculación. Esto ocurriría porque durante su distribución el fármaco se acumularía en órganos del

aparato digestivo en cantidades significativas para luego ser excretado hacia la luz del intestino delgado desde donde puede reingresar al torrente circulatorio. Dadas las propiedades fisicoquímicas de la DFH, la acumulación podría estar dándose en páncreas y vesícula biliar. Este fenómeno se ve favorecido por la sobreexpresión de transportadores de eflujo, ya que el aumento de su expresión a nivel del canalículo biliar acelera la salida de las moléculas de DFH del hepatocito donde se alojan los sistemas enzimáticos capaces de metabolizarla (CYP2C9 y el CYP2C19) desviándola hacia la luz del tracto intestinal, sitio de escasa expresión de estas enzimas (Läpple *et al.*, 2003) y desde el cual pueden reabsorberse a la circulación sistémica.

Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados obtenidos del análisis del fluido salival tal como se explicó en el Capítulo 5. Se puede observar en los perfiles de concentración salival cómo los niveles de S2 se mantienen por encima de los de S1 durante una parte importante del tiempo, mostrando el impacto de los procesos de recirculación que llevan a que la droga esté en constante reabsorción.

Este comportamiento farmacocinético podría tener relación con el desarrollo de la tolerancia a los tratamientos anticonvulsivantes. Si bien como se mencionó en el Capítulo 1, la DFH aunque es de gran eficacia cuando se presentan cuadros clínicos severos en fase aguda convulsiva y es útil en varios tipos de epilepsia, no escapa de la aparición de la resistencia farmacológica en el transcurso de tratamientos crónicos en ciertos pacientes susceptibles. Siendo la sobreexpresión del transporte de eflujo una de las causas que explican la epilepsia refractaria (Lazarowski *et al.*, 2006) y siendo que Pgp es capaz de aumentar su expresión en presencia de agentes como la DFH, sería de esperar que durante tratamientos crónicos en los que surge la refractariedad, se hagan necesarios aumentos de dosis que generaran mayor sobreexpresión de transportadores, hasta llegar a una situación de escaso margen para el ajuste posológico debido a su no-linealidad farmacocinética y a la aparición de efectos tóxicos severos. Esto debido en parte a que el aumento en la expresión de Pgp se haría efectivo un cierto tiempo después de aumentadas sus concentraciones (48 hs según lo estimado por Maldonado *et al.* en 2011) y por otro lado porque se ha visto en la rata que la sobreexpresión se restringiría a ciertas zonas del cerebro mientras que en otras regiones no se registrarían cambios en la expresión de Pgp así como tampoco la disminución cerebral de los niveles

de DFH, permitiendo la coexistencia dentro del cerebro de regiones de concentración tóxicas y regiones de concentración ineficaz (Van Vliet *et al.*, 2007).

La teoría que propone a la sobreexpresión de los transportadores de eflujo como causa de la epilepsia refractaria, sostiene que las crisis convulsivas no controladas pueden por sí mismas inducir la sobreexpresión de transportadores de eflujo (Hoffmann *et al.*, 2006). Si a la sobreexpresión causada por la enfermedad se le agrega la inducción generada por el agente anticonvulsivante, cuya intensidad aumenta con los necesarios aumentos de dosis frente a la recurrencia de las crisis, se podría estar enfrentando una situación en la que el fármaco favorece su pérdida eficacia terapéutica y tal vez la aparición de refractariedad en individuos susceptibles.

En este trabajo se encontró un mayor cociente SI/P (indicativo del estado inductivo medio de transportadores de eflujo en la glándula salival) para el tratamiento B, lo cual estaría indicando que niveles constantes del fármaco sobre sus umbrales inductivos provocarían una mayor sobreexpresión de Pgp a nivel de la glándula salival y muy probablemente a nivel de la BHE, que el tratamiento A, en el cual la mayor oscilación pico-valle, lleva a que las concentraciones estén durante una parte considerable del intervalo (aproximadamente 24 hs) por debajo de las concentraciones que provoca el tratamiento B, y por lo tanto probablemente por debajo de las concentraciones mínimas inductivas.

Esquemas posológicos como el tratamiento A, que generan una mayor oscilación pico-valle, podrían constituir una alternativa para minimizar la sobreexpresión de transportadores provocada por el fármaco, potenciar su eficacia y colaborar en la disminución de la aparición de la refractariedad terapéutica.

En cuanto a su seguridad del tratamiento, en el tratamiento A la aparición de reacciones cutáneas fue menor que en el tratamiento B. Si nos remitimos al análisis pareado como el que se muestra en este capítulo, en el que las concentraciones medias de estado estacionario son significativamente diferentes, se podría pensar en que el menor *clearance* de DFH que presenta el tratamiento A implica una formación más lenta del intermediario arenóxido, principal responsable de las reacciones de hipersensibilidad a

DFH, lo que llevaría a una menor acumulación del mismo y por lo tanto menor incidencia de erupciones cutáneas.

Dado que cada dosis que se administra bajo el tratamiento A encontraría al paciente en condiciones menores de expresión de transportadores respecto al tratamiento B, la misma provocaría una importante y nueva inducción no solo de transportadores de eflujo sino además de la enzima EPHX, con lo cual se promovería una mayor invasión de la DFH al espacio cerebral, se enlentecería su eliminación y por ende la formación de arenóxido, al tiempo que se aumentaría la depuración de este intermediario tóxico. En resumen, el tratamiento innovador A estaría mejorando la eficacia de DFH y reduciendo su toxicidad, respecto al convencional tratamiento B.

Referencias bibliográficas

Bourgeois B and Wad N. (1985). Michaelis-Menten Kinetics and the Steady-State serum phenytoin/hydroxyphenytoin ratio. *Therapeutic Drug Monitoring*; 7: 405-410

Hoffmann K., Gastens A., Volk H., Löscher W. (2006). Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsy Research*; 69: 1-14.

Lazarowski A., Czomyj L., Lubieniecki F., Vázquez S., D'Giano C., Sevlever G., Taratuto A., Brusco A., Girardi E. (2006). Multidrug-resistance (MDR) protein develops refractory epilepsy phenotype: Clinical and experimental evidences. *Current Drug Ther*; 1: 291-309.

Läpple F., Von Richter O., Fromm M., Richter T., Thon K., Wisser H., Griese E., Eichelbaum M., Kivistö K. (2003). Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics*; 13(9): 565-75.

Maldonado C., Fagiolino P., Vázquez M., Eiraldi R., Alvariza S., Bentancur C., Álvarez P. (2011). Time-dependent and concentration-dependent upregulation of carbamazepine efflux transporter. A preliminary assessment from salivary drug monitoring. *Latin American Journal of Pharmacy*; 30, 908-912.

Van Vliet E., Van Schaik R., Edelbroek P., Voskuyl R., Redeker S., Aronica E., Wadman W., Gorter J. (2007). Region-Specific Overexpression of P-glycoprotein at the Blood - Brain Barrier Affects Brain Uptake of Phenytoin in Epileptic Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 322, 141-147.

Capítulo 7: Conclusiones

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo verificar el rol determinante de la capacidad inductora de la fenitoína (DFH) sobre Pgp, la influencia de este fenómeno sobre su comportamiento farmacocinético y sus implicancias terapéuticas.

Con este objetivo se recurrió en primer lugar a la utilización de modelos animales para la verificación de la capacidad inductiva concentración-dependiente de DFH sobre Pgp a nivel de diferentes tejidos en los que se expresa constitutivamente. En esta instancia efectivamente se pudo comprobar un efecto inductivo concentración-local-dependiente sobre todos los tejidos ensayados (intestino, hígado, cerebro y glándula salival) y su carácter reversible una vez que el fármaco es eliminado por el organismo. Los resultados obtenidos sugieren además la existencia de concentraciones umbrales de la sustancia para producir la inducción de las proteínas transportadoras, ya que únicamente concentraciones plasmáticas medias de estado estacionario superiores a 7,2 mg/L fueron capaces de generar una sobreexpresión significativa a nivel cerebral. El cerebro, cuando la administración del fármaco se realiza por vía oral de la forma en que se describe en el Capítulo 2, es el único tejido en el que la inducción de transportadores es causada por los niveles plasmáticos del anticonvulsivante.

El hallazgo de los diferentes efectos provocados por la adición de un bloqueante de Pgp como verapamilo (VPM) sobre la cinética de la DFH según los diferentes estados de inducción de enzimas y transportadores al momento de su administración, suma evidencias a favor de nuestra hipótesis de trabajo.

Cuando VPM se administró en estado basal de expresión de CYP y Pgp, las concentraciones plasmáticas de DFH experimentaron un aumento significativo, debido a una disminución de su CL. Al ser el intestino en las ratas un sitio relevante en la biotransformación de DFH por su importante contenido de los sistemas enzimáticos que la metabolizan, el bloqueo de Pgp estaría conduciendo a una disminución de la fracción intestinal del CL de la droga. En cambio si el VPM es administrado luego de que enzimas y Pgp se han sobreexpresado, como resultado de la administración subcrónica del anticonvulsivante, se observa una clara caída en los niveles plasmáticos de DFH, lo cual hemos propuesto se debería a que interrumpido el ciclo enterohepático

que promueve continuas reabsorciones del fármaco por bloqueo de la Pgp a nivel hepato-biliar, el mismo estaría mucho más disponible para ser metabolizado por las enzimas hepáticas inducidas por la propia DFH, aumentando significativamente su CL.

En cuanto al impacto a nivel del SNC de la administración de VPM durante tratamientos prolongados con DFH, se observó un aumento del cociente de concentraciones cerebro/plasma de la droga. Más estudios deberían realizarse a fin de confirmar si este aumento fue motivado por el bloqueo de Pgp a nivel de la BHE, con el consecuente aumento de su permeabilidad, o por el tiempo que insume el establecimiento de un nuevo equilibrio en la transferencia de la DFH al cerebro luego del derrumbe de las concentraciones plasmáticas de la droga.

En una segunda etapa, se realizó un ensayo clínico en voluntarios sanos utilizando dos tratamientos de manera tal que entregando la misma dosis total pero bajo diferentes esquemas posológicos (tratamiento A (600 mg/72 h) o Tratamiento B (100 mg/12 h)) se generaran diferentes estados inductivos medios sobre transportadores de eflujo. En este estudio a través de la medición simultánea de la droga en saliva y plasma, se pudo verificar la existencia de un mayor grado de inducción medio para el tratamiento B, en el cual las concentraciones a pesar de ser en su media menores a las obtenidas en el tratamiento A, poseen baja oscilación pico-valle, situándose siempre sobre los umbrales mínimos de concentración inductora. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en ratas, en las que en tratamientos análogos a los realizados sobre voluntarios sanos, la administración subcrónica de 100 mg/kg/24 h si bien originaba una mayor sobreexpresión de Pgp a nivel esplácnico, mostraba una menor expresión a nivel cerebral que la administración de 25 mg/kg/6 h (Figura 7.1 (a) y (b)).

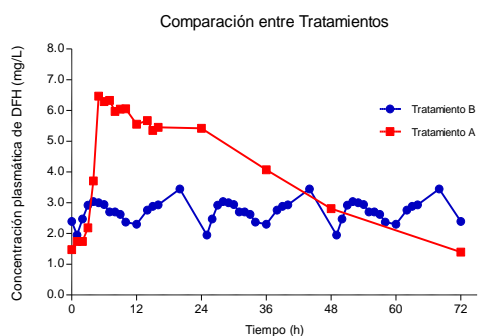


Figura 7.1 (a) Concentraciones plasmáticas medias de DFH para ambos tratamientos

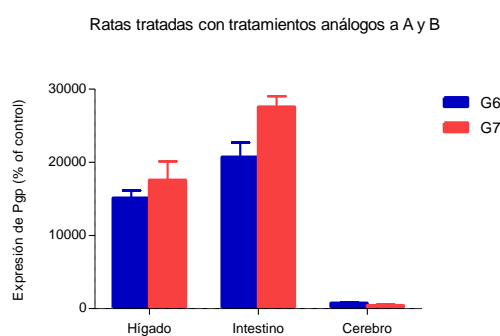


Figura 7.1(b): Expresión de Pgp (% del control) tras la administración intraperitoneal de 25 mg/kg/6 h (G6) o 100 mg/kg/24 h (G7)

El mayor grado de inducción alcanzado por los tratamientos convencionales similares al tratamiento B, podría guardar relación con la aparición de la farmacorresistencia en algunos pacientes epilépticos susceptibles, ya que el propio anticonvulsivante podría estar disminuyendo su acceso a su sitio de acción por la inducción del transporte de eflujo a nivel de la BHE

Se ha postulado que la temprana respuesta al tratamiento farmacológico al inicio de la enfermedad, entre otros, es un factor de buen pronóstico en la evolución de la misma (Brodie, 2005). En tal caso la implementación de posologías altamente oscilantes al inicio de la presentación de la enfermedad podría colaborar en evitar la aparición del fenómeno de tolerancia, al impedir la sobreexpresión de proteínas transportadoras provocadas por las propias crisis convulsivas, a la vez que se minimiza la sobreexpresión generada por el propio anticonvulsivante mejorando la entrada de la droga al sistema nervioso y aumentando su eficacia.

Esta alternativa posológica, que podría colaborar a mejorar los resultados de los tratamientos farmacológicos, podría a su vez disminuir la frecuencia de aparición de las reacciones cutáneas por hipersensibilidad al fármaco. En este sentido, el tratamiento A provocó menor aparición de este efecto adverso que el tratamiento B en los sujetos participantes del ensayo clínico. El hecho de que la posología de 600 mg/72 h generara mayores concentraciones medias de estado estacionario de DFH sugiere que el menor clearance del fármaco implica una formación más lenta del metabolito intermediario arenóxido, principal responsable de las reacciones de hipersensibilidad por DFH, lo que llevaría a una menor acumulación del mismo y por lo tanto menor incidencia de erupciones cutáneas.

Otro hallazgo relevante de esta investigación fue la observación de múltiples picos secundarios en tiempos lejanos al momento de la administración, revelando la ocurrencia de intensos procesos de recirculación enterohepática.

Esta constatación apoya la hipótesis propuesta, de que el efecto de continua reentrada generada por la recirculación enterohepática promovida por la sobreexpresión del transporte de eflujo a nivel esplácnico inducido por el propio fármaco, podría entonces ser el responsable tanto de la escasa oscilación pico-valle que muestra la DFH en estado estacionario en los tratamientos convencionales, como del aumento desproporcional de

sus concentraciones con los aumentos de dosis, y no la saturación, en este último caso, de los sistemas enzimáticos CYP2C9 y CYP2C19 como clásicamente se ha propuesto.

Referencias bibliográficas

Brodie M. (2005). Diagnosis and predicting refractory epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*; 112 (181): 36 - 39.

Anexo I: Dosificación de fenitoína y p-hidroxifenildantoína en plasma de rata

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación, en plasma de rata, de Fenitoína y su principal metabolito, para-hidroxifenilhidantoína.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Área Analítica del CEBIOBE.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE.

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

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

Agua: Agua calidad HPLC (destilada y filtrada por 0.45 µm)

DFH: Fenitoína

DFH sódica: sal sódica de DFH. Contiene un 92.0 % del analito como tal.

p-HPPH: para-hidroxifenilhidantoína

NTZ: Nitrazepam

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

MeOH: Metanol calidad HPLC.

LLOQ: Límite inferior de cuantificación (Lower Limit Of Quantification)

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de soluciones

5.1.1 *Solución Fase Móvil (para retomar residuo seco en proceso de extracción)* Tomar con material graduado 43 mL de agua, 10 mL de ACN y 47 mL de MeOH y mezclar en un recipiente adecuado.

5.1.2 *Solución de Estándar Interno.* Pesar en forma exacta aproximadamente 40 mg de NTZ estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol utilizando un matraz aforado, generando N_0 (800.0 mg/L). Tomar 0.5 mL de dicha solución con pipeta automática y llevar a 25 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 16.00 mg/L de NTZ (NI).

5.1.3 *Soluciones stock DFH.* Pesar en forma exacta aproximadamente 26.5 mg de DFH sódica estándar, disolver y llevar a 50 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 487.5 mg/L de DFH (SOLUCIÓN A'). Tomar 1 mL de A' con material aforado y llevar a 10 mL con MeOH en matraz aforado a fin de obtener una concentración de DFH aproximada de 48.75 mg/L (SOLUCIÓN B').

5.1.6 *Solución stock p-HPPH:* Pesar en forma exacta aproximadamente 15 mg de p-HPPH estándar y llevar a 25 mL con MeOH en matraz aforado. Tomar 1 mL de solución y llevar con MeOH a 10 mL en matraz aforado obteniendo una concentración aproximada de 60 mg/L de p-HPPH (SOLUCIÓN MA). Tomar 2 mL de solución MA y llevar con MeOH a 10 mL en matraz aforado para obtener una solución de concentración aproximada de p-HPPH de 12mg/L (SOLUCIÓN MB).

5.1.7 *Soluciones Plasmáticas estándar para curva de calibración:* a 10 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando micropipeta la solución metanólica especificada en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Nombre Solución	Volumen a cargar en 10 mL de plasma	Concentración DFH (mg/L)	Concentración p-HPPH (mg/L)
A	500 µL A' + 500 µL MA	22.16	2.81
B	300 µL A' + 300 µL MA	13.80	1.72
C	200 µL A' + 100 µL MA	9.47	0.59
D	100 µL A' + 200 µL MB	4.73	0.23
E	500 µL B' + 100 µL MB	2.30	0.12
F	100 µL B' + 50 µL MB	0.48	0.06

5.2 Tratamiento de la muestra plasmática

- a) Tomar 50 µL de muestra con pipeta automática.
- b) Agregar 10 µL de solución de estándar interno utilizando jeringa de vidrio. La concentración resultante de estándar interno es de 3.2 mg/L.
- c) Agitar en vórtex durante 10 segundos
- d) Agregar 250 µL de acetato de etilo utilizando material graduado.
- e) Agitar en vórtex durante 1 minuto.
- f) Centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 3000 rpm.
- g) Tomar la fase orgánica (superior) con pipeta pasteur y colocarla en un tubo de centrifuga.
- h) Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40°C.
- i) Retomar el residuo con 50 µL de solución fase móvil.
- j) Agitar mediante vórtex durante 10 segundos.
- k) Tomar la solución y trasvasarla a vial de inyección mediante pipeta pasteur o micropipeta.
- l) Inyectar 20 µL en HPLC bajo las condiciones descritas en 5.5.

5.4 Preparación curva de calibración para análisis de muestras.

5.5 Preparación de soluciones plasmáticas estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras y para la determinación de parámetros para la validación de la técnica analítica: Se deberán realizar 3 controles de concentración (3 veces el LLOQ, 50 % y 75 % del rango de calibración) para obtener los controles bajo (B), medio (M) y alto (A) respectivamente.

5.5.1 Soluciones metanólicas:

- DFH₁: pesar en forma exacta aproximadamente 34.0 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 50 mL. Concentración DFH₁ = 0.6256 mg/mL.
- DFH₂: pesar en forma exacta aproximadamente 22.4 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 50.0 mL. Concentración DFH₂ = 0.4122 mg/mL.
- DFH₃: pesar en forma exacta aproximadamente 28.50 mg de DFH estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 10.0 mL (SOLUCIÓN DFH₃₀=2.622 mg/mL). Tomar 0.5 mL y llevar a 25 mL con material aforado. Concentración DFH₃ = 0.05244 mg/mL.

5.5.2 Soluciones plasmáticas control: a 10 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando material aforado las soluciones metanólicas especificadas en la tabla. Homogeneizar.

Nombre Solución	Plasma cargado con:	Concentración (mg/L)
P1	300 uL de DFH ₁	18.22
P2	300 uL de DFH ₂	12.00
P3	300 uL de DFH ₃	1.527

5.7 Condiciones Cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.

Columna: C18 Phenomenex Luna (15 cm x 4.6 mm, 5 µm) o similar.

Detector: UV de arreglo de diodos, Dionex DAD-3000.

Fase móvil: Agua: ACN: MeOH (43:47:10).

Flujo: 1.0 mL/min.

Longitud de onda: 220 nm.

Temperatura de horno de columna: 40 °C

Temperatura de compartimento de muestras: 5 °C

5.8 Tiempos de Retención

p-HPPH - 3.5 minutos

DFH - 4.5 minutos

NTZ (E.I) - 6 minutos

5.9 Cálculos

Se determinarán las concentraciones de DFH utilizando como variable independiente la relación de áreas que presente respecto al NTZ en el cromatograma. El modo de calibración a usar será lineal forzado por cero, y la pendiente a utilizar resultará de la curva de calibración elaborada el día de la dosificación.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

Instructivo de operación de la balanza

Instructivo de operación del HPLC

Instructivo de operación del vortex

Instructivo de operación del baño seco

Instructivo de operación del pH-metro

Instructivo de operación de la centrífuga refrigerada

Anexo II: Técnica inmunohistoquímica para la determinación de Pgp

Los bloques de tejido fueron cortados en criostato (Leica GM 1510S, Germany) y montados láminas de en poli-L-lisina recubierto y fijadas con acetona fría.

A continuación, las secciones se lavan en solución tampón fosfato salino 0,12 M (PBS, pH 7.2- 7.6) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con solución de bloqueo, (suero de caballo normal al 1% en PBS 0,12 M, Vector Lab). Posteriormente las secciones fueron incubadas con anticuerpos anti Glicoproteína-P [JSB-1] (Abcam Lab ab3366.) diluido en PBS (1: 200) durante 24 horas a 4-8C. Las secciones fueron luego lavadas con PBS 0,12 M durante 15 min, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpo antimouse-IgG Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen Lab. A21121) diluido en PBS. Seguido de eso se realizó un lavado con PBS y se contratiñeron con yoduro de propidio durante 1 min a lo que sigue un lavado final en PBS 0,12 M durante 10 minutos.

Luego de secar suavemente, las muestras fueron montadas con medio de montaje Vectashield (Vector Lab). Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss), con cámara refrigerada (Evolution) y analizador de imágenes Image Pro Plus 7 (Media Cybernetics).

Análisis de expresión de Pgp

El análisis de intensidad de expresión de Pgp se realizó a partir de las imágenes adquiridas a fin de cuantificar la intensidad de los píxeles en el canal verde correspondiente a la Alexa 488. El histograma acumulado se obtiene a partir de los valores de intensidad contenidas en mapa de bits de la imagen, previamente calibrada en intensidad y escala espacial. El valor de intensidad se obtuvo como intensidad integrada de cada imagen.

La densidad óptica se determinó en relación con el grupo de control y se expresa como píxeles / mm².

Anexo III: Técnica analítica para determinación de fenitoína en dializado cerebral de ratas

La cuantificación de la fenitoína extracelular contenida en los dializados es determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Los aproximadamente 20 μ L de cada dializado recolectado durante la microdialisis se inyectan en un cromatógrafo equipado con una columna Nova-Pack C18 (150 x 1.9mm, tamaño de partícula 5 μ m) mantenida a temperatura ambiente.

La fase móvil consiste en una mezcla de Acetonitrilo/ Fosfato de Potasio 50 mM (4:6 v/v;) ajustada a pH 5.6 con ácido fosfórico, la cual es bombeada a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

La detección del analito se realiza mediante un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 220 nm.

La cuantificación de la cantidad de fenitoína contenida en cada muestra es calculada en base a la curva de calibración obtenida mediante regresión lineal: $y=449419x+8761.6$.

Consentimiento Informado
INFORMACION PARA EL VOLUNTARIO

Es importante que lea este documento para estar informado sobre esta investigación clínica. Si Usted aceptara participar en ella, la firma de este consentimiento indicará tanto la recepción, como la comprensión y aceptación de la información.

Título del estudio:

“Ensayo Clínico para Demostrar la Inducción de Transportadores de Membrana en la Respuesta Farmacocinética No Lineal y en el Desarrollo de Tolerancia a La Respuesta Antiepiléptica Durante Tratamientos Crónicos con Fenitoína”

Investigador Principal: Profesor Dr. Q.F. Pietro Fagiolino

Equipo Clínico: A cargo de los servicios contratados de Alquimia Ltda. bajo la responsabilidad del CEBIOBE

Información: Este consentimiento le informa sobre los objetivos, riesgos e inconvenientes, condiciones en que se llevará a cabo, seguros, y derecho a retirarse del estudio. Si usted decide participar lo hará en forma completamente voluntaria y podrá retirarse de él en cualquier momento por iniciativa propia, sin explicar las causas.

1. Objetivo:

El objetivo de esta investigación es resolver un dilema básico sobre la farmacocinética de Fenitoína, a la vez que se explora la terapéutica antiepiléptica de una manera atípica, con grandes perspectivas de resolver un problema sanitario grave como lo es la resistencia farmacológica en el tratamiento de la epilepsia, optimizando la terapia mediante el uso de un agente farmacológico reconocidamente efectivo y de muy bajo costo.

2. Procedimiento previo:

El estudio será conducido en conformidad con el protocolo, con las BPC – CIARM (Buenas Prácticas Clínicas – Conferencia Internacional de Armonización), y las normativas del Ministerio de Salud Pública del Uruguay (Decreto del Poder Ejecutivo 379/008 del 04.08.2008, que regula la Investigación en seres humanos, en relación con la información a brindar al voluntario de un estudio). Asimismo se realizará de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Médica Mundial (como consta en la Declaración de Helsinki, 1964, y las últimas enmiendas de Edimburgo, Escocia 2000).

El protocolo de este estudio conjuntamente con este Formulario de Consentimiento Informado (FCI), ha sido aprobado por la Comisión de Ética del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela”

3. Su participación:

Usted ha sido citado para proponerle la participación como voluntario sano en este estudio que pretende determinar la similitud o diferencia entre dos diferentes tratamientos con Fenitoína: Tratamiento A (600 mg de Fenitoína cada tres días durante un período de 10 días) y Tratamiento B (100 mg de Fenitoína cada 12 hs durante 10 días).

Ambos tratamientos se realizarán mediante la ingesta de comprimidos de 100 mg del fármaco, elaborados por un Laboratorio nacional/internacional, que cuenta con registro otorgado por el Ministerio de Salud Pública

4. Sus derechos:

Antes de que usted decida tomar parte en este estudio de investigación es importante que lea cuidadosamente este documento.

Los médicos a cargo del estudio (Investigadores Médicos) le explicarán todos aquellos puntos en los que tenga dudas. Si después de haber leído toda la información usted decide participar en el estudio, deberá firmar este consentimiento en los lugares indicados y devolverlo al médico a cargo; además recibirá una copia de este consentimiento firmado.

Nadie puede forzarlo a participar en este estudio. Aunque acepte participar ahora, es libre de cambiar de opinión y retirarse del estudio en cualquier momento. Por favor, revise con detenimiento este formulario y consulte cualquier duda que se le presente antes de firmarlo.

5. Información sobre la medicación:

La Fenitoína es un fármaco ampliamente usado en el tratamiento de distintos tipos de epilepsia.

La epilepsia es un trastorno de la función cerebral caracterizado por el surgimiento periódico de convulsiones, las cuales se caracterizan por un trastorno transitorio de la conducta desencadenado por la activación desordenada de poblaciones de neuronas hipersensibles.

La Fenitoína actúa entonces impidiendo la propagación del impulso nervioso en estas neuronas.

La Fenitoína se absorbe en el intestino lentamente luego de su administración oral. Se une extensamente a proteínas plasmáticas, aproximadamente en un 90%. Se elimina principalmente a nivel hepático con una pequeña fracción

excretada de forma incambiada en orina. Su semivida de eliminación a las concentraciones esperadas en esta investigación es de 12 a 13 hs.

6. Reacciones adversas en pacientes

Algunos de los efectos adversos de la Fenitoína, como el nistagmo (movimientos oculares anormales), visión borrosa, ataxia (marcha descoordinada), diplopía (visión doble) y coma se relacionan con la dosis. No es esperable que en este estudio con las dosis que usted recibirá arribe a las concentraciones necesarias para que se origine este tipo de toxicidad.

Otros efectos adversos referenciados en tratamientos crónicos y a largo plazo son: inflamación de encías, aumento del crecimiento del cabello, engrosamiento de labios y nariz, acné y erupciones. Se han manifestado asimismo alteraciones hematológicas.

7. Reacciones adversas en voluntarios sanos

En estudios similares no se notificaron ninguna de las reacciones anteriormente mencionadas.

8. Procedimiento del estudio

Selección de voluntarios

Durante el proceso de selección de voluntarios, dentro de las dos semanas antes de comenzar el estudio, usted será sometido a un examen médico general, se le medirá la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca y se le realizará un electrocardiograma. Se le tomarán muestras de sangre y de orina. Una de las muestras de sangre será utilizada para detectar virus de Inmunodeficiencia humana (VIH), de la Hepatitis B y de la Hepatitis C. A las voluntarias se les realizará test de embarazo. Un resultado positivo en cualquiera de los ensayos antes mencionados impedirá su inclusión como voluntario del estudio.

Los resultados del examen médico y de todos los análisis de laboratorio que se le hayan realizado, serán confidenciales, aun cuando no pueda participar como voluntario. A los efectos de que conozca los exámenes que le serán practicados para evaluar su aptitud de ingreso como voluntario del presente ensayo clínico, se ha agregado al final de esta información los formularios correspondientes.

Dentro de los análisis que se le harán, se investigarán drogas de abuso. Esta información también se manejará confidencialmente. No podrá participar en este ensayo clínico si alguno de los resultados está fuera del rango utilizado en los criterios de inclusión.

Por favor, comuníquese al médico investigador si ha sufrido alguna enfermedad, si recibe algún tratamiento medicamentoso, así como cualquier antecedente que Ud. considere de interés. Recuerde que, la ingesta de hierbas medicinales y preparaciones farmacéuticas de cualquier tipo, sean para corregir disfunciones sexuales, para evitar embarazos, para complementar la dieta, u otras finalidades, podrían alterar los resultados del estudio. Por lo tanto se exhorta comunicarlo al Investigador Médico.

El costo de la medicación utilizada en el estudio, así como los gastos de los procedimientos del mismo, incluyendo los análisis de laboratorio, y cualquier examen médico, estarán a cargo de los responsables de esta investigación.

a) Duración

El estudio se llevará a cabo en 2 oportunidades, cada una con una duración de 10 días, y separadas por 5 días antes del comienzo del segundo tratamiento. La duración total del ensayo será de 28 días, período que incluye la administración del fármaco en sus dos modalidades y los respectivos tiempos de lavado que aseguran el retorno a las condiciones basales previo a su ingreso en el estudio.

b) Tratamiento

Usted recibirá en primer lugar el *Tratamiento A* o el *Tratamiento B* con Fenitoína en cada una de las oportunidades, según una secuencia aleatoria adjudicada a cada voluntario en la primera semana (igual número de sujetos reciben *Tratamiento A* y *Tratamiento B*). En la segunda ocasión, los sujetos que hayan recibido el *Tratamiento A* recibirán el *Tratamiento B* y viceversa

El *Tratamiento A*, consistente en una dosis oral de 600 mg de Fenitoína cada 3 días, durante 10 días. En total, usted recibirá 4 dosis (1er, 4o, 7o, 10o día del período). Cada dosis consistirá en 200 mg con 200 mL de agua a la hora 08:00, seguido de igual administración a la hora 10:00, y seguido de una tercera e igual administración a la hora 12:00.

El *Tratamiento B*, consistente en una dosis oral de 100 mg de Fenitoína cada 12 horas, durante 10 días. En total, usted recibirá 20 dosis de 100 mg (horas 08:00 y 20:00) junto a 100 mL de agua.

c) Muestreo

Muestras Salivales

Durante el primer/segundo día de cada período usted tomará muestras salivales a las 20:00 (día 1) y 08:00 (día 2).

Durante el décimo día de cada período tomará muestras salivales a los siguientes tiempos reloj: 08:00 (inmediatamente antes de administrarse Fenitoína), 09:00, 10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 18:00, 20:00, 21:00, 22:00, 23:00, 24:00, 08:00. Se continuará muestreando saliva cada doce horas durante el día 11 hasta el día 14 de cada período: 08:00, 20:00; 08:00, 20:00; 08:00, 20:00; 08:00.

Extracción de muestras salivales:

A cada voluntario se le entregarán la cantidad necesaria de tubos, debidamente rotulados, para extracción de las muestras así como las correspondientes porciones de ácido cítrico para estimular la salivación.

Usted colocará el ácido cítrico contenido en los tubos cónicos sobre la lengua y esperará 5 segundos antes de verter la muestra en el tubo correspondiente. El volumen de la muestra no deberá ser mayor de 1 mL (Fracción S1). Descarte la saliva remanente (tragando o escupiendo) y repita el procedimiento para obtener una segunda muestra (Fracción S2), la cual será recogida en otro tubo.

Muestras sanguíneas

Durante el primer/segundo día de cada período se le tomarán muestras sanguíneas, en forma simultánea al muestreo salival: 20:00 (día 1) y 08:00 (día 2).

Durante el décimo día de cada período, y durante el undécimo hasta el décimo cuarto día, se le realizarán extracciones sanguíneas a los siguientes tiempos reloj:

DÍA 10: 09:00, 10:00, 11:00, 12:00, 13:00, 14:00, 15:00, 16:00, 18:00, 20:00, 21:00, 22:00, 23:00, 24:00, 08:00.

DÍAS 11; 12; 13; 14: 08:00, 20:00; 08:00; 08:00; 08:00.

d) Internación

Usted se internará en dependencias del CEBIOBE los días 1 y 10 de cada período, permaneciendo allí para recibir la alimentación, dosis, y para extracciones de muestras según lo indicado en el protocolo precedente, desde la hora 07:00 hasta la hora 08:00 del día 2 y 11 respectivamente. Las muestras sanguíneas previstas para los días 11, 12, 13, y 14, serán también extraídas en el CEBIOBE, y por tanto deberá volver a sus instalaciones 30 minutos antes de las horas indicadas.

Mientras se encuentre internado en la unidad clínica, será continuamente supervisado por el médico. Aún cuando la probabilidad de algún suceso riesgoso para su salud es muy baja, el Centro cuenta con sala de reanimación y acceso a Unidad de Cuidados Intensivos si fuera requerido.

Las muestras salivales previstas a horas donde usted no permanezca internado en el CEBIOBE, serán tomadas domiciliariamente siguiendo las instrucciones brindadas más arriba.

e) Alimentación

El primer día de cada período arribará al CEBIOBE (hora 07:00) con un ayuno no menor a ocho horas, recibiendo luego a la hora 07:30 un desayuno, previo a la administración correspondiente de la hora 08:00. Al mediodía (hora 12:00) almorzará, y luego cada 4 horas recibirá merienda (16:00) y cena (20:00) respectivamente. Cuando esté bajo tratamiento B cenará a las 19:30, y a la mañana siguiente desayunará a las 07:30. Cuando esté bajo tratamiento A tomará la tercera dosis de fármaco a la hora 12:00, y almorzará posteriormente.

El décimo día de cada período los repetirá exactamente el mismo programa establecido para las primeras 24 horas del período (intervalo 07:30 – 07:30) en cuanto a la alimentación.

El tipo de comida durante el ensayo será la estipulada por el protocolo. Todas las comidas serán iguales para todos los voluntarios, e iguales en cada etapa del estudio. Durante la internación solo podrá ingerir alimentos y líquidos que le sean administrados por el personal que conduce el estudio. Recibirá comida balanceada (desayuno, almuerzo, merienda y cena, a las horas estipuladas por protocolo).

f) Riesgos y posibles molestias

Este estudio no pretende mejorarle su salud sino recabar información sobre los distintos tratamientos ensayados con el fármaco de estudio. Su participación en este estudio no resultará en beneficio personal.

La Fenitoína es un fármaco que se está administrando hace muchos años con buena tolerancia en términos generales, por lo que la probabilidad de experimentar otras reacciones adversas impredecibles es muy baja. Sin embargo, como con cualquier otro fármaco, esta posibilidad tiene que ser comentada.

Debe tener presente que la Fenitoína es un fármaco inductor del metabolismo de diferentes sustancias, entre ellas de las hormonas que regulan su ciclo menstrual. Por consiguiente si usted es mujer y toma anticonceptivos deberá durante este período de ensayo adicionar un método anticoncepcional de barrera.

Debido a los procedimientos de la extracción de sangre, es posible que ocurran ciertas molestias tales como dolor local leve (por hematoma o flebitis) que dependen de la colocación de la aguja o catéter. Para minimizar el dolor y el traumatismo de la reiterada punción con aguja, se le colocará una vía de extracción fija en una vena de su brazo, y éste se mantendrá durante las primeras 24 horas del estudio, período en el cual es necesario tomar muestras de forma repetida. Las muestras de las 36 (día 11), 48 (día 12), 72 (día 13) y 96 (día 14) horas se tomarán por punción directa de la vena. De todas formas, usted debe saber que el personal de enfermería a cargo de las extracciones posee una amplia experiencia en este tipo de procedimientos. Ud. estará todo el tiempo bajo vigilancia médica y con todo el soporte necesario para tratar cualquier complicación no previsible que pudiera sucederle.

g) Directivas

Estará prohibido fumar durante los períodos de internación. No le estará permitido comer desde al menos 8 horas antes de recibir el desayuno en las instalaciones del Centro.

Durante todo el estudio no deberá tomar ningún medicamento. En el caso de experimentar algún malestar no podrá usted ingerir ningún medicamento sin previa consulta al Investigador Médico presente. Recuerde, en el caso de ser

mujer, que no deberá embarazarse durante el período que dure su permanencia en el estudio, y que los métodos de barrera son los más eficientes cuando está recibiendo fármacos inductores metabólicos como la Fenitoína.

Tampoco deberá tomar bebidas que contengan cafeína u otras xantinas (mate, café, té, bebidas cola, chocolate) los días en los que este internado. El resto de los días el voluntario podrá consumir mate (utilizando yerba libre de otras hierbas) y café en forma libre. El té estará prohibido durante todo el tiempo que dure el estudio. Tampoco estarán permitidos jugos de fruta, así como refrescos que los contenga.

Es importante informar inmediatamente al médico acerca de cualquier malestar que Ud. pudiera sufrir durante todo el curso del estudio (tanto antes como después que se le haya administrado cualquiera de los medicamentos a ensayar).

Una vez terminadas las dos etapas se lo convocará para realizar exámenes clínico y de laboratorio a los efectos de comprobar su estado de salud y darle el alta de su participación en el estudio. Aquellos valores de laboratorio que se encuentren por fuera del rango clínicamente aceptable, se repetirán hasta que vuelvan a los valores de base o, de acuerdo a lo que el investigador médico a su juicio considere.

9. Compensación por daños

El Centro, a través de su personal clínico, ha tomado seguros para compensar lesiones que Ud. pudiera sufrir como consecuencia de la administración del fármaco y/o de los procedimientos realizados. De esta manera se le garantiza a Ud., que recibirá tratamiento y atención médica de forma gratuita, ante cualquier manifestación debido a la administración de la medicación.

Estos seguros son contratados con el BSE en el momento del reclutamiento de los voluntarios

Si Ud. sufriera algún Evento Adverso Serio se lo atenderá gratuitamente en el Hospital Español “Dr. Juan José Crottogini” (Garibaldi 1729, Montevideo), o en su defecto en cualquier centro de atención a la salud de la red nacional pública y privada.

10. Compensación financiera

Usted no recibirá compensación financiera por la participación en este estudio. No obstante podrá ser compensado por la pérdida de jornales de trabajo y/o tiempo de su actividad privada si las hubiere.

11. Confidencialidad

Sus datos personales se manejarán de forma confidencial por el Investigador Principal, Investigadores Médicos, y la Autoridad Sanitaria que revisara este protocolo. Todas estas personas están obligadas por una declaración de confidencialidad por lo cual su privacidad será respetada en todo momento. Su identificación no aparecerá en ningún informe ni publicación resultante de este estudio.

12. Participación y retiro

Su participación en este estudio es voluntaria. Si Ud. decide participar, aún sigue siendo libre de retirar su consentimiento en cualquier momento. Esta decisión no tendrá repercusión alguna en la atención médica que eventualmente pudiera requerir. Los Investigadores Médicos también podrán aconsejar la discontinuación de su participación, si pensaran que esto es mejor para Usted. En el momento en que se interrumpa su participación en el estudio, deberá someterse a los procedimientos de terminación, incluyendo exámenes físicos, de sangre y orina; esto es por su propia seguridad.

Finalmente, esperamos que Ud. se ajuste a las reglas e instrucciones que se le indicarán durante el curso del estudio. Esto es muy importante por su propio bienestar, así como para asegurar el éxito y la utilidad de los resultados. Si por

alguna razón Ud. no puede cumplir con alguna de las instrucciones, se le solicita que lo comunique inmediatamente.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Consentimiento

He leído el texto precedente y he entendido cabal y completamente la naturaleza y el propósito del estudio que se realizará en el CEBIOBE, en mi carácter de voluntario para participar en el mismo. He tenido la oportunidad de hacer preguntas adicionales con relación al mismo y he recibido contestaciones satisfactorias, recibiendo información suficiente para poder decidir sobre mi participación.

Entiendo la razón por la cual se recabarán, procesarán y usarán los datos resultantes del presente ensayo clínico. Estoy de acuerdo con la obtención, procesamiento y uso de estos datos personales de acuerdo a lo descrito en el texto precedente. Me han explicado que la firma de este consentimiento no significa la pérdida de los derechos que legalmente me corresponden.

Basándome en esta información, acepto voluntaria y libremente participar en el estudio, comprendiendo que puedo retirarme del mismo en cualquier momento sin mediar justificación. Asimismo, acepto que el Investigador Médico podría tomar la decisión de retirarme del estudio, si estimara que por razones de salud no debiera continuar en el mismo.

Persona a contactar

Si Ud. tuviera más preguntas antes, durante o luego del estudio, o se sintiera mal durante el período en que no se encuentra internado, siempre tendrá la posibilidad de discutir las personalmente o por teléfono con los Investigadores Médicos, Dr. Alejandro Goyret, teléfono 094232637; Dra. Silvia Ruiz, teléfono 094 177 667

Firmas:

Nombre y Apellido

Firma

Voluntario: _____
Escrito de puño y letra del voluntario

Nº de C.I:

Fecha

/__/__/__

.....

Nombre y Apellido

Firma

Testigo: _____
Escrito de puño y letra del testigo

Nº de C.I:

Fecha

/__/__/__

.....

Nombre y Apellido

Firma

Investigador: _____
Escrito de puño y letra del investigador

Nº de C.I.:

Fecha
/ ____ / ____ / ____ /

REVOCACIÓN

Por este acto revoco mi voluntad expresada anteriormente.

Montevideo, fecha: /___/___/___/

Firma.....

Aclaración de firma.....

Persona a contactar

Si Ud. tuviera más preguntas antes, durante o luego del estudio, o se sintiera mal durante el período en que no se encuentra internado, siempre tendrá la posibilidad de discutirlos personalmente o por teléfono con los Investigadores Médicos, Dr. Alejandro Goyret, teléfono 094232637; Dra. Silvia Ruiz, teléfono 094 177 667



FORMULARIOS DE EVALUACIÓN DE APTITUD FÍSICA Y BIOQUÍMICA PARA SER VOLUNTARIO EN EL PROYECTO:

“Ensayo Clínico para Demostrar la Inducción de Transportadores de Membrana en la Respuesta Farmacocinética No Lineal y en el Desarrollo de Tolerancia a La Respuesta Antiepiléptica Durante Tratamientos Crónicos con Fenitoína”

NOMBRE Y APELLIDO:

CÉDULA DE IDENTIDAD:

DOMICILIO:

TELÉFONO DOMICILIO:

CELULAR:

EDAD:

PESO:

MUTUALISTA Y E.M.:

ANTECEDENTES

1.1 PERSONALES Y FAMILIARES SOBRE LAS SIGUIENTES PATOLOGÍAS


HEPÁTICAS:

RENALES:

PULMONARES:

GASTROINTESTINALES:

HEMATOLÓGICAS:

 <p>CE BIOBE</p>	<p>ANEXO VII FICHA DE APTITUD FISICA Y BIOQUIMICA DEL VOLUNTARIO</p>	<p>PROTOCOLO -2011</p> <p>Página 96 de 2</p>
---	---	---

1.2 HÁBITOS

FUMADOR:

BEBEDOR:

BEBIDAS CON XANTINAS:

1.3 MEDICACIÓN CRÓNICA

ANTICONCEPTIVOS:

OTROS MEDICAMENTOS RECIBIDOS EN LOS ÚLTIMOS 15 DÍAS

EXÁMEN MÉDICO:

Estado General:

Estado Cardiovascular:

Estado Neurológico:

ELECTROCARDIOGRAMA:



ANEXO VII
FICHA DE APTITUD FISICA Y
BIOQUIMICA DEL VOLUNTARIO


PROTOCOLO -2011

Página 97 de 2

ANÁLISIS EN SANGRE

UREA

Creatinina	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻
Fosfatasa alcalina	GOT sérica	GPT sérica	Gamma GT	
Bilirrubina total		Bilirrubina directa		
Proteína total		Albúmina		
Lipidograma		Amilasemia		
Hematíes		Leucocitos	Plaquetas	
Glucosa	Azoemia	Hematocrito	Crisis	
VES		VIH		VDRL
FORMULA LEUCOCITARIA				

	ANEXO VII FICHA DE APTITUD FISICA Y BIOQUIMICA DEL VOLUNTARIO	PROTOCOLO -2011 Página 98 de 2
---	--	--

ANÁLISIS EN ORINA

DENSIDAD:

pH:

PROTEÍNAS:

GLUCOSA:

CETONAS:

ESTUDIO DE SEDIMENTO:

TEST DE EMBARAZO:

DROGAS DE ABUSO:

FECHA:

MÉDICO:

FIRMA Y CONTRAFIRMA

Anexo VI: Dosificación de fenitoína y p-hidroxifenildantoína en plasma y fenitoína en saliva

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación de Fenitoína en plasma y en saliva. Para las muestras plasmáticas se incluye la determinación simultánea de su principal metabolito, para-hidroxifenilhidantoína.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Área Analítica del CEBIOBE.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE.

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

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

Agua: Agua calidad HPLC (destilada y filtrada por 0.45 um)

DFH: Fenitoína

DFH sódica: sal sódica de DFH. Contiene un 92.0 % del analito como tal.

p-HPPH: para-hidroxifenilhidantoína

NTZ: Nitrazepam

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

MeOH: Metanol calidad HPLC.

LLOQ: Límite inferior de cuantificación (Lower Limit Of Quantification)

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de soluciones

5.1.1 *Solución Fase Móvil (para retomar residuo seco en proceso de extracción)* Tomar con material graduado 43 mL de agua, 10 mL de ACN y 47 mL de MeOH y mezclar en un recipiente adecuado.

5.1.2 *Solución de Estándar Interno.* Pesar en forma exacta aproximadamente 40 mg de NTZ estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol utilizando un matraz aforado, generando N₀ (800.0 mg/L). Tomar 0.5 mL de dicha solución con pipeta automática y llevar a 25 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 16.00 mg/L de NTZ (N₁).

5.1.3 *Soluciones stock DFH para análisis en plasma.* Pesar en forma exacta aproximadamente 26.5 mg de DFH sódica estándar, disolver y llevar a 50 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 487.5 mg/L de DFH (SOLUCIÓN A'). Tomar 1 mL de A' con material aforado y llevar a 10 mL con MeOH en matraz aforado a fin de obtener una concentración de DFH aproximada de 48.75 mg/L (SOLUCIÓN B').

5.1.4 *Solución stock DFH para análisis en saliva.* Pesar en forma exacta aproximadamente 20.0 mg de DFH sódica estándar, disolver y llevar a 10 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de DFH de 1840.0 mg/L (SOLUCIÓN S1). Tomar 1 mL de S1 con material aforado y llevar a 25 mL con Agua en matraz aforado a fin de obtener una concentración de DFH aproximada de 73.6 mg/L (SOLUCIÓN S2).

5.1.6 *Solución stock p-HPPH:* Pesar en forma exacta aproximadamente 15 mg de p-HPPH estándar y llevar a 25 mL con MeOH en matraz aforado. Tomar 1 mL de solución y llevar con MeOH a 10 mL en matraz aforado obteniendo una concentración aproximada de 60 mg/L de p-HPPH (SOLUCIÓN MA). Tomar 2 mL de solución MA y llevar con MeOH a 10 mL en matraz aforado para obtener una solución de concentración aproximada de p-HPPH de 12mg/L (SOLUCIÓN MB).

5.1.7 *Soluciones Plasmáticas estándar para curva de calibración:* a 10 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando micropipeta la solución metanólica especificada en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Nombre Solución	Volumen a cargar en 10 mL de plasma	Concentración DFH (mg/L)	Concentración p-HPPH (mg/L)
A	500 µL A' + 500 µL MA	22.16	2.81
B	300 µL A' + 300 µL MA	13.80	1.72
C	200 µL A' + 100 µL MA	9.47	0.59
D	100 µL A' + 200 µL MB	4.73	0.23
E	500 µL B' + 100 µL MB	2.30	0.12
F	100 µL B' + 50 µL MB	0.48	0.06

5.1.8 *Soluciones Salivales estándar de DFH para curva de calibración:* la misma se realizará en Agua, debido a que la misma no presenta diferencias significativas a nivel de cromatograma con la saliva. Las diluciones se realizan con material aforado.

Nombre Solución	Elaboración	Concentración DFH (mg/L)
SA	1 mL de S2 + 10 mL de Agua	6.691
SB	0.5 mL de S2 + 10 mL de Agua	3.505
SC	0.25 mL de S2 + 10 mL de Agua	1.795
SD	0.1 mL de S2 + 10 mL de Agua	0.7287
SE	0.1 mL de S2 + 20 mL de Agua	0.3662
SF	0.05 mL de S2 + 20 mL de Agua	0.1835

5.2 Tratamiento de muestras plasmáticas

- m) Tomar 500 µL de muestra con pipeta automática.
- n) Agregar 50 µL de solución de estándar interno utilizando jeringa de vidrio. La concentración resultante de estándar interno es de 1.6 mg/L.
- o) Agitar en vórtex durante 10 segundos

- p) Agregar 3 mL de acetato de etilo utilizando material graduado.
- q) Agitar en vórtex durante 1 minuto.
- r) Centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 3000 rpm.
- s) Tomar la fase orgánica (superior) con pipeta pasteur y colocarla en un tubo de centrifuga.
- t) Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40°C.
- u) Retomar el residuo con 100 µL de solución fase móvil.
- v) Agitar mediante vórtex durante 10 segundos.
- w) Tomar la solución y trasvasarla a vial de inyección mediante pipeta pasteur o micropipeta.
- x) Inyectar 20 uL en HPLC bajo las condiciones descriptas en 5.5.

5.3 Tratamiento de muestras salivales

- a) Tomar 500 µL de muestra con pipeta automática.
- b) Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos de manera de favorecer sedimentación de mucinas.
- c) Realizar pasos b) a l) de la sección 5.2.

5.4 Preparación curva de calibración para análisis de muestras.

Realizar el tratamiento de muestras por duplicado de cuatro a seis de los niveles de soluciones estándar.

5.5 Preparación de soluciones plasmáticas estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras de voluntarios y para la determinación de parámetros para la validación de la técnica analítica. Se deberán realizar 3 controles de concentración (3 veces el LLOQ, 50 % y 75 % del rango de calibración) para obtener los controles bajo (B), medio (M) y alto (A) respectivamente

5.5.1 Soluciones metanólicas:

- DFH₁: pesar en forma exacta aproximadamente 34.0 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 50 mL. Concentración DFH₁ = 0.6256 mg/mL.

- DFH₂: pesar en forma exacta aproximadamente 22.4 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 50.0 mL. Concentración DFH₂ = 0.4122 mg/mL.
- DFH₃: pesar en forma exacta aproximadamente 28.50 mg de DFH estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 10.0 mL (SOLUCIÓN DFH₃₀=2.622 mg/mL). Tomar 0.5 mL y llevar a 25 mL con material aforado. Concentración DFH₃ = 0.05244 mg/mL.

5.5.2 *Soluciones plasmáticas control*: a 10 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando material aforado las soluciones metanólicas especificadas en la tabla. Homogeneizar.

Nombre Solución	Plasma cargado con:	Concentración (mg/L)
P1	300 uL de DFH ₁	18.22
P2	300 uL de DFH ₂	12.00
P3	300 uL de DFH ₃	1.527

5.6 *Preparación de soluciones salivales estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras de voluntarios y para la determinación de parámetros para la validación de la técnica analítica.*

5.6.1 *Soluciones Metanólicas*

- DFH_{s1}: pesar en forma exacta aproximadamente 24.00 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 10 mL (SOLUCION DFH_{s10}= 2.208 mg/mL). Tomar 1 mL de dicha solución y llevar a 10 mL con MeOH obteniendo la solución final. Concentración DFH_{s1} = 0.2208 mg/mL.
- DFH_{s2}: pesar en forma exacta aproximadamente 15.30 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 10 mL (SOLUCION DFH_{s20}= 1.408 mg/mL). Tomar 1 mL de dicha solución y llevar a 10 mL con MeOH obteniendo la solución final. Concentración DFH_{s2} = 0.1408 mg/mL.
- DFH_{s3}: pesar en forma exacta aproximadamente 30.00 mg de DFH sódica estándar y disolver con MeOH en matraz aforado de 50 mL (SOLUCION DFH_{s30}= 0.5520

mg/mL). Tomar 1 mL de dicha solución y llevar a 10 mL con MeOH obteniendo la solución final. Concentración DFH₃ = 0.05520 mg/mL.

5.6.2 *Soluciones salivales control*: a 50 mL de agua tomados con pipeta aforada agregar utilizando material aforado las soluciones metanólicas especificadas en la tabla. Homogeneizar.

Nombre Solución	Volumen para cargar en 50 mL de Agua	Concentración (mg/L)
SA	500 uL de DFH ₁	2.186
SB	500 uL de DFH ₂	1.394
SC	500 uL de DFH ₃	0.5465

5.7 Condiciones Cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.

Columna: C18 Phenomenex Luna (15 cm x 4.6 mm, 5 µm) o similar.

Detector: UV de arreglo de diodos, Dionex DAD-3000.

Fase móvil: Agua: ACN: MeOH (43:47:10).

Flujo: 1.0 mL/min.

Longitud de onda: 220 nm.

Temperatura de horno de columna: 40 °C

Temperatura de compartimento de muestras: 5 °C

5.8 Tiempos de Retención

p-HPPH - 3.5 minutos

DFH - 4.5 minutos

NTZ (E.I) - 6 minutos

5.9 Cálculos

Se determinarán las concentraciones de DFH utilizando como variable independiente la relación de áreas que presente respecto al NTZ en el cromatograma. El modo de calibración

a usar será lineal forzado por cero, y la pendiente a utilizar resultará de la curva de calibración elaborada el día de la dosificación.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DE LA BALANZA

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL HPLC

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL VORTEX

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL BAÑO SECO

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL pH-METRO

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DE LA CENTRÍFUGA REFRIGERADA

Anexo VII: Procedimiento y técnica analítica para ensayo de disolución de especialidades farmacéuticas conteniendo fenitoína

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de un método normalizado para la realización del perfil de disolución de las formas farmacéuticas test y referencia en agua destilada de manera de poder comparar los perfiles del Test y la Referencia.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica a comprimidos y cápsulas conteniendo Fenitoína 100 mg dentro del Área Analítica del CEBIOBE.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE.

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

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

DFH: Fenitoína

MeOH: Metanol

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Descripción del método.

Se realiza el ensayo de disolución retirando muestras a los tiempos especificados.

Se determinan las concentraciones del fármaco en las muestras mediante espectrometría UV.

5.2 Disolución

5.2.1 Procedimiento

Condiciones del ensayo

Equipo para ensayo de disolución **Distek** Modelo 2100C configurado con bomba peristáltica Agilent modelo 89092EO

Aparato 2 USP: paletas

Sinkers para cápsulas

Velocidad de giro: 75 rpm

Volumen: 900 mL

Tiempo total del ensayo: 120 minutos para comprimidos y 30 minutos para cápsulas.

Tiempos de muestreo tentativos para comprimidos: 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 120 minutos.

Tiempo de muestreo para cápsulas: 5, 10, 15, 20, 30 minutos.

Temperatura: 37.0 ± 0.5 °C

Muestreadores de acero inoxidable Distek para paletas 900mL, provistos de filtros de 45 μ (Distek, filtros tipo disco internos) en línea con las celdas del espectrofotómetro y con recirculación.

Bomba Peristáltica: 60 segundos para cada muestreo. Luego 5 segundos de circulación inversa.

Celdas: multicelda 8 canales en línea. Camino óptico 0.1 cm.

5.2.2.1. Colocar 900 mL de agua destilada en cada uno de los 6 vasos a utilizar y verificar temperatura antes de comenzar el ensayo.

5.2.2.2: Pesar previamente los comprimidos y cápsulas a ensayar.

5.2.2.3: Programar el sistema con las condiciones de ensayo y los tiempos de muestreo.

5.2.2.4: Comenzar el programa de disolución midiendo un blanco al inicio.

5.3; Dosificación de las muestras por espectrometría UV

5.3.1: Soluciones estándar para curva de calibración y adecuabilidad del sistema.

5.3.1.1: *Solución estándar.* Pesar en forma exacta aproximadamente 14.00 mg de DFH, colocar todo en un matraz de 100.0 mL. Disolver con aproximadamente 25 mL de MeOH y llevar a volumen con agua destilada obteniéndose una concentración de 0.1400 mg/mL de DFH. Esta solución se denomina E1, corresponde al 125 % de la cantidad de principio activo contenida en un comprimido o cápsula disuelto en 900 mL. Esta solución se preparará por duplicado (E1A y E1B).

5.3.1.2: *Curva de calibración.* Realizar a partir de una de las soluciones E1 preparadas, las siguientes soluciones como se describe a continuación, diluyendo con agua destilada y utilizando material aforado.

Solución estándar E2: 20.0 mL de solución E1 se diluyen a 25.0 mL (Solución 100%).

Solución estándar E3: 15.0 mL de solución E1 se diluyen a 25.0 mL (Solución 75%).

Solución estándar E4: 10.0 mL de solución E1 se diluyen a 25.0 mL (Solución 50%).

Solución estándar E5: 5.0 mL de solución E1 se diluyen a 25.0 mL (Solución 25%).

Solución estándar E6: 1.0 mL de solución E1 se diluyen a 25.0 mL (Solución 5%).

Las soluciones estándar se cargaran en la multicelda de 8 canales del espectrofotómetro (equipo N° 19) de manera conjunta con medio de disolución como blanco, utilizando la bomba peristáltica. Se deja una celda sin utilizar. De esta manera se tendrá un estándar en cada celda para medir su absorbancia y construir la curva de calibración.

5.3.2: Evaluación y Adecuabilidad del sistema

Con las soluciones E1A y E1B calcular el factor de similitud (igual al cociente A/B de absorbancias de estándar multiplicado por el cociente B/A de masa pesada de estándar). El mismo debe estar comprendido entre 0.98 y 1.02. Para este ensayo se utilizara la celda manual de 1 cm de camino óptico.

5.4: Cálculos

Los cálculos son realizados automáticamente por el software del espectrofotómetro luego de ingresar la curva de calibración. Dado que se trabaja con un sistema cerrado no se realizan correcciones por volumen.

El sistema devuelve el porcentaje de principio activo disuelto para cada tiempo según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Disuelto en } t = \frac{C_t \times 90000}{25}$$

Siendo:

- C_t : concentración experimental en mg/mL calculada por el equipo a partir de la absorbancia medida y la curva de calibración.
- 90000 corresponde a multiplicar el volumen del vaso por 100.
- 100: mg de DFH declarados en cada comprimido.

5.5 Realizar este procedimiento para el test y para la referencia.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DE LA BALANZA

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL ESPECTROFOTOMETRO UV

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL pH-METRO

INSTRUCTIVO DE OPERACIÓN DEL EQUIPO DE DISOLUCIÓN

7. REGISTROS

Cuaderno de uso del espectrofotómetro UV

Cuaderno de uso de la balanza

Cuaderno de uso del pHímetro

Cuaderno de uso del equipo de disolución

Cuaderno de analista.

Anexo VIII: Análisis de polimorfismos rs1051740 y rs2234922 en el gen Epóxido Hidrolasa y del gen COMT.

5 ml de sangre fueron recolectados en tubos estériles con EDTA como anticoagulante y refrigerada a 4-8 °C hasta su procesamiento. El ADN genómico fue aislado partir de los glóbulos blancos utilizando el sistema de purificación de ADN Wizard® genomic kit de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Promega, USA).

Una vez purificado el ADN, se cuantificó por espectrofotometría UV (260/280 nm) en el equipo NanoQuant-Tecan y se diluyeron las muestras de DNA entre 3 a 20 ng para la determinación de EPHX1 y EPHX2 y entre 50 a 100 ng para la determinación de la COMT.

La genotipificación de EPHX1 Y EPHX2 se realizó mediante la técnica de PCR tiempo real (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) utilizando el sistema comercial TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay (Applied Biosystems USA) para la identificación de los SNPs (por sus siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphism) o polimorfismos de una sola base rs1051740 y rs2234922.

La genotipificación de COMT se realizó con una PCR convencional y secuenciación tipo Sanger. El producto de PCR se verificó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6 %, posteriormente la banda se escindió y purificó 5 µL del producto de PCR purificado fue secuenciado con uno de los iniciadores diseñado para la amplificación y el sistema de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencingt kit. Posteriormente, el producto de secuenciación con el sistema de purificación Big Dye X-Terminator kit (Life Technologies, USA), por último se corrió y analizó con el secuenciador ABI3500.