



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE
POSGRADO**

**“IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA POR
UPLC - MS/MS Y MOLECULAR POR PCR Y SU
APLICACIÓN EN MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA
Y FARMACOGENÉTICA DE CARBAMAZEPINA Y
TOPIRAMATO. ESTUDIO EN PACIENTES CON
EPILEPSIA”.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

Q.F.B MARÍA JOSÉ ALONSO CERDA

ASESOR

DRA. ROSA DEL CARMEN MILÁN SEGOVIA

COASESOR

DR. ILDEFONSO RODRIGUEZ LEYVA



Este trabajo fue realizado en:

- Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética en la Facultad de Ciencias Químicas
- Clínica de Epilepsia del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.



El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003382, Nivel en desarrollo. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 932778.

Este proyecto además fue ganador del Fondo Interinstitucional de Salud en el año 2019 otorgado por el COPOCYT.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**“IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA POR UPLC -
MS/MS Y MOLECULAR POR PCR Y SU APLICACIÓN EN
MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA Y FARMACOGENÉTICA
DE CARBAMAZEPINA Y TOPIRAMATO. ESTUDIO EN PACIENTES
CON EPILEPSIA”.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

Q.F.B MARÍA JOSÉ ALONSO CERDA

DIRECTOR

DRA. ROSA DEL CARMEN MILÁN SEGOVIA

CO-DIRECTOR

DR. ILDEFONSO RODRIGUEZ LEYVA

SINODALES

DRA. ROSA DEL CARMEN MILÁN SEGOVIA

DR. ILDEFONSO RODRIGUEZ LEYVA

DRA. SILVIA ROMANO MORENO

DRA. SUSANNA EDITH MEDELLÍN GARIBAY



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MAYO 2021

San Luis Potosí, S.L.P.

Mayo 20, 2021

Comité Académico del Posgrado
En Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente._

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría QFB. María José Alonso Cerda, titulada “Implementación de metodología analítica por UPLC-MS/MS y molecular por PCR y su aplicación en monitorizacon farmacocinética y farmacogenética de Carbamazepina y Topiramato. Estudio en pacientes con epilepsia”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 25 de mayo a las 11:00 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dra. Rosa Del Carmen Milán Segovia
Director de Tesis

Dra. Silvia Romano Moreno
Asesor

Dr. Ildefonso Rodríguez Leyva
Co-Director

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay
Asesor



DEDICATORIA

- A mí, por la paciencia, resistencia, perseverancia y ambición de crecer todos los días.
- A mi mamá por el apoyo incondicional a lo largo de los 25 años y por su cariño y amor incondicionales.
- A mí tía por ser siempre la cómplice perfecta.
- A Juan Alberto porque por él estoy aquí.
- A mis abuelos ya que a lo largo de mi vida me han enseñado valores y pasión por el trabajo. Abuelito un beso hasta el cielo.

“Donde termina el conocimiento, comienza la religión”

“La preparación es constante y quién no lo ejerza, está destinado al fracaso”

Agradecimientos

- A la Dra. Rosy y al laboratorio de Biofarmacia por la oportunidad que me brindaron de pertenecer a este equipo de trabajo desde licenciatura.
- A mi familia por el apoyo que siempre me han brindado en todos los aspectos de mi vida.
- Al equipo de laboratorio de Biofarmacia y Farmacia por capacitarme, apoyarme y siempre mostrarse con disponibilidad para enseñarme cosas que me eran totalmente necesarias.
- A Cris por ser siempre el respaldo y apoyo más cercano que tuve en este trayecto.
- A Ivette por convertirse en una buena compañera, cómplice y amiga. Por adentrarse conmigo en este proyecto y siempre dar lo mejor de sí.
- A Alan y Laura por ser los mejores foráneos y mejores compañeros de generación.
- A Tony por estar conmigo siempre desde hace 8 años, por llevarme comida, hacerme sentir mejor y por ganarse siempre todos los días el título de mejor amigo. ¡Te quiero por siempre!
- A Sherlyn, Ramses, Zulema y Cristian por ser mis amigos durante tanto tiempo y ahora ser mis colegas. Los admiro y los quiero.
- A Julia porque tengo plena fe en que serás mejor de lo que yo fui frente a nuestro querido grupo estudiantil, porque sé que vas a dejar huella. Gracias por permitirme ser tu amiga, tu cómplice y tu guía. Te quiero.
- A Chuy por llegar en la última parte de este trabajo, pero ser la persona más constante, dulce y cariñosa sobre el planeta. Te agradezco con el corazón tu paciencia, respeto, amor y admiración hacia mí. Espero poder contar contigo de aquí a que la vida me permita seguir respirando. Gracias por salvar mi cuarentena y llegar a darme todo ese amor que siempre necesité. Te amo.
- Camacho, gracias por todo. Eres de esas personas que a veces uno no entiende cómo funcionan y que pueden llegar a considerarse reservados, pero te agradezco de todo corazón tu apoyo incondicional en todo, por llegar a desvelarte conmigo en mis días de trabajo más largos, por siempre estar para mí cuando más te he necesitado. Te prometo que seguiremos vibrando alto.
- Omar, contigo no hay palabras. Fuiste, eres y serás un gran pilar en mi vida, siempre eres un gran apoyo para mí. Me sacas de mis errores, pero también me apoyas de forma incondicional, he llorado contigo, pero he reído aún más. Te agradezco todos y cada uno de los momentos que hemos vivido, la confianza y el cariño que me brindas todos los días. En especial te agradezco muchísimo el ánimo que me diste todos los días mientras realice este trabajo, no lo sabes,

pero muchas veces me diste la energía para continuar. Te admiro y te quiero por siempre.

- A todo ALPHA por déjame crecer en muchos aspectos que no creía que podía llegar a hacer, por permitirme seguir siendo parte de ustedes, seguiremos en la lucha hasta que la vida misma lo permita.
- A Poncho por aventurarse conmigo y permitirme ejercer la docencia de una forma diferente, por confiar en mí y darme una de las más grandes oportunidades de la vida para seguir formando alumnos.
- A mis niños de Casa y Taller Montessori por siempre enseñarme algo nuevo, darme energía y demostrarme que aún en la distancia se pueden generar nuevos lazos importantes.
- A todo el equipo de Lab. Tequis en Clínica del Parque por ser un gran equipo de trabajo, por ser grandes personas y tener muy claro que enseñar, también es crecer, por brindarme la oportunidad de crecer tanto en este último año y por confiar en mí.
- A todas las personas que de una u otra forma han estado pendientes de mí, de mi trabajo, mi salud y mi progreso como persona, profesionista etc. Mi más sincero agradecimiento de corazón.

Índice general

RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT	XVI
1. CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES.....	2
1.2.1 Epilepsia	2
1.2.2 Fisiopatología de la epilepsia	2
1.2.3 Tratamiento farmacológico	3
1.2.4 Carbamazepina.....	4
1.2.5 Estructura química y propiedades fisicoquímicas	4
1.2.6 Metabolismo de CBZ	5
1.2.7 Posología	6
1.3 Topiramato.....	6
1.3.1 Estructura química y propiedades fisicoquímicas	6
1.3.2 Metabolismo de TPM	7
1.3.3 Posología	8
1.3.4 Mecanismo de acción de FAE's	8
1.3.5 Farmacocinética de CBZ y TPM	9
1.4 VARIANTES POLIMÓRFICAS DE ENZIMAS DEL CYP450.....	10
1.5 Concomitancia CBZ-TPM.....	11
1.6 Monitorización farmacocinética de los niveles de CBZ y TPM	11
2. CAPÍTULO II	14
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	14
3. CAPÍTULO III	16
3.1 HIPÓTESIS	16
4. CAPITULO IV	17
4.1 OBJETIVOS.....	17
4.1.1 OBJETIVO GENERAL	17
4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17

5. CAPÍTULO V	18
5.1 METODOLOGÍA	18
5.1.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CBZ Y TPM EN PLASMA HUMANO	18
5.1.1.2 CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE CBZ Y TPM.....	18
5.1.2 CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN DE CBZ Y TPM POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	19
5.1.3 Pretratamiento de muestras sanguíneas para extracción de CBZ y TPM.....	19
5.2 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DEL MÉTODO POR UPLC-MS/MS PARA MEDIR CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CBZ Y TPM.	22
5.2.1 Selectividad.	22
5.2.2 Límite inferior de cuantificación y Límite de detección.	22
5.2.3 Curva de calibración.	22
5.2.4 Precisión.	23
5.2.4.1 Repetibilidad.	23
5.2.4.2 Reproducibilidad.	23
5.2.5 Exactitud.....	23
5.2.6 Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.	23
5.2.7 Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.	24
5.2.8 Estabilidad de la muestra.	24
5.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA POR PCR TIEMPO REAL PARA GENOTIPIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS CYP3A4*22, CYP3A4*3, CYP2C9*2, CYP2C19*2 Y CYP2C19*17	24
5.3.1 Extracción de ADN.....	24
5.3.2 Estandarización de la técnica de PCR tiempo real.....	25
5.4 ESTUDIO CLÍNICO	26
5.4.1 Criterios de selección de pacientes	26
5.4.1.1 Criterios de inclusión	26
5.4.1.2 Criterios de no inclusión	26
5.4.1.3 Criterios de eliminación	26
5.4.1.4 Toma de muestras sanguíneas.....	26
5.4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES PARA MONITORIZACIÓN DE CBZ-TPM Y GENOTIPIFICACIÓN.	27
5.4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6. CAPÍTULO VI	28
6.1 RESULTADOS	28
6.1.1 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR UPLC- MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CBZ Y TPM	28
6.1.1.1 Obtención de las transiciones para CBZ y TPM.....	28
6.2 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA LA SEPARACIÓN DE CBZ Y TPM EN PLASMA HUMANO POR UPLC-MS/MS	29
6.2.1 Efecto matriz y efecto de acarreo para métodos de espectrometría de masas	29

6.2.2	Selectividad	29
6.2.3	Determinación del límite inferior de cuantificación (LIC) y límite de detección (LDD).	32
6.2.4	Linealidad en plasma	32
6.2.5	Precisión	36
6.2.5.1	Repetibilidad	36
6.2.5.2	Reproducibilidad	36
6.2.6	Exactitud.....	36
6.2.7	Estabilidad	38
6.3	RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE GENOTIPIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 Y CYP2C19.	39
6.3.1	Extracción de ADN y técnica de genotipificación	39
6.3.2	Amplificación de sondas TaqMan para enzimas del CYP450 mediante PCR tiempo real	39
6.4	Estudio en pacientes con epilepsia tratados con CBZ y TPM	40
6.4.1	Características de los pacientes	40
6.4.2	Monitorización farmacocinética de niveles pre-dosis de CBZ y TPM en pacientes con epilepsia.....	41
6.4.3	Genotipificación de pacientes con epilepsia	44
6.4.4	Asociación estadística entre niveles plasmáticos pre-dosis de CBZ y TPM con el fenotipo metabolizador y con variables antropométricas de pacientes con epilepsia.....	46
6.4.5	Comparación entre concentraciones plasmáticas pre-dosis de CBZ y TPM con el fenotipo metabolizador de las enzimas CYP450.	47
6.4.6	Análisis multivariado de las concentraciones plasmáticas pre-dosis de cada FAE y las características antropométricas de los pacientes con epilepsia	50
7.	CAPÍTULO VII	51
7.1	DISCUSIÓN.....	51
8.	CAPÍTULO VIII	57
8.1	CONCLUSIONES.....	57
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE CBZ	4
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES MS/MS DE CBZ	5
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE TPM	7
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE TPM	7
TABLA 5. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE LOS FAE'S.....	9
TABLA 6. CLASIFICACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR PARA <i>CYP3A4</i> Y <i>CYP3A5</i>	10
TABLA 7. CLASIFICACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR PARA <i>CYP2C9</i> Y <i>CYP2C19</i>	11
TABLA 8. GRADIENTE DE ELUCIÓN PARA CBZ, TPM Y LEV	18
TABLA 9. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA OBTENCIÓN DE LAS TRANSICIONES DE CBZ Y TPM	19
TABLA 10. EFECTO MATRIZ Y DE ACARREO PARA CBZ Y TPM.....	30
TABLA 11. LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN, LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN PARA CBZ Y TPM.....	32
TABLA 12. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN POR TRIPLICADO PARA CBZ Y TPM EN PLASMA	33
TABLA 13. CONCENTRACIÓN Y PORCENTAJE RECUPERADO PARA CBZ Y TPM	35
TABLA 14. PRECISIÓN Y EXACTITUD EN TÉRMINOS DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CBZ Y TPM EN PLASMA POR UPLC-MS/MS	37
TABLA 15. RESULTADOS DE CICLOS CONGELACIÓN – DESCONGELACIÓN Y ESTABILIDAD A - 80°C CORTO PLAZO PARA CBZ Y TPM EN PLASMA.....	38

TABLA 17. PRUEBAS REALIZADAS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SONDAS TAQMAN	39
TABLA 18. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LOS PACIENTES CON EPILEPSIA	40
TABLA 19. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS CONCENTRACIONES PRE-DOSIS DE FAE'S ENTRE LOS GRUPOS DE PACIENTES CON EPILEPSIA.....	43
TABLA 20. RESULTADOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN PARA LAS ENZIMAS DEL CYP450 POR GRUPO DE ESTUDIO	45
TABLA 21. ANÁLISIS BIVARIADO ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS PRE-DOSIS DE CADA FAE Y EL FENOTIPO METABOLIZADOR DE LAS ENZIMAS CYP450	46
TABLA 22. MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL PARA CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CBZ Y TPM	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PORCENTAJE DE ABUNDANCIA DE LOS IONES DE CBZ (TOMADO DE PUBCHEM.COM)	5
FIGURA 2. METABOLISMO HEPÁTICO DE CBZ	6
FIGURA 3. METABOLISMO DE TPM Y SU INDUCCIÓN POR CBZ	8
FIGURA 4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FAE'S (TOMADA DE AUYIN 2014)	9
FIGURA 5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA TPM Y CBZ	21
FIGURA 6. EXTRACCIÓN DE ADN	25
FIGURA 7. CROMATOGRAMA TÍPICO PARA CBZ Y TPM EN ESTÁNDARES DE PLASMA FORTIFICADO.	28
FIGURA 8. CROMATOGRAMAS DE MUESTRAS BLANCO DE MATRIZ BIOLÓGICA.....	31
FIGURA 9. LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA CBZ Y TPM A PARTIR DE PLASMA	34
FIGURA 10. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS PRE-DOSIS DE A) CBZ, B) TPM Y C) LEV EN PACIENTES CON EPILEPSIA.	42
FIGURA 11. ASOCIACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA PRE-DOSIS DE TPM Y LA EDAD DE LOS PACIENTES DEL GRUPO TPM-LEV	47
FIGURA 12. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS MEDIAS DE TPM EN LA PRE-DOSIS SEGÚN EL FENOTIPO METABOLIZADOR CYP3A5*3, B) CYP2C19*17, C) CYP2C9*2.....	49

RESUMEN

La carbamazepina (CBZ), fármaco antiepiléptico (FAE) de primera línea, es ampliamente utilizado en crisis focales y generalizadas motoras tónico-clónicas por su eficacia; sin embargo, presenta amplia variabilidad en sus concentraciones plasmáticas (Cp). A pacientes con epilepsia focal refractaria a CBZ, es común adicionar Topiramato (TPM), fármaco de segunda línea que se metaboliza mediante *CYP2C9* y *CYP2C19*, enzimas que son inducidas por acción de CBZ. Para monitorizar los niveles de TPM y CBZ en plasma y evitar que sus Cp se encuentren debajo del margen de referencia, se requiere de un método analítico que cuantifique simultáneamente las Cp de ambos FAE's. Adicionalmente, es importante determinar la influencia de los polimorfismos genéticos de *CYP2C9* y *CYP2C19* con fines de seguimiento farmacoterapéutico en la concomitancia CBZ y TPM.

OBJETIVO: Implementar un método por UPLC-MS/MS para medir simultáneamente los niveles plasmáticos de CBZ y TPM e implementar las técnicas de PCR en tiempo real en la determinación de los polimorfismos genéticos de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19*, para su posterior aplicación en la evaluación del comportamiento farmacocinético de ambos FAE's en pacientes con epilepsia.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS OBTENIDOS: Se establecieron las condiciones de pre-tratamiento de las muestras plasmáticas para cuantificar CBZ y TPM. El método emplea una columna BEH Phenyl (2.1x100 mm; 1,7 μ m; 40°C), fase móvil de NH₄HCO₃ y ACN (95:5) y flujo de 0.3 mL/min. Los tiempos de retención fueron de 4.8 min para TPM y 5.0 min para CBZ. Las transiciones para TPM (ESI+) fueron 340.1>264.04>126.8 y para CBZ (ES+) 237.03>179.03>165. El método fue lineal, preciso y exacto en el intervalo de 0.6 a 20 μ g/mL para cada analito; se demostró ausencia de efecto de acarreo o efecto de matriz en el análisis de las muestras, con estabilidad durante 3 ciclos de congelación-descongelación y a corto plazo de dos días (NOM-177-SSA1-2013).

Se optimizó la técnica de PCR tiempo real para determinar los haplotipos de las enzimas asociadas al metabolismo de CBZ y TPM: *CYP3A4**22, *CYP3A5**3, *CYP2C9**2, *CYP2C19**2 y *CYP2C19**17. La temperatura de alineación fue 60°C y 50 ciclos de desnaturalización.

El estudio clínico observacional, prospectivo y transversal fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", no. 61-19. Participaron 45 pacientes con epilepsia en tratamiento con CBZ (n=22), CBZ-TPM (n=7) y TPM con levetiracetam (n=16). Se identificaron Cp de CBZ y TPM dentro y fuera de los intervalos de referencia en cada paciente y se analizó la posible influencia de factores antropométricos y genéticos. No se encontró diferencia significativa en las Cp de TPM en combinación con CBZ respecto al grupo de TPM y levetiracetam. Sin embargo, se observó 56% de disminución de TPM en plasma en presencia de CBZ, ello como resultado del posible efecto inductor de ésta en el metabolismo de TPM, aspecto que amerita ajuste de dosis.

Fue posible identificar una asociación estadística entre las Cp de TPM con el fenotipo metabolizador *CYP2C19**17 y *CYP2C9**2 (p=0.024, p=0.007, respectivamente, en los pacientes con CBZ-TPM. Se encontró que las Cp de CBZ y TPM varían de manera directa con la dosis administrada.

CONCLUSIONES. Se dispone de los métodos analíticos para aplicarlos en procedimientos de monitorización terapéutica y de genotipificación durante el tratamiento de pacientes con epilepsia. El presente estudio está limitado por el escaso número de pacientes en el grupo TPM-CBZ. Se debe continuar investigando los factores que determinan la amplia variabilidad de la farmacocinética de los FAE's, con la perspectiva de proponer estrategias para mejorar la terapia en pacientes con epilepsia.

PALABRAS CLAVE: UPLC-MS/MS, PCR tiempo real, farmacocinética, farmacogenética, CBZ, TPM, epilepsia.

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ), an antiepileptic drug (AED) of the first line, is used for its efficiency; but it must present high variability in its plasma concentrations (Cp). It is common to add Topiramate (TPM) in patients with refractory epilepsy to CBZ, and TPM is a drug of the second line and is metabolized from *CYP2C9*, and *CYP2C19* enzymes induced by CBZ. For the Therapeutic Drug Monitoring in plasma of TPM and CBZ and to avoid the Cp are under the therapeutic range, an analytic method for quantifying the Cp of both AED's at the same time is necessary. Further, it is important to determine the influence of genetic polymorphisms of *CYP2C9* and *CYP2C19* with purposes of therapeutic follow-up in the combination of CBZ y TPM.

OBJECTIVE: To implement a method by UPLC-MS/MS to measure the plasmatic levels of CBZ y TPM simultaneously and to implement the techniques of real-time PCR for the determination of genetic polymorphisms of *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19*, for its application by the test about the pharmacokinetic behavior of both AED's in patients with epilepsy.

METHODS AND RESULTS: It was established the conditions for pretreatment of plasma samples for quantifying CBZ and TPM. The method uses a BEH Phenyl (2.1x100 mm; 1,7 μ m; 40°C) column, a mobile phase of NH₄HCO₃ y ACN (95:5), and a rate of 0.3 mL/min. The retention time was 4.8 min for TPM and 5.0 min for CBZ. The transitions for TPM (ESI+) was 340.1>264.04>126.8 and for CBZ (ES+) 237.03>179.03>165). The method was linear, precise, and exact of 0.6 to 20 μ g/mL interval for each analyte; it was demonstrated absence carry-over effect or matrix effect in the simple analysis, with three cycles of freezing-defrosting of stability and two days to short term (NOM-177-SSA1-2013). It was optimized the real-time PCR technique to determine the haplotypes by the enzymes associated with the metabolism of CBZ and TPM: *CYP3A4**22, *CYP3A5**3, *CYP2C9**2, *CYP2C19**2 y *CYP2C19**17. The annealing temperature was 60°C and 50 cycles of denaturation.

The observational, prospective, and cross-sectional clinical study was approved for the Research Ethics Committee of Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto," number 61-19. In the study participated 45 patients with epilepsy were treated with CBZ (n=22), CBZ-TPM (n=7) y TPM with levetiracetam (n=16). Were identified Cp of CBZ and TPM in each patient inside and out of the therapeutic range and it was analyzed for the possible influence of anthropometric and genetic factors. They weren't identified significant differences in the Cp of TPM combined with CBZ concerning the TPM with the levetiracetam group. However, it was observed a decrease of 56% in levels of TPM in the presence of CBZ because of the possible inductor effect in the TPM metabolism, an aspect that deserves dose adjustment. It was possible to find a statistical association between Cp of TPM with metabolizer phenotype of *CYP2C19**17 y *CYP2C9**2 (p=0.024, p=0.007, respectively) in the patients with CBZ-TPM. It was found that the Cp of CBZ and TPM vary directly with administered doses.

CONCLUSIONS: We have analytical methods for applying Therapeutic Drug Monitoring and genotyping procedures in the treatment of patients with epilepsy. The present study is limited to the low number of patients in the CBZ-TPM group. We have

continued to research the determinant factors in the high variability in the AED's pharmacokinetics, with the perspective to propose strategies for a better therapy in patients with epilepsy.

KEY WORDS: UPLC-MS/MS, real time PCR, pharmacokinetics, pharmacogenetics, CBZ, TPM, epilepsy.

IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA POR UPLC MS/MS Y MOLECULAR POR PCR Y SU APLICACIÓN EN MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA Y FARMACOGENÉTICA DE CARBAMAZEPINA Y TOPIRAMATO. ESTUDIO EN PACIENTES CON EPILEPSIA.

1. CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La epilepsia es una enfermedad cerebral crónica considerada un problema mundial de salud pública que afecta a personas de todas las edades demandando así la atención prioritaria de los sistemas sanitarios de cada país. Para el año 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que existen alrededor del mundo más de 50 millones de personas con esta enfermedad. La incidencia anual de crisis epilépticas no provocadas es de 33 a 198 por cada 100,000 habitantes; se diagnostican alrededor de 2.4 millones de casos nuevos al año alrededor del mundo, con una tasa anual de mortalidad de 2.1 por cada 100,000 habitantes (1, 2).

Se estima que en México aproximadamente el 1.2% de la población padece epilepsia; entre el 70 y 80% de los pacientes reciben tratamiento farmacológico, sin embargo, cerca del 30% de estos pacientes presentan crisis refractarias ya que son farmacorresistentes y el 10% son candidatos a cirugía. La epilepsia y la farmacorresistencia generan condiciones de vida complicadas ya que esto repercute de manera directa en la calidad de vida del paciente (3, 4).

Entre los fármacos antiepilépticos (FAE's) más comúnmente usados y recomendados para el nivel primario de atención son el ácido valproico, la carbamazepina (CBZ), la fenitoína y el fenobarbital. Otros fármacos, como el clobazam, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, leviteracetam, oxcarbazepina, tiagabina, topiramato (TPM), vigabatrina y zonisamida son considerados como fármacos de segunda línea (1). En el ámbito clínico, con frecuencia se utilizan combinaciones de fármacos de primera y segunda línea con la finalidad de controlar las crisis epilépticas refractarias. Tal es el caso de TPM que se usa en concomitancia con CBZ en pacientes que no responden al tratamiento de primera línea; sin embargo, la dosis inicial y el ajuste deben realizarse en función de la respuesta clínica (5).

Está documentado que la concomitancia CBZ-TPM genera una interacción entre las enzimas encargadas del metabolismo de cada uno de estos fármacos, ocasionando que existan pacientes cuyas concentraciones plasmáticas se encuentren por encima o debajo del margen terapéutico establecido, llevando al fracaso terapéutico o a la posible intoxicación del paciente. Por lo anterior, se considera importante identificar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que codifican las enzimas metabolizadoras de CBZ y TPM, así como realizar la monitorización farmacocinética de estos fármacos

en cada paciente, con fines de describir una posible asociación entre ambos y su aplicación en el ajuste de dosis de cada FAE, incluso cuando se retira alguno de los fármacos (6, 7).

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 EPILEPSIA

La OMS y la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) han definido a la epilepsia como una afección crónica y recurrente de crisis paroxísticas, desencadenadas por descargas eléctricas anormales que tienen manifestaciones clínicas variadas y que se presentan de manera no provocada; es una enfermedad cerebral no transmisible crónica que afecta a personas de todas las edades (2, 8). Según el tipo de crisis, la epilepsia se clasifica en focal, generalizada y desconocida; las causas pueden ser diversas entre las que se incluyen los factores genéticos, estructurales (como ictus, traumatismo o tumor cerebral), infecciosos, metabólicos, del sistema inmune y desconocidos (9).

Las características de las crisis epilépticas varían y dependen en qué parte del cerebro comienza la alteración y cómo se propaga; pueden incluir síntomas temporales, como pérdida del conocimiento o la conciencia, y alteraciones del movimiento, de los sentidos (incluyendo visión, audición y gusto), estado de ánimo u otras funciones cognitivas (2).

Desde un enfoque sanitario y económico, la epilepsia repercute en la atención sanitaria por las muertes prematuras y la pérdida de productividad laboral que ocasiona. Frente a este difícil panorama de salud, se hace imprescindible el manejo integral del paciente con epilepsia tomando en cuenta el tratamiento farmacológico (2); del 70 al 80% de los pacientes están bajo tratamiento farmacológico, sin embargo, la falta de respuesta a la terapia compromete la calidad de vida debido a las crisis recurrentes, incrementando el riesgo por muerte súbita (3).

1.2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

La epileptogénesis es el proceso mediante el cual un grupo de neuronas desarrolla una excitabilidad exagerada y alcanza un estado en el que puede producir crisis epilépticas de forma espontánea. Los procesos moleculares que convergen a la aparición de estas alteraciones eléctricas dependen de los receptores neuronales, los cuales condicionan el flujo de iones, la transmisión sináptica y la comunicación intracelular (10).

La permeabilidad de la membrana neuronal le brinda la capacidad que da lugar a cambios rápidos que modifican la diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la célula. La neurona posee un potencial de reposo el cual se mantiene gracias a

su membrana en aproximadamente -54 mV, lo que permite que el Na⁺ fluya lentamente hacia el interior de la célula, mientras que el K⁺ fluye lentamente hacia el exterior; en este proceso participa la bomba Na⁺/K⁺. La salida de K⁺ y Cl⁻ lleva a la célula a una etapa de hiperpolarización mientras que la entrada de Na⁺ y Ca²⁺ lleva a la despolarización de la membrana neuronal (11).

Es importante señalar que existen dos tipos de neuronas: las presinápticas y las postsinápticas y a través de sus axones se transmite el potencial de acción llevando así el mensaje por el sistema nervioso. De manera simultánea, cuando la terminal presináptica de un axón es estimulada con la entrada de Ca²⁺, se genera la liberación de neurotransmisores. Dichos neurotransmisores se unirán a receptores específicos en la membrana postsináptica, generando así, potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) e inhibitorios (PPSI). Los neurotransmisores excitatorios del sistema nervioso central (SNC) son el glutamato (Glu) y el aspartato (Asp); mientras que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia (10, 11).

Lo anterior, constituye el proceso de transmisión de estímulos neuronales en una persona sana. En los pacientes con epilepsia, la cantidad de energía requerida para comenzar con la despolarización de la membrana es inferior, generando que las respuestas propagadas en el axón sean emitidas a una mayor velocidad, disminuyendo la actividad de neuronas inhibitorias y aumentando la actividad de las excitatorias, lo que desencadena descargas limitadas, breves y de alta frecuencia (11). De manera simultánea, hay disminución en la producción o liberación de GABA con decremento de la cantidad de sus receptores a nivel postsináptico provocando así, que estímulos pequeños generen la despolarización de la membrana. El incremento de excitabilidad a nivel postsináptico genera aumento en la liberación de Glu y Asp con la entrada acelerada de Ca²⁺ y formando el complejo Ca²⁺/Calmodulina. El proceso aumenta la liberación de neurotransmisores excitatorios lo que afecta la supervivencia de las neuronas (10).

1.2.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

La farmacoterapia es el elemento esencial del abordaje terapéutico de las personas con epilepsia. El tratamiento depende de la etiología, del tipo de crisis y de la presencia de factores precipitantes (5). Las metas del tratamiento pretenden prevenir las crisis, reducir los efectos adversos del medicamento y las interacciones medicamentosas, mejorar la calidad de vida del paciente y asegurar la satisfacción con el tratamiento recibido (1). El tratamiento generalmente comienza con monoterapia a base de fármacos de primera generación, tales como fenobarbital, CBZ, valproato, clonazepam, entre otros. Sin embargo, el 30% de los casos, presenta una epilepsia farmacorresistente o refractaria (ER) (5, 12).

Para tratar la ER se requiere de la adición de un FAE de segunda generación, por ejemplo, lamotrigina, TPM, levetiracetam (LEV), pregabalina, entre otros (9, 12). Sin embargo, la terapia concomitante aumenta la probabilidad de toxicidad o fracaso terapéutico, debido al aumento o disminución de las concentraciones plasmáticas de los fármacos como consecuencia de interacciones metabólicas, dado que la mayoría de los FAE's se metabolizan por enzimas CYP450 (13).

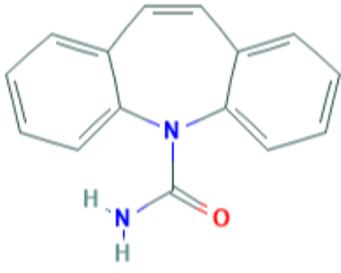
1.2.4 CARBAMAZEPINA

La CBZ es un fármaco tricíclico con propiedades antidepresivas, antiepilépticas y analgésicas; se emplea de primera elección para epilepsia focal y generalizada, y en el tratamiento en trastornos de conducta y afectivos. Aproximadamente 60% de los pacientes se encuentran medicados con este fármaco debido a su alta eficacia para la epilepsia (17).

1.2.5 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

La CBZ es un sólido cristalino, blanquecino, con peso molecular de 236.27 g/mol, punto de ebullición de 399.6°C y punto de fusión de 189 - 192°C. Es insoluble en agua, soluble en alcohol, acetona, propilenglicol, cloroformo, metanol, etanol y ácido acético glacial; muestra absorción UV a una longitud de onda de 210 nm. Otras características se presentan en la tabla 1 (18).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de CBZ

Nombre químico	5H-Dibenzo [b, f] azepina-5-carboxamida	Estructura molecular
Nombre genérico	Carbamazepina	
Fórmula condensada	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	
pKa 1	-3.8	
pKa 2	15.96	

La información espectral de CBZ como requerimiento para las técnicas analíticas por UPLC-MS/MS muestran que un ion molecular o precursor de 237.1 m/z, siendo la transición más abundante el fragmento de 194 m/z (tabla 2 y figura 1).

Tabla 2. Características espectrales MS/MS de CBZ

Instrumento	Trampa de iones	Abundancia de los iones (%)
Tipo de precursor	[M + H] ⁺	
Precursor (ion padre)	237.1 m/z	5
1° transición	194 m/z	100
2° transición	220 m/z	10

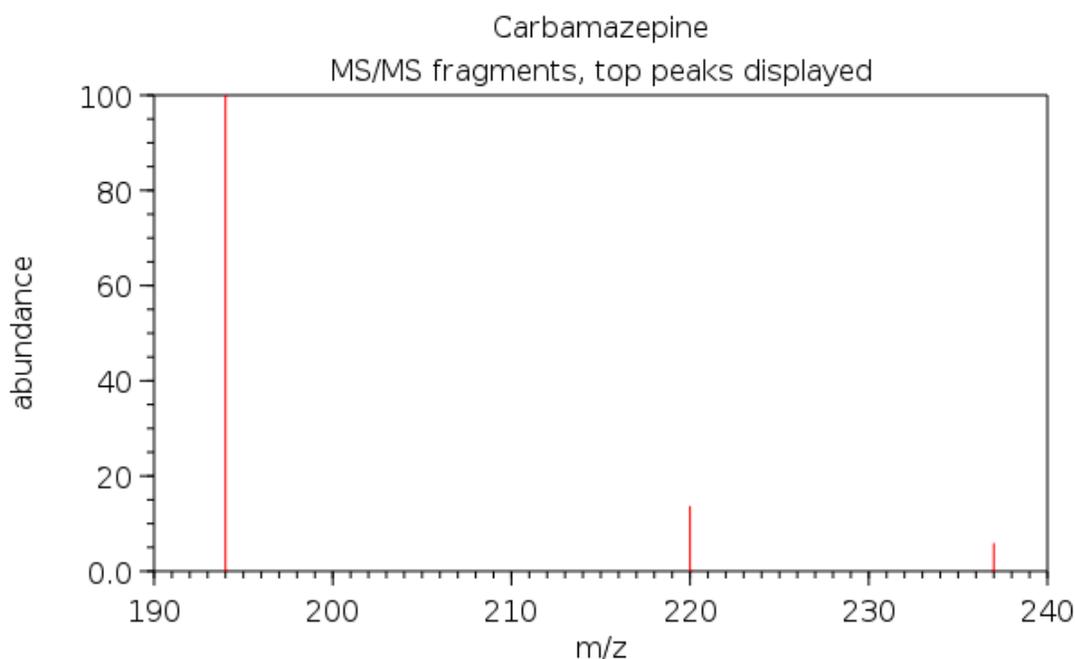


Figura 1. Porcentaje de abundancia de los iones de CBZ (tomado de PubChem.com)

1.2.6 METABOLISMO DE CBZ

CBZ se metaboliza en el hígado, principalmente por la enzima *CYP3A4*, formando un metabolito activo epóxido de CBZ (E-CBZ). Otras enzimas involucradas son: *CYP3A5*, *CYP2C8* y *CYP2B6*. La enzima *UGT2BT* metaboliza a CBZ mediante reacciones de glucuronidación para aumentar la polaridad de la molécula y que esta pueda ser eliminada por orina. Este FAE induce su propio metabolismo, alcanzando el equilibrio

dinámico 5 semanas después de la administración oral continua. En dicho caso, aumenta su aclaramiento, se reduce su vida media y sus concentraciones plasmáticas pueden quedar abajo del margen terapéutico (Figura 2) (18).

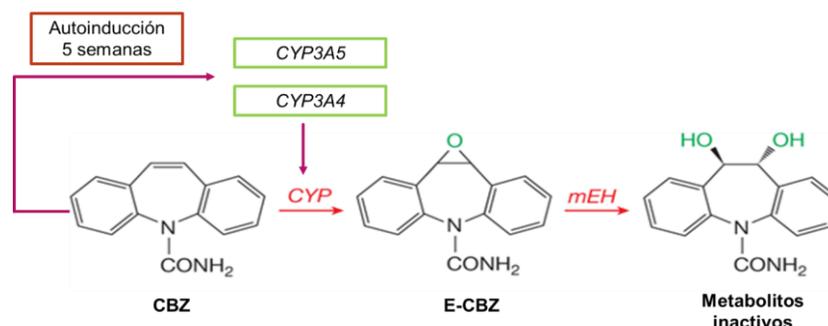


Figura 2. Metabolismo hepático de CBZ

1.2.7 POSOLOGÍA

En adultos y adolescentes la dosis inicial de CBZ es de 200 mg dos veces al día, con aumento progresivo de 200 mg/día en intervalos semanales hasta llegar a la dosis máxima. Cuando hay control correcto de la epilepsia las dosis máximas se deben reducir hasta la dosis mínima efectiva que oscila entre 800 y 1200 mg/día (generalmente calculamos la dosis a razón de 10 mg/kg de peso mínima a 20 mg/kg de peso máxima).

Las dosis diarias no deben superar los 1000 mg en adolescentes de 13 a 15 años y los 1200 mg en adultos, sin embargo, se han reportado pacientes que han requerido >1600 mg/día para contrarrestar las crisis refractarias (20).

1.3 TOPIRAMATO

TPM es un antiepiléptico de segunda línea para todo tipo de epilepsia; ha sido utilizado como tratamiento para otras enfermedades como la obesidad, hiperhidrosis y la migraña. El 10% de los pacientes epilépticos están tratados con TPM en concomitancia con otro FAE, principalmente CBZ (21).

1.3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

El TPM es un sólido cristalino de color blanco, con un peso molecular de 339.36 g/mol. Su punto de ebullición y de fusión es de 438.7°C y 125°C, respectivamente. TPM es soluble en agua, acetona, etanol, metanol y DMSO; generalmente no muestra absorbancia en el rango UV, por lo que la molécula se tiene que derivatizar para su detección. Otras características fisicoquímicas y espectrales de TPM se presentan en la tabla 3 y 4 (21).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de TPM

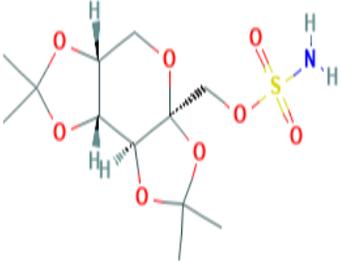
Nombre químico	2,3: 4,5-bis-O- (1- metiletilideno) -β-D- fructopiranososa sulfamato	Estructura molecular
Nombre genérico	Topiramato	
Fórmula condensada	C ₁₂ H ₂₁ NO ₈ S	
pka 1	-3.7	
pka 2	11.09	

Tabla 4. Características espectrales de TPM

Instrumento	LC-ESI-QFT	Abundancia de los iones (%)
Tipo de precursor	[M + H] ⁺	
Precursor (ion padre)	340.10 m/z	10
1° transición	264.2	100

1.3.2 METABOLISMO DE TPM

TPM se metaboliza por glucuronidación, hidrólisis e hidroxilación, y genera metabolitos inactivos. En el proceso participan las enzimas *CYP2C9* y *CYP2C19*. Si se administra con inductores del metabolismo tales como CBZ, aumenta su capacidad de biotransformación y, en consecuencia, su vida media y las concentraciones plasmáticas disminuyen (figura 3). Se elimina de 70 a 80% en la orina. CBZ es un fármaco que induce el metabolismo de TPM a nivel de la enzima *CYP2C19* (21, 22).

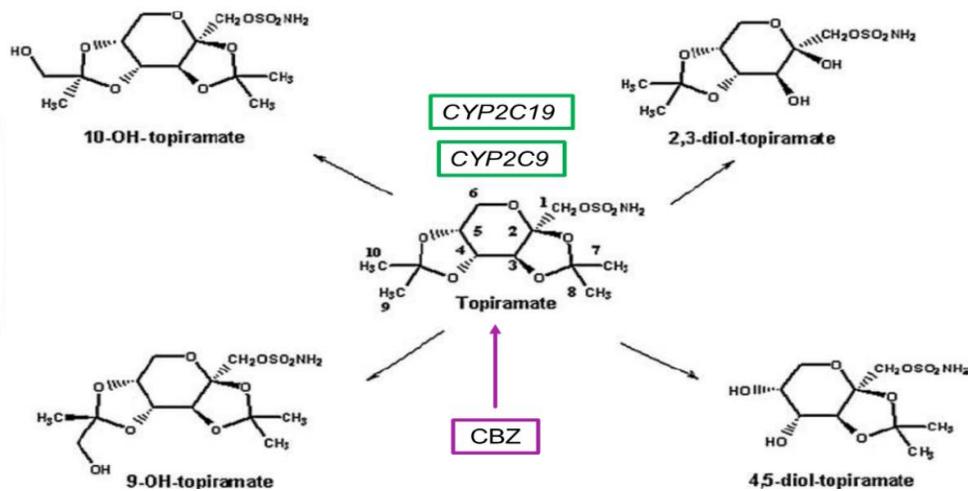


Figura 3. Metabolismo de TPM y su inducción por CBZ

1.3.3 POSOLOGÍA

Para adultos, la dosis inicial es de 50 mg/día, la cual se incrementa de 50 a 100 mg con periodicidad semanal. La dosis máxima se establece en 400 mg/día, repartidos en dos tomas (21). Sin embargo, se pueden requerir entre 800 y 1000 mg/día para el control de las crisis epilépticas.

1.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE FAE'S

La acción de CBZ involucra la estabilización de las membranas hiper-excitadas, la inhibición de las descargas neuronales y la reducción de la propagación sináptica de los impulsos excitatorios. Actúa previniendo descargas repetitivas de potenciales de acción dependientes de sodio a través del bloqueo de los canales voltaje dependientes de Na^{2+} , así como la reducción del glutamato y la estabilización de las membranas neuronales (20).

TPM ejerce acciones sobre los canales de sodio dependientes de voltaje, los receptores de GABA y glutamato. El TPM estimula la actividad de receptores GABA-A y reduce la actividad del glutamato en los receptores AMPA y kainato, bloqueando la excitabilidad neuronal. El bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje bloquea aún más la actividad convulsiva (21) (Figura 4).

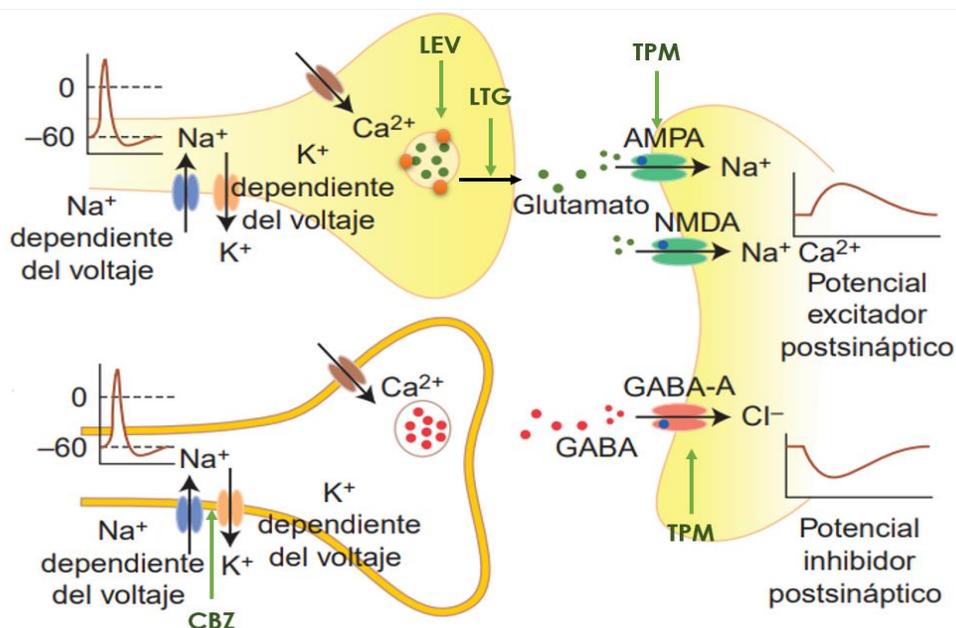


Figura 4. Mecanismo de acción de los FAE's (tomada de Auyin 2014)

1.3.5 FARMACOCINÉTICA DE CBZ Y TPM

Es importante conocer las características de los FAE's para su correcta utilización; en la tabla 5 se resumen las características farmacocinéticas de CBZ y TPM.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos de los FAE's

Parámetro	CBZ	TPM
Rango terapéutico	4 – 12 µg/mL	5 – 20 µg/mL
T _{máx}	4 – 5 h	2 – 4 h
BD	85%	80%
VD	0.8 – 1.9 L/kg	0.6 – 0.8 L/kg
t _{1/2}	12 – 17 h	19 – 23 h
C _{máx}	4.5 µg/mL	1.5 µg/mL
Unión a proteínas	70 – 80%	17%
Metabolitos activos	E-CBZ	-

1.4 VARIANTES POLIMÓRFICAS DE ENZIMAS DEL CYP450

Las enzimas *CYP3A4* y *CYP3A5* que metabolizan a CBZ son altamente polimórficas, lo cual puede tener relevancia clínica en el tratamiento. El haplotipo *CYP3A4*22* genera baja actividad enzimática con aumento en sus concentraciones. Por otra parte, el haplotipo *CYP3A5*3C* ha sido reportado en la literatura como responsable de bajo aclaramiento de algunos fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer, antidepresivos y antiepilépticos (26, 27). La enzima *CYP2C19* también es encargada del metabolismo de CBZ, aunque en menor proporción que las antes mencionadas, sin embargo, los polimorfismos existentes en ella pueden generar variaciones en las concentraciones plasmáticas de CBZ (22).

El polimorfismo de *CYP3A4*22* se genera cuando existe la sustitución o transición de una guanina (G) por una adenina (A), mientras que en *CYP3A5*3C* el polimorfismo se presenta con la sustitución o transición de una guanina (G) por una adenina (A), (28) (29). En la tabla 6 se puede observar la relación existente entre los diplotipos y el metabolismo de fármacos.

Tabla 6. Clasificación del fenotipo metabolizador para *CYP3A4* y *CYP3A5*

Haplotipo	Genotipo	Fenotipo
CYP3A4*22	GG (WT)	Extendido
	GA (heterocigoto)	Intermedio
	AA (homocigoto raro)	Pobre
CYP3A5*3C	GG (WT)	Extendido
	GA (heterocigoto)	Intermedio
	AA (homocigoto raro)	Pobre

Por otro lado, las enzimas *CYP2C9* y *CYP2C19* que metabolizan a TPM presentan diversos polimorfismos. *CYP2C9*2* se genera cuando existe la sustitución de una citosina por una timina, mientras que en *CYP2C19*2* se presenta el cambio de una guanina por una adenina; ante el cambio de una citosina por una timina se presenta el haplotipo *CYP2C19*17*, (28) (Tabla 7).

En general, el haplotipo *CYP2C9*2* se caracteriza por actividad enzimática baja (29, 30). La enzima *CYP2C19* cuenta con los haplotipos *CYP2C19*2* y *CYP2C19*17* los cuales se relacionan con modificación en las concentraciones plasmáticas de diversos fármacos. *CYP2C19*2* está relacionado con baja actividad enzimática. El haplotipo *CYP2C19*17* se ha identificado como fenotipo rápido de metabolismo (7, 31).

Tabla 7. Clasificación del fenotipo metabolizador para CYP2C9 y CYP2C19

Haplotipo	Genotipo	Fenotipo
CYP2C9*2	CC (WT)	Extendido
	CT (heterocigoto)	Intermedio
	TT (homocigoto raro)	Pobre
CYP2C19*2	AA (WT)	Extendido
	AG (heterocigoto)	Intermedio
	GG (homocigoto raro)	Pobre
CYP2C19*17	CC (WT)	Extendido
	CT (heterocigoto)	Intermedio
	TT (homocigoto raro)	Pobre

1.5 CONCOMITANCIA CBZ-TPM

Una de las concomitancias más empleadas para el tratamiento de la ER es la formada por CBZ-TPM. En dicha combinación, CBZ induce el metabolismo de TPM y aumenta su aclaramiento, lo que provoca que las concentraciones plasmáticas de éste disminuyan de 2 a 3 veces con respecto al margen terapéutico. De esta forma los pacientes se encuentran infradosificados, lo que puede conducir a un fracaso terapéutico (16) (18) (21).

Dado que las variantes polimórficas que codifican las enzimas son un factor que puede modificar las concentraciones plasmáticas de dichos fármacos, es importante realizar estudios de genotipificación para valorar la evolución clínica del paciente y mejorar el tratamiento.

1.6 MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE LOS NIVELES DE CBZ Y TPM

La ILAE define el término “rango terapéutico” como un intervalo de referencia de concentraciones plasmáticas del FAE en las que se espera una reducción de por lo menos 50% en la frecuencia de crisis epilépticas con una mínima incidencia de efectos adversos (6, 7, 34).

El intervalo terapéutico deberá ser definido y asociado a la mejor respuesta posible de manera individual; es decir, las manifestaciones clínicas son esenciales para la optimización de la farmacoterapia con FAE's y nunca debe realizarse considerando únicamente las concentraciones séricas. Además de determinar el intervalo terapéutico individualizado, la cuantificación de niveles plasmáticos de FAE's puede ser útil en situaciones como (35):

- Verificación de la adherencia al tratamiento
- Presencia de crisis refractarias
- Se reporta alta variabilidad en las concentraciones
- Se sospecha de interacciones farmacocinéticas
- Existen problemas de toxicidad o eventos adversos que no son tolerables
- El paciente presenta politerapia
- Hay cambio de las formulaciones farmacéuticas prescritas
- En casos particulares como: edad, embarazo y complicaciones clínicas

Por lo tanto, para el tratamiento de la epilepsia es recomendable realizar el proceso de monitorización farmacocinética (Therapeutic Drug Monitoring, TDM por sus siglas en inglés) ya que mediante su aplicación se busca la optimización del tratamiento a partir de las concentraciones del fármaco de interés en fluidos biológicos (36).

Debido al proceso de autoinducción que sufre CBZ, este fármaco requiere aumentos de dosis graduales para mantener las concentraciones séricas terapéuticas una vez alcanzado el equilibrio dinámico. Inicialmente, se recomienda, para el tratamiento de crisis comiciales, concentraciones séricas de CBZ en monoterapia entre 4-12 mg/L y que puede variar de acuerdo a la respuesta individual, principalmente debido a las variaciones en la respuesta clínica, a la fracción libre y al aumento o disminución del metabolito activo, el cual está en función de los fenotipos de metabolismo rápido o lento.

En cuanto a TPM, en general, se acepta un intervalo de referencia de 5-20 mg/L para un adecuado control epiléptico; sin embargo, es importante realizar TDM debido a su alta variabilidad inter-individual, su rango terapéutico estrecho y tiempo de vida media larga, lo que puede generar efectos adversos y encefalopatía si las concentraciones están por encima del 20 mg/L.

En pacientes con régimen CBZ-TPM es de gran utilidad el TDM al comportarse CBZ como un fármaco inductor del metabolismo de TPM, para decidir ajuste de dosis (37).

Debido a que la epilepsia es una de las enfermedades de atención primordial para los sistemas de salud, se recomienda realizar una monitorización farmacocinética y farmacogenética en el tratamiento con FAE's, principalmente en aquellos pacientes que estén tratados con concomitancias como la establecida entre CBZ-TPM. Dichos

procedimientos basados en las características genéticas y en el ajuste de dosis adecuado es la base para la optimización del tratamiento de un paciente y su evolución clínica (5, 15).

2. CAPÍTULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

En México, las enfermedades del sistema nervioso central, en particular, las epilepsias se consideran dentro de las prioridades de atención sanitaria. Los esquemas de atención farmacológica para el caso de la epilepsia demandan el empleo de fármacos como CBZ y TPM, los cuales han demostrado adecuada eficacia terapéutica. No obstante, ambos fármacos se caracterizan por presentar amplia variabilidad interindividual en su farmacocinética debido a que presentan entre otros factores, procesos de inducción metabólica a nivel enzimático.

CBZ es un auto-inductor de las enzimas *CYP3A4* y *CYP3A5*, con incidencia en el decremento de sus concentraciones por debajo del rango de referencia, las cuales, a pesar de estabilizarse en un periodo por lo menos de cinco semanas, ameritan un proceso de monitorización farmacocinética para el ajuste de dosis.

En la concomitancia CBZ-TPM, la interacción farmacocinética provoca inducción del metabolismo de TPM a nivel de enzimas que participan en las reacciones de oxidación de este último, tales como *CYP2C9* y *CYP2C19*. y como consecuencia, se produce incremento de su depuración plasmática, de tal manera que sus niveles plasmáticos disminuyen en comparación cuando el fármaco se administra en monoterapia. Los genes que codifican a las enzimas *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19* son altamente polimórficos por lo que es necesario, además, realizar la genotipificación de sus SNPs, para establecer la influencia de éstos sobre las concentraciones plasmáticas, tanto de CBZ como de TPM, en los pacientes que reciben simultáneamente ambos FAE's en su tratamiento.

Los pacientes con epilepsia tratados en régimen concomitante, al registrar amplias variaciones de los niveles plasmáticos de CBZ y TPM tienen mayor riesgo de presentar menor control de la epilepsia, lo que hace necesario recurrir a su monitorización a través de la aplicación de un proceso de TDM que conduzca a la propuesta del ajuste de dosis adecuado.

Tanto el TDM como la genotipificación de los polimorfismos genéticos requieren de la implementación de metodología analítica por UPLC-MS/MS y por PCR en tiempo real, respectivamente, ya sea para su aplicación en la monitorización de las concentraciones plasmáticas de CBZ y TPM, o para determinar la influencia de los polimorfismos de los genes que codifican a enzimas *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19*, en dichas concentraciones.

En el presente trabajo se ha propuesto realizar la implementación y aplicación de ambas metodologías (analítica y molecular) como base para el TDM, siendo el trabajo inicial para desarrollar estudios posteriores que tengan como objetivo proponer el

ajuste de dosis de CBZ y TPM cuando éstos se administren de manera concomitante. Se considera que lo anterior tendrá un impacto clínico favorable al contar con las herramientas analíticas y moleculares como apoyo para el mejor diagnóstico y seguimiento farmacológico de los pacientes con epilepsia.

3. CAPÍTULO III

3.1 HIPÓTESIS

Los métodos analíticos y moleculares permiten, respectivamente, la determinación de los niveles plasmáticos de CBZ y TPM, así como los polimorfismos genéticos de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19* asociados al metabolismo de estos fármacos, para su aplicación en estudios clínicos de pacientes con epilepsia.

4. CAPITULO IV

4.1 OBJETIVOS

4.1.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar un método por UPLC-MS/MS para medir simultáneamente los niveles plasmáticos de CBZ y TPM y aplicar la técnica por PCR en tiempo real para determinar los polimorfismos genéticos de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19* para su posterior aplicación en la monitorización farmacocinética y farmacogenética de pacientes con epilepsia.

4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar y validar un método por UPLC-MS/MS para medir las concentraciones de CBZ y TPM en plasma.
- Desarrollar la técnica de PCR tiempo real *para* la genotipificación de polimorfismos genéticos de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19* asociados al metabolismo de CBZ y TPM.
- Aplicar la metodología por UPLC-MS/MS implementada para monitorizar los niveles plasmáticos de CBZ y TPM en el estado estacionario de la terapia antiepiléptica en un grupo piloto de pacientes con epilepsia.
- Identificar los polimorfismos genéticos de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19* en el grupo de pacientes con epilepsia para relacionar su influencia en los niveles plasmáticos de los fármacos antiepilépticos monitorizados.

5. CAPÍTULO V

5.1 METODOLOGÍA

5.1.1 IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CBZ Y TPM EN PLASMA HUMANO

5.1.1.2 **CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE CBZ Y TPM**

La implementación del análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo UPLC Acquity clase H acoplado al módulo de espectrometría de masas en tándem XEVO TQD (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La separación cromatográfica se realizó con una columna UPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm) de 1.7 μm de tamaño de partícula, con una temperatura en la columna de 40°C y 10°C en el automuestreador, utilizando un gradiente para la elución de CBZ y TPM.

Después de varios ensayos en los gradientes de la fase móvil se definieron las condiciones finales mostradas en la tabla 8. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% y acetonitrilo) con un flujo de 0.3 mL/min. El volumen de inyección fue de 2 μL y el tiempo de corrida fue de 6.5 minutos.

Tabla 8. Gradiente de elución para CBZ, TPM y LEV

Tiempo (min)	Gradiente	
	% Ácido fórmico 0.1%	% ACN
0	97.5	2.5
1	95	5
2	70	30
3.6	50	50
4	50	50
4.3	20	80
4.75	20	80
4.85	97.5	2.5
6	97.5	2.5

5.1.2 CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN DE CBZ Y TPM POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La detección de las transiciones se realizó en un espectrómetro de masas en tándem con ionización en electrospray positivo (ES+) para ambos analitos. Se utilizó el método de monitoreo de reacción múltiple (MRM), con nitrógeno como gas de desolvatación a una temperatura de 300°C y un flujo de 800 L/h. Mientras que el gas de colisión fue argón con una pureza de 99.99%. La temperatura de la fuente de ionización fue de 150 °C y el voltaje capilar de 1 kV.

Las transiciones para los analitos de interés y los parámetros de espectrometría de masas fueron obtenidas mediante la inyección directa de estándares de 500 ng/mL en una solución metanol/agua (50:50) y analizados a través del sistema automatizado IntelliStart el cual está integrado en el software MassLynx V4.1. Posteriormente, los parámetros se corroboraron y optimizaron manualmente con base a los reportes de la bibliografía. (19,21 26,45) para la obtención de los iones moleculares, así como las transiciones para la identificación y cuantificación del compuesto.

En la tabla 9 se muestran los resultados de las transiciones correspondientes a CBZ y TPM, así como la energía de colisión y el voltaje de cono específicos para cada compuesto (Ver figura 6).

Tabla 9. Condiciones experimentales para obtención de las transiciones de CBZ y TPM

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Transición 1 (cuantificación) (m/z)	Transición 2 (identificación) (m/z)	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)
CBZ	5.17	237.1>193.99	237.1>178.96	36	18
TPM	4.95	340.4>264.02	-	30	6

5.1.3 PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA EXTRACCIÓN DE CBZ Y TPM

A 200 µL de plasma adicionadas de estándares de CBZ y TPM se agregaron 400 µL de ACN grado LC-MS para desproteinizar la muestra, se centrifugó durante 20 minutos a 14,000 rpm a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se evaporó al vacío durante 90 minutos y posteriormente, el residuo se resuspendió en 300 µL de fase móvil (95%

ácido fórmico 0.1%: 5% ACN). Nuevamente se centrifugó durante 10 minutos y se transfirió a los viales correspondientes para su análisis en el equipo cromatográfico UPLC-MS/MS.

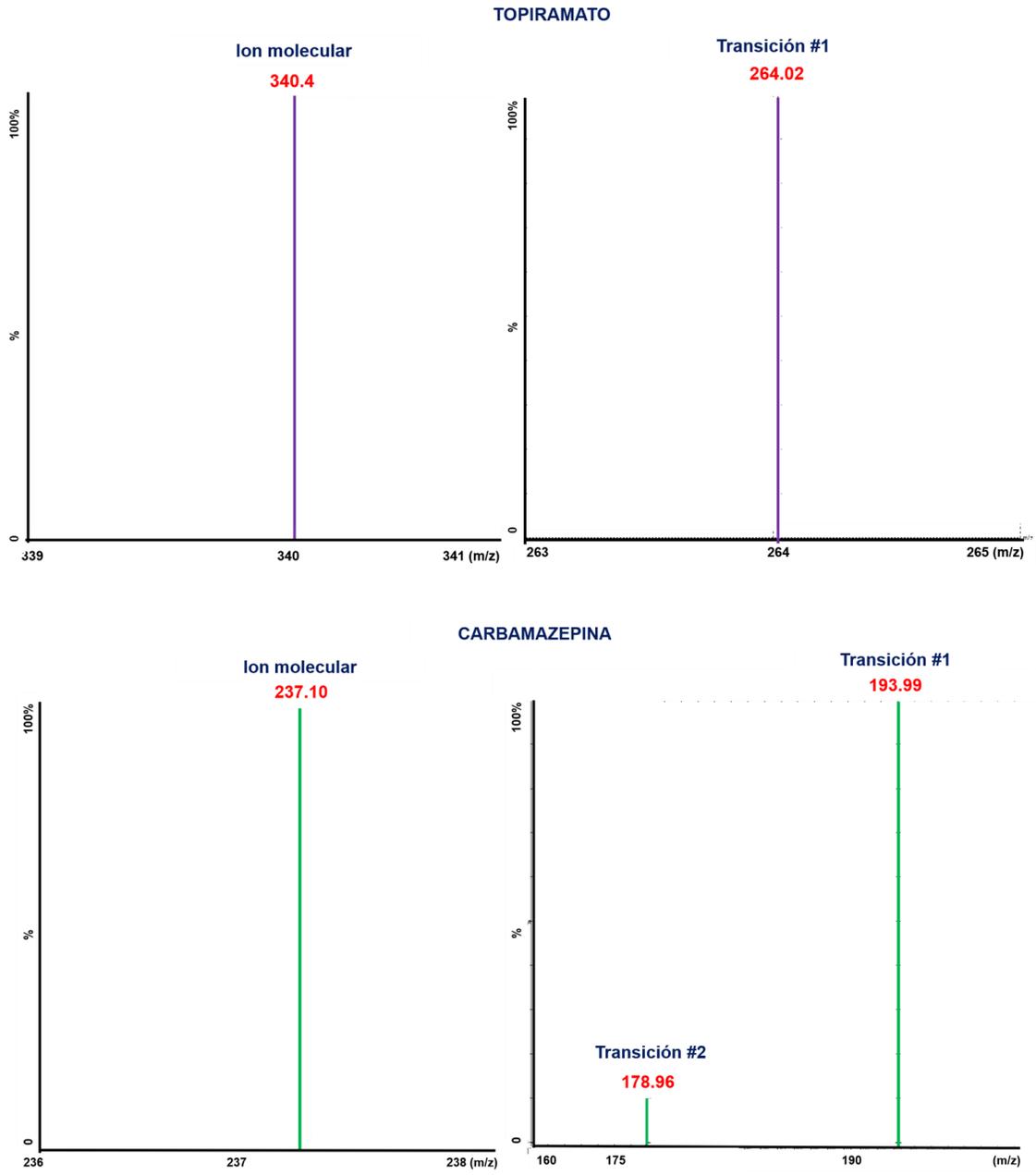


Figura 5. Espectrometría de masas para TPM y CBZ

5.2 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DEL MÉTODO POR UPLC-MS/MS PARA MEDIR CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CBZ Y TPM.

El desempeño del método de bioanálisis desarrollado para la cuantificación de CBZ y TPM, se validó en términos de selectividad, efecto de matriz y acarreo para los métodos de espectrometría de masas, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, estabilidad, límite de cuantificación y detección bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

5.2.1 SELECTIVIDAD.

Se utilizaron 6 unidades de plasma individuales libres de fármacos para evaluar el efecto de los componentes del plasma sobre la respuesta de los analitos; para determinar la selectividad del método, las unidades de plasma se procesaron bajo la técnica de bioanálisis desarrollada y la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención se comparó con la respuesta obtenida para el límite inferior de cuantificación de los analitos.

5.2.2 LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN.

Dado que el límite inferior de cuantificación evalúa la concentración más baja del analito que puede medirse con precisión y exactitud, se analizaron 6 unidades individuales de la concentración más baja de la curva de calibración para cada analito. El %CV y el % de desviación de la concentración nominal deben ser menor al 20%, así como el cociente señal/ruido por encima de 10.

La señal mínima que el espectrómetro de masas puede diferenciar de la señal de ruido y, por tanto, la presencia del analito, sin que este pueda ser aún cuantificado, se determinó con base a la señal media más tres desviaciones estándar de 6 unidades de plasma libres de fármaco. Dichas señales fueron interpoladas en la curva de calibración para determinar el límite de detección (LDD) para CBZ y TPM (Guía ICH).

5.2.3 CURVA DE CALIBRACIÓN.

Se estableció un intervalo de concentraciones esperadas de los analitos en plasma, caracterizando por lo menos seis concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco de matriz biológica, los cuales fueron procesados y analizados por triplicado, de la misma manera que las muestras plasmáticas. Se determinó un modelo matemático adecuado a la relación entre la concentración y la respuesta obtenida por espectrometría de masas.

Los resultados de la concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación ya que puede ser menor o igual al 20%. Al

menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

5.2.4 PRECISIÓN.

5.2.4.1 *Repetibilidad.*

En un mismo día, se analizaron por quintuplicado las muestras control en tres niveles diferentes de concentración (baja, media y alta) pero dentro de la curva de calibración lineal y se procesaron de la misma manera que las muestras plasmáticas. Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. El valor de CV no debe ser mayor que el 15% para métodos cromatográficos.

5.4.2.2 *Reproducibilidad.*

Se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes, las muestras control y para cada una se calculó la concentración obtenida interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. El valor de CV no debe ser mayor que el 15% para métodos cromatográficos.

5.2.5 EXACTITUD.

A partir de los datos de reproducibilidad y repetibilidad, se calculó la desviación de la concentración obtenida con respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = (\text{Concentración adicionada} - \text{concentración obtenida}) / (\text{Concentración adicionada}) * 100$$

El valor medio del % de desviación no debe ser mayor al 15% para métodos cromatográficos.

5.2.6 EFEECTO DE ACARREO PARA MÉTODOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se realizó un mínimo de 3 inyecciones de una muestra blanco y dos inyecciones posteriores al análisis del límite superior de cuantificación, es decir, la concentración más alta utilizada para la curva de calibración.

La respuesta analítica próxima al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito para descartar efecto de acarreo significativo y que pueda alterar los resultados durante la cuantificación de TPM y CBZ en muestras problema.

5.2.7 EFECTO DE MATRIZ PARA MÉTODOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se analizaron individualmente 6 unidades del analito en solución y 6 unidades adicionadas con la concentración de la muestra control alta para TPM, LEV y CBZ en la matriz biológica y se calculó el factor de matriz normalizado (FMN), el cual debe ser reproducible con %CV menor al 15%.

$FMN = (\text{Respuesta del analito matriz (ABC)}) / (\text{Respuesta del analito en solución (ABC)})$

5.2.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que los fármacos permanecieron estables en la matriz biológica. Se analizaron por triplicado las muestras control media y las concentraciones obtenidas fueron comparadas con las concentraciones nominales bajo diferentes escenarios.

Se evaluó la estabilidad de los analitos en la matriz biológica por triplicado en las muestras control media, almacenadas a una temperatura de -80°C a la cual se conservaron las muestras reales. Se realizaron 3 ciclos congelación-descongelación dejando las muestras control por al menos 12 h en el congelador entre cada ciclo y se procedió a descongelarlas completamente a temperatura ambiente antes de su análisis.

La concentración media de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal para comprobar su estabilidad en las diferentes condiciones evaluadas.

5.3 IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA POR PCR TIEMPO REAL PARA GENOTIPIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS CYP3A4*22, CYP3A4*3, CYP2C9*2, CYP2C19*2 Y CYP2C19*17

5.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de muestras de sangre completa con EDTA como anticoagulante mediante un kit de extracción Wizard® Genomic DNA (marca Promega). La extracción de ADN se realizó tomando 300 µL de sangre completa y añadiendo 900 µL de solución de lisis de membrana y agitando. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se rescató el pellet y se le agregaron 300 µL de solución de lisis nuclear. Se agregaron 100 µL de solución de lisis de proteínas, se agitó en el vórtex y se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y estéril, se guardó a 4°C durante 30 minutos y se agregaron 300 µL de isopropanol, realizando agitación por inversión. Posteriormente, se centrifugó y lavó el pellet con 300 µL de

etanol al 70%. Se centrifugó y secó el pellet, se resuspendió con 60 μL de solución de rehidratación y se conservó a 4°C. Después, se cuantificó en el equipo Nanodrop, realizando alícuotas de diversas concentraciones las cuales se mantuvieron en refrigeración a -4°C. Ver Figura 5.

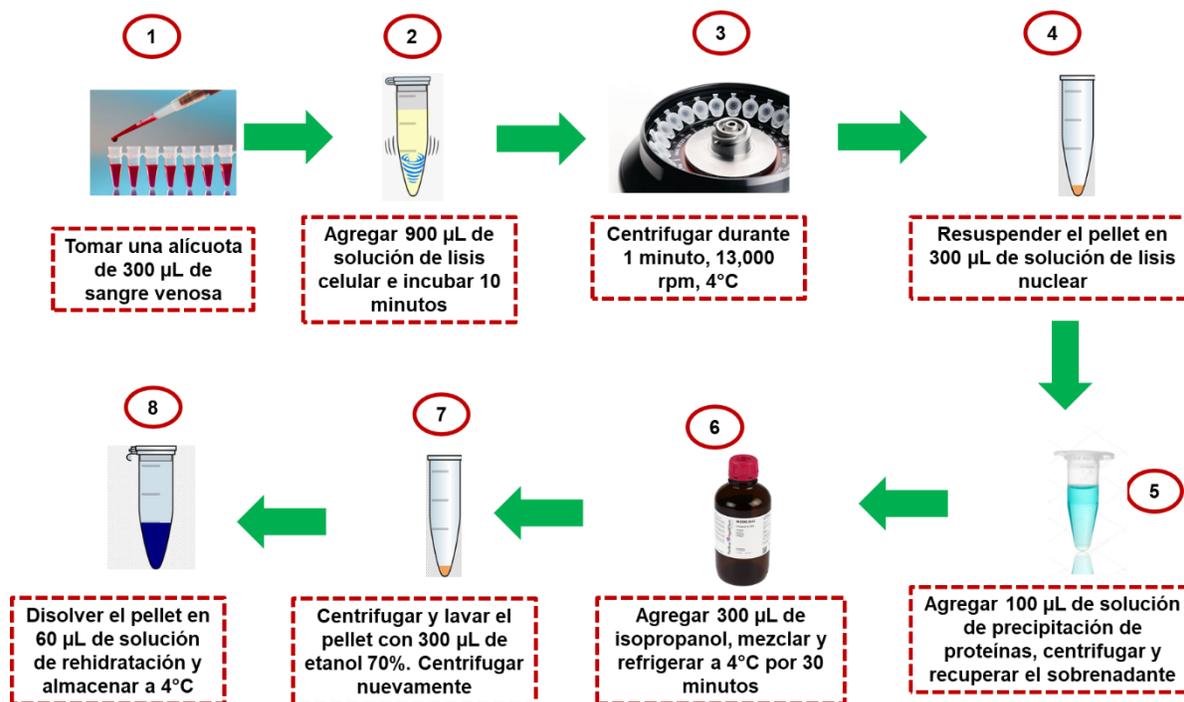


Figura 6. Extracción de ADN

5.3.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR TIEMPO REAL

La técnica de PCR tiempo real fue estandarizada y optimizada previamente. Para ello, se preparó una mezcla con 3 μL de Master Mix®, 0.7 μL de agua, 0.3 μL de la sonda Taqman® correspondiente (Applied Biosystems, USA) y 2.0 μL de ADN genómico. La amplificación se efectuó en el equipo StepOne® (Applied Biosystems, USA) y se analizó en el Software StepOne v2.22. Las sondas utilizadas fueron las correspondientes a los haplotipos CYP3A4*22 (G15389A), CYP3A5*3 (A6986G), CYP2C9*2 (T430C), CYP2C19*2 (G-681A) y CYP2C19*17 (C-806T). Una vez confirmada la amplificación y la presencia de los SNPs, se determinaron los haplotipos con base a la nomenclatura de metabolizador extendido, intermedio y pobre.

5.4 ESTUDIO CLÍNICO

Se realizó un estudio clínico observacional, prospectivo y transversal con muestreo no probabilístico, consecutivo y por conveniencia. Participaron 45 pacientes con epilepsia confirmada atendidos en la Clínica de Epilepsia del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del HCIMP y por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas, registros 61-19 y CEID2019-010-S, respectivamente (Anexo I). Los pacientes incluidos firmaron la carta de consentimiento informado (Anexo II).

5.4.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES

5.4.1.1 Criterios de inclusión

Participaron pacientes con edad igual o mayor a 18 años y con diagnóstico confirmado de epilepsia. Los pacientes estaban en tratamiento con CBZ en monoterapia durante por lo menos 5 semanas, o en tratamiento concomitante de CBZ-TPM o TPM-LEV con temporalidad mayor o igual a dos semanas. Dado que TPM es un fármaco de segunda línea, no sería posible encontrar pacientes en monoterapia con este fármaco; sin embargo, se incluyeron pacientes con tratamiento concomitante con LEV puesto que es un fármaco con nulas interacciones a nivel farmacocinético y no se espera que altere el curso de TPM por el organismo.

5.4.1.2 Criterios de no inclusión

No se incluyeron en el estudio pacientes con trastornos psiquiátricos, mujeres embarazadas, en lactancia o con falla renal.

5.4.1.3 Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio los pacientes que presentaran dificultad para realizar la toma de muestra o que decidieron retirar su consentimiento para participar en el estudio.

5.4.1.4 Toma de muestras sanguíneas

A cada paciente, se le tomó una muestra sanguínea de 4 mL a través de venopunción periférica, en un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante, la cual fue destinada para monitorización farmacocinética y genotipificación. Se anotó la fecha y hora de la última administración de FAE's, dosis, fecha y hora de la toma de muestra. Todas las muestras se tomaron en la pre-dosis.

5.4.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES PARA MONITORIZACIÓN DE CBZ-TPM Y GENOTIPIFICACIÓN.

A partir de la muestra sanguínea de cada paciente, se separó el ADN genómico y el plasma para el estudio de genotipificación y monitorización de fármacos antiepilépticos, respectivamente, aplicando las metodologías implementadas de PCR en tiempo real y UPLC-MS/MS.

5.4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos antropométricos y clínicos de los pacientes se tomaron del expediente clínico y se recabaron en una base de datos en Excel®. Los resultados de la genotipificación para los SNP's de *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19*, se clasificaron en función del fenotipo metabolizador de cada paciente en alguna categoría de metabolizador extendido, intermedio y pobre. Se aplicaron pruebas de normalidad Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnof para los resultados de concentración plasmática de CBZ y TPM. Se determinó por paciente si las concentraciones de ambos fármacos se encontraban dentro del intervalo de referencia. Posteriormente se analizó la posible asociación de los niveles de CBZ y TPM con los respectivos fenotipos metabolizadores. La asociación entre las variables tales como peso, dosis, talla, edad, tabaquismo y sexo con las concentraciones plasmáticas, se evaluó por análisis de regresión multivariada, mientras que la asociación entre los fenotipos metabolizadores de cada enzima y las concentraciones plasmáticas de CBZ y TPM en los grupos de estudio se analizó mediante un ANOVA. Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$.

6. CAPÍTULO VI

6.1 RESULTADOS

6.1.1 IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR UPLC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CBZ Y TPM

6.1.1.1 *Obtención de las transiciones para CBZ y TPM*

En la figura 7, se muestra la elución cromatográfica de CBZ y TPM en plasma.

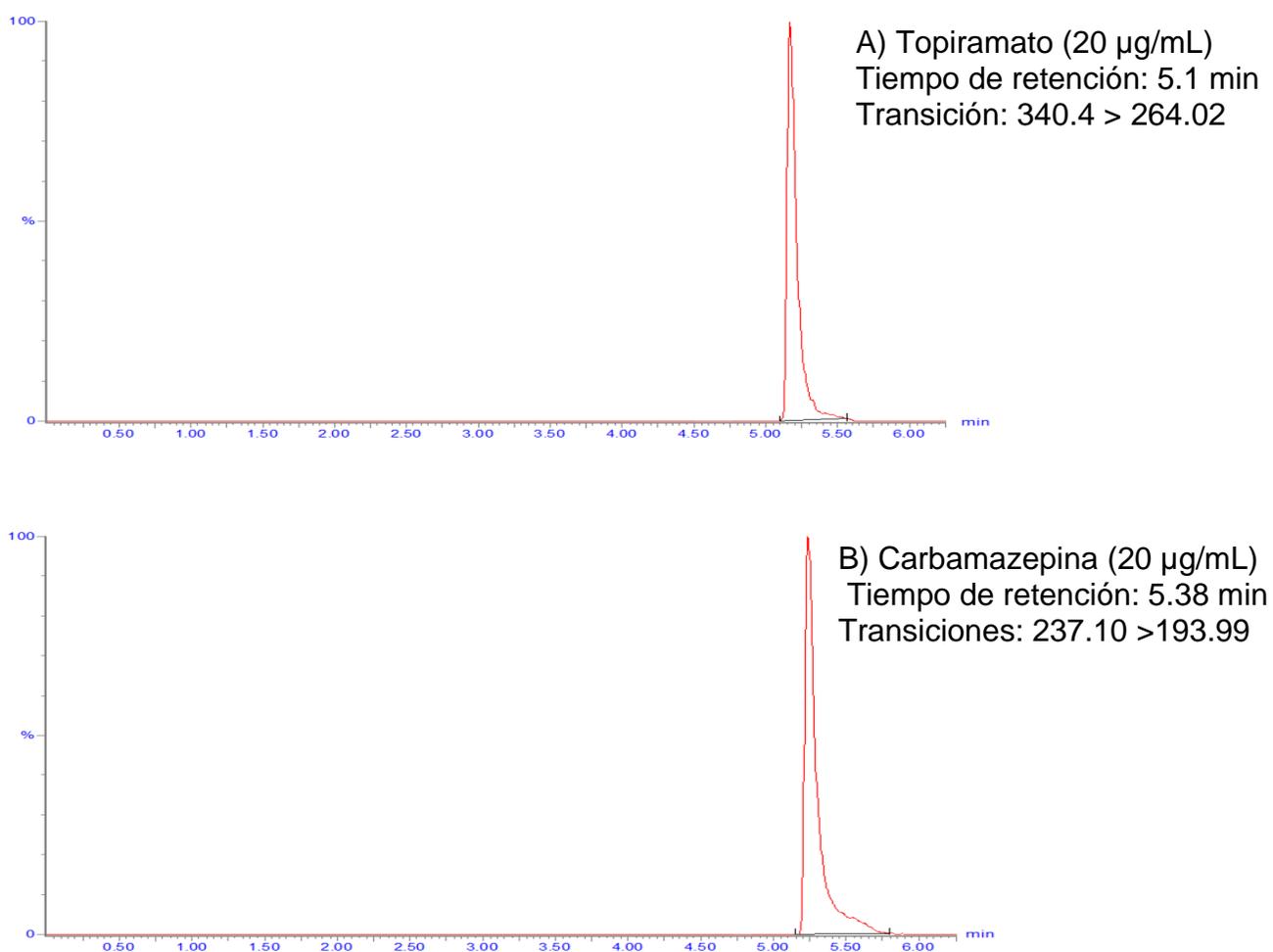


Figura 7. Cromatograma típico para CBZ y TPM en estándares de plasma fortificado.

6.2 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA PARA LA SEPARACIÓN DE CBZ Y TPM EN PLASMA HUMANO POR UPLC-MS/MS

6.2.1 EFECTO MATRIZ Y EFECTO DE ACARREO PARA MÉTODOS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la tabla 10 se muestra el efecto matriz (FMN) para CBZ y TPM. Los %CV son menores a 15% lo que indica reproducibilidad en el efecto de la matriz biológica sobre los analitos de estudio, mientras que el efecto de acarreo en estos 3 analitos fue <20% como indica la NOM-177-SSA1-2013.

6.2.2 SELECTIVIDAD

La selectividad fue determinada a partir de la respuesta de muestras blanco de la matriz biológica, la cual no debe ser superior al 20% de la respuesta emitida por el límite inferior de cuantificación de la curva de calibración.

En la figura 8 se muestran los cromatogramas correspondientes a los blancos de matriz (Bco) donde se puede observar que no existe presencia de compuestos endógenos en los tiempos de retención de los compuestos de interés.

Tabla 10. Efecto matriz y de acarreo para CBZ y TPM

Efecto matriz							
CBZ				TPM			
	Media (µg/mL)	DE (µg/mL)	%CV		Media (µg/mL)	DE (µg/mL)	%CV
QCB	0.92	0.13	14.13	QCB	0.41	0.02	4.88
QCA	1.07	0.03	2.80	QCA	0.5	0.04	8.00
Efecto de acarreo							
CBZ				TPM			
# Muestra blanco	ABC (µV*sec)	% ABC de LIC	Criterio	# Muestra blanco	ABC (µV*sec)	% ABC de LIC	Criterio
1	134.18	2.1	<20%	1	1.63	0.26	<20%
2	110.3	1.73		2	5.58	1.05	
3	125.65	1.97		3	2.22	0.35	

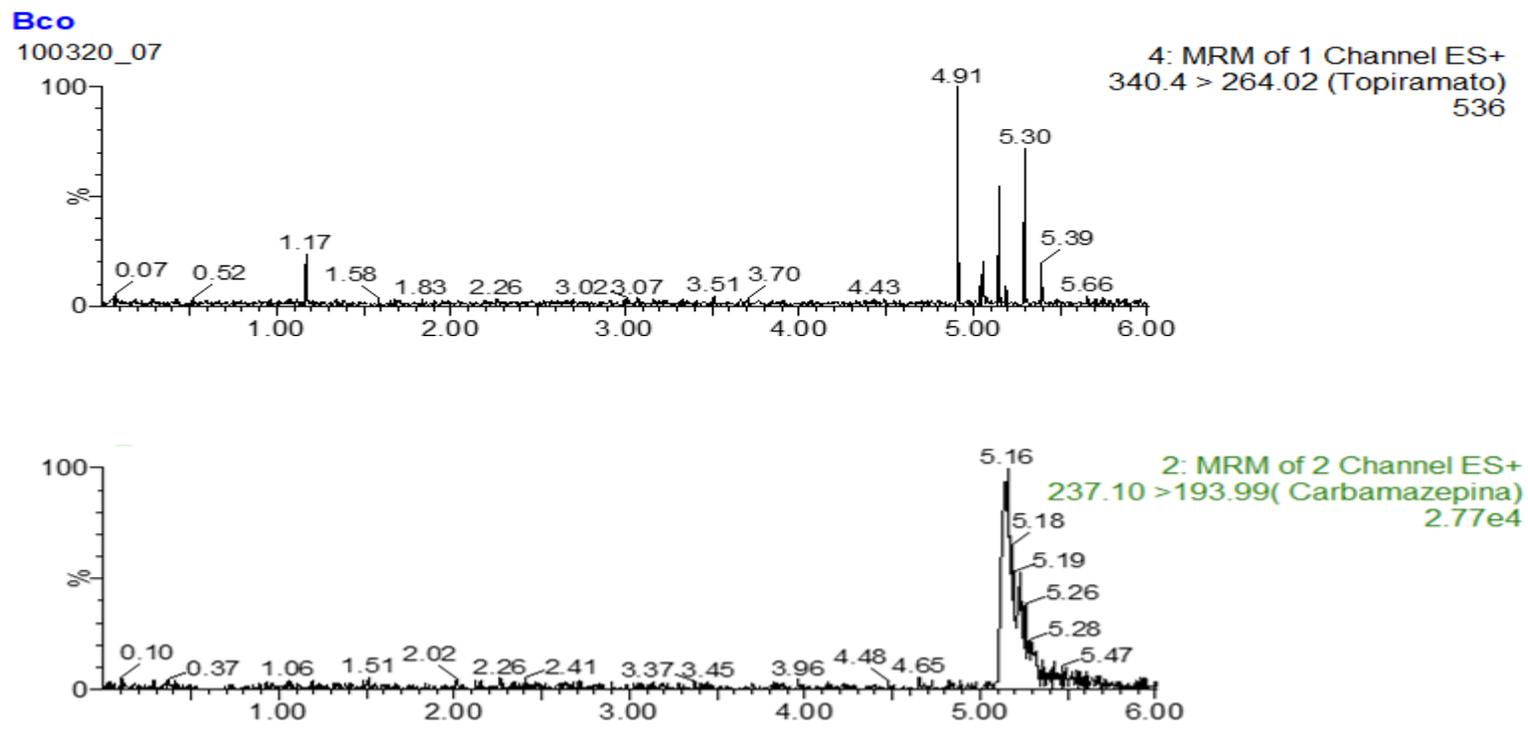


Figura 8. Cromatogramas de muestras blanco de matriz biológica

6.2.3 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN (LIC) Y LÍMITE DE DETECCIÓN (LDD).

La tabla 11 contiene los resultados para LIC y LDD según los datos obtenidos para CBZ y TPM.

Tabla 11. Límite inferior de cuantificación, límite de detección y límite de cuantificación para CBZ y TPM

Compuesto	LIC ($\mu\text{g/mL}$)	Media ($\mu\text{g/mL}$)	DE	%CV	LDD ($\mu\text{g/mL}$)
CBZ	0.6	0.56	0.09	15.97	0.003
TPM	0.6	0.58	0.08	14.43	0.01

6.2.4 LINEALIDAD EN PLASMA

Los resultados del análisis de la curva de calibración por triplicado expresados en área bajo la curva (ABC) y los parámetros de regresión lineal para los tres FAE's se presentan en la tabla 12. La figura 8 presenta los gráficos de la relación obtenida entre la concentración y la respuesta medida para CBZ, TPM y LEV en plasma. El intervalo de linealidad fue establecido de 0.6 a 20 $\mu\text{g/mL}$ para CBZ y TPM, mientras que para LEV de 1.2 a 40 $\mu\text{g/mL}$. Los controles de calidad (QC) para CBZ y TPM fueron de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (QCB), 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (QCM) y 18 $\mu\text{g/mL}$ (QCA), mientras que para LEV fueron de 3.0, 12.0 y 36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabla 12. Análisis de la curva de calibración por triplicado para CBZ y TPM en plasma

Linealidad				
CBZ				
Concentración (µg/mL)	Media ABC (µV*sec)	DE ABC (µV*sec)	%CV	
0.6	6.47E+03	1.56E+02	2.41	m = 7486.71
1	9.61E+03	4.06E+02	4.22	b = 4692.71
2	1.82E+04	3.45E+02	1.90	
4	3.72E+04	2.12E+03	5.70	r = 0.9945
8	6.76E+04	2.20E+03	3.25	r ² = 0.9891
15	1.27E+05	1.73E+03	1.36	
20	1.45E+05	3.67E+03	2.53	
TPM				
Concentración (µg/mL)	Media ABC (µV*sec)	DE ABC (µV*sec)	%CV	
0.6	6.38E+02	3.14E+01	4.92	m = 1285.6
1	1.26E+03	8.95E+01	7.10	b = -256.93
2	2.33E+03	1.35E+02	5.79	
4	4.64E+03	4.40E+02	9.48	r = 0.9996
8	9.63E+03	1.94E+02	2.01	r ² = 0.9930
15	1.93E+04	8.54E+02	4.42	
20	2.54E+04	7.79E+02	3.07	

ABC: Respuesta analítica media como área bajo la curva del pico cromatográfico; DE: desviación estándar; %CV: coeficiente de variación; m: pendiente; b: ordenada al origen; r: coeficiente de correlación; r²: coeficiente de determinación.

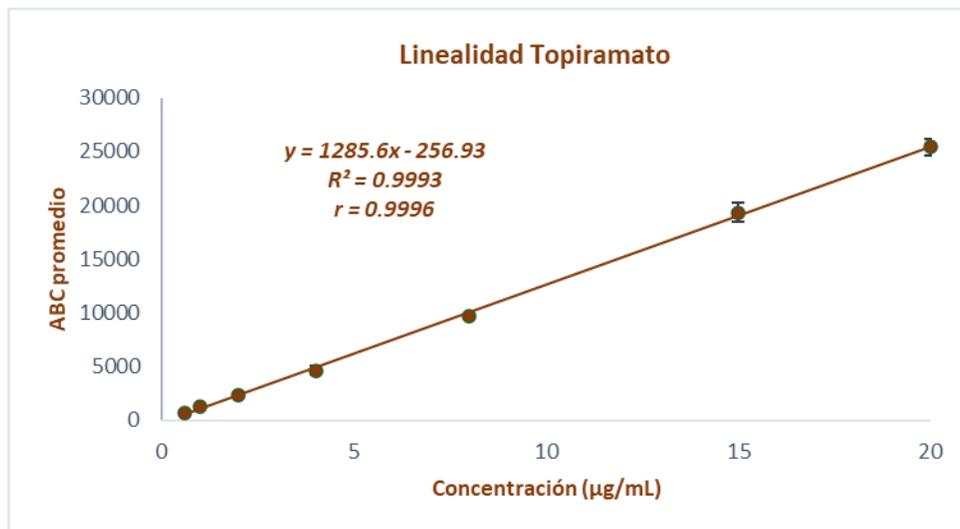
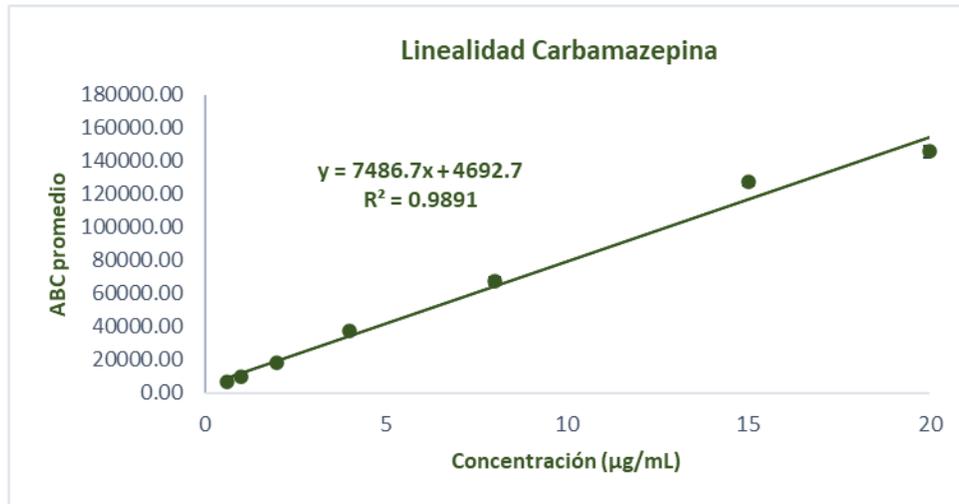


Figura 9. Linealidad del método para CBZ y TPM a partir de plasma

Los resultados del promedio de la concentración y el porcentaje recuperado para cada FAE, así como los parámetros de regresión lineal para los tres compuestos se presentan en la tabla 13. La figura 8 muestra las gráficas de linealidad del método para cada analito.

Tabla 13. Concentración y porcentaje recuperado para CBZ y TPM

CBZ				
Concentración (µg/mL)	Media (µg/mL)	DE	%CV	% recuperado
0.6	0.60	0.02	2.57	98.89
1	0.97	0.06	5.97	96.67
2	1.97	0.06	2.94	98.33
4	4.23	0.25	5.94	105.83
8	7.87	0.25	3.20	98.33
15	14.93	0.21	1.39	99.56
20	17.07	0.35	2.06	85.33
TPM				
Concentración (µg/mL)	Media (µg/mL)	DE	%CV	% recuperado
0.6	0.60	0.01	0.95	101.11
1	1.07	0.06	5.41	106.67
2	1.97	0.12	5.87	98.33
4	3.77	0.31	8.11	94.17
8	7.67	0.15	1.99	95.83
15	15.37	0.64	4.18	102.44
20	20.13	0.61	3.03	100.67

6.2.5 PRECISIÓN

6.2.5.1 *Repetibilidad*

En la tabla 14 se muestran los resultados de la concentración promedio del análisis por quintuplicado de los controles de calidad (QCB, QCM, y QCA) para CBZ y TPM. El método es repetible ya que todos los CV se encuentran por debajo del 15%.

6.2.5.2 *Reproducibilidad*

La reproducibilidad se demostró con %CV inferiores al 15% al analizar las muestras de control de calidad en 3 corridas diferentes durante dos días (Tabla 14). El porcentaje recuperado para QCM de CBZ fue de 115.83% teniendo por lo tanto un sesgo de -15.83%.

6.2.6 EXACTITUD

El sesgo fue calculado para evaluar la exactitud del método entre los valores de concentración nominal y los obtenidos con los datos de repetibilidad y reproducibilidad. (Tabla 14).

Tabla 14. Precisión y exactitud en términos de repetibilidad y reproducibilidad para la cuantificación de CBZ y TPM en plasma por UPLC-MS/MS

REPETIBILIDAD						
	Conc. teórica (µg/mL)	Media (µg/mL)	DE (µg/mL)	%CV	% recuperado	% Sesgo
CBZ						
QCB	1.5	1.4	0.2	14.29	93.33	6.67
QCM	6	5.7	0.25	4.39	95.00	5.00
QCA	18	15.8	0.35	2.22	87.78	12.22
TPM						
QCB	1.5	1.4	0.07	5.00	93.33	6.67
QCM	6	5.64	0.21	3.72	94.00	6.00
QCA	18	16.32	1.88	11.52	90.67	9.33
REPRODUCIBILIDAD						
CBZ						
QCB	1.5	1.57	0.15	9.55	104.67	-4.67
QCM	6	6.95	0.93	13.38	115.83	-15.83
QCA	18	17.94	1.58	8.81	99.67	0.33
TPM						
QCB	1.5	1.62	0.09	5.56	108.00	-8.00
QCM	6	6.52	0.37	5.67	108.67	-8.67
QCA	18	19.39	1.31	6.76	107.72	-7.72

6.2.7 ESTABILIDAD

Se evaluaron 3 ciclos congelación–descongelación con el control de calidad de concentración media (QCM); en la tabla 15 se puede observar que los analitos son estables ya que los %CV son menores al 15%. El porcentaje recuperado para los ciclos congelación–descongelación de CBZ es de 125.5% generando así un sesgo del 25.5%.

Tabla 15. Resultados de ciclos congelación – descongelación y estabilidad a -80°C corto plazo para CBZ y TPM en plasma

Estabilidad		
3 ciclos Congelación-Descongelación		
	CBZ	TPM
QCM (µg/mL)	6	6
Media (µg/mL)	7.53	6.5
DE (µg/mL)	1.02	0.17
%CV	13.55	2.62
% recuperado	125.5	108.33
% Sesgo	-25.5	-8.33
Corto plazo (2 días)		
	CBZ	TPM
QCB (µg/mL)	1.5	1.5
Media (µg/mL)	1.6	1.67
DE (µg/mL)	0.1	0.06
%CV	6.25	3.59
% recuperado	106.67	111.33
% Sesgo	-6.67	-11.33
Corto plazo (2 días)		
	CBZ	TPM
QCA (µg/mL)	18	18
Media (µg/mL)	15.9	18.9
DE (µg/mL)	0.82	1.23
%CV	5.16	6.51
% recuperado	88.33	105.00
% Sesgo	11.67	-5.00

6.3 RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE GENOTIPIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 Y CYP2C19.

6.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y TÉCNICA DE GENOTIPIFICACIÓN

A partir de la muestra de sangre venosa de un sujeto se extrajo ADN; se realizaron pruebas por duplicado para determinar la concentración de ADN (Tabla 16).

Tabla 16. Pruebas de extracción de ADN y nivel de pureza

	Concentración ADN (ng/μL)		260/280	260/280
Muestra 1*	32.4	35.2	2.11	2.08
Muestra 2**	241.6	238.4	1.88	1.80

**Muestra 1 (sin refrigeración intermedia)*

***Muestra 2 (con refrigeración intermedia de 30 minutos)*

Bajo el proceso de refrigeración intermedia de 30 minutos se obtuvo mayor concentración de ADN. A partir de la muestra 2 analizada por duplicado se realizaron alícuotas de diversas concentraciones para definir aquella con mejor amplificación con las sondas TaqMan.

6.3.2 AMPLIFICACIÓN DE SONDAS TAQMAN PARA ENZIMAS DEL CYP450 MEDIANTE PCR TIEMPO REAL

Se realizaron pruebas modificando condiciones tales como el número de ciclos, temperatura y cantidad de reactivos para establecer las condiciones óptimas para la amplificación con las sondas Taqman utilizadas (Tabla 17).

Tabla 17. Pruebas realizadas para la amplificación de sondas TaqMan

Reactivo	Prueba #1	Prueba #2	Prueba #3	T°C	# de ciclos	Concentración de ADN (ng/μL)
Sonda	0.3 μL	0.3 μL	0.3 μL	60	40	241.6
Master-mix	1.5 μL	3.0 μL	1.0 μL	60	50	100
Agua	2.2 μL	0.7 μL	2.7 μL	60	55	20
ADN	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL	-	-	10

Las condiciones óptimas para amplificación de las sondas asociadas a los haplotipos CYP3A4*22, CYP3A5*3, CYP2C9*2, CYP2C19*2 y CYP2C19*17, correspondieron a los volúmenes indicados como prueba #3, con 50 ciclos de amplificación y temperatura de 60°C. Por otra parte, se identificó que las sondas

amplificaron desde 10 ng/mL hasta 241.6 ng/mL por lo que, el análisis de genotipificación puede realizarse con cualquiera de estas concentraciones.

6.4 ESTUDIO EN PACIENTES CON EPILEPSIA TRATADOS CON CBZ Y TPM

6.4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Participaron 45 pacientes los cuales fueron distribuidos en 3 grupos:

- 22 pacientes medicados con CBZ (pacientes del 1 al 22)
- 16 pacientes medicados con TPM y LEV (pacientes del 23 al 38)
- 7 pacientes medicados con TPM y CBZ (pacientes del 39 al 45)

La tabla 18 muestra las características de los pacientes; las variables antropométricas con distribución paramétrica se reportan con la media \pm DE, mientras que las no paramétricas se registraron como mediana y rango. La mayoría de los pacientes fueron del sexo femenino y con 38.67 años en promedio.

Tabla 18. Características antropométricas de los pacientes con epilepsia

Característica, unidades y estadístico		Pacientes tratados con CBZ (n=22)	Pacientes tratados con TPM-LEV (n=16)	Pacientes tratados con CBZ-TPM (n=7)	Total (n=45)
Sexo	Masculino [n (%)]	3 (13.63%)	4 (25%)	2 (28.57%)	9 (20%)
	Femenino [n (%)]	19 (86.36%)	12 (75%)	5 (71.43%)	36 (80%)
Edad [años]	Media \pm DE	32.95 \pm 9	38.33 \pm 17.33	52 \pm 13.74	38.67 \pm 15.35
Peso [kg]	Mediana (Rango)	60 (50 - 101)	62 (47 - 96)	70 (55.5 - 88)	62 (47 - 101)
IMC [kg/m²]	Media \pm DE	24.82 \pm 4.94	25.06 \pm 4.89	25.01 \pm 2.45	24.93 \pm 4.54
Dosis (mg)	Media \pm DE	CBZ 329.55 \pm 79.67	TPM = 129.69 \pm 80.74	CBZ = 342.86 \pm 113.39	45 (100%)
			LEV 1062.50 \pm 4442.53	TPM 142.86 \pm 53.45	

6.4.2 MONITORIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE NIVELES PRE-DOSIS DE CBZ Y TPM EN PACIENTES CON EPILEPSIA

En la figura 10 se muestran las concentraciones al tiempo pre-dosis de CBZ y TPM por paciente. Adicionalmente, se muestran las concentraciones plasmáticas de LEV cuantificadas en los pacientes incluidos en este estudio y bajo tratamiento con este FAE, pero que forman parte de otro trabajo de investigación. En dicha figura, para los pacientes que no aparece algún resultado registrado, significa que el valor encontrado fue menor al LIC. En el gráfico a) se observa que 4 pacientes (13.8%) tratados con CBZ mostraron niveles pre-dosis por debajo del intervalo terapéutico, 3 de ellos tratados en monoterapia con CBZ (barras color verde) y 1 con la concomitancia CBZ-TPM (barras color amarillo). Para TPM, gráfica b) 8 pacientes (34.85%) obtuvieron concentraciones plasmáticas por debajo del intervalo de referencia; 5 de ellos en concomitancia CBZ-TPM (barras color morado) y 3 paciente con TPM-LEV (barras color anaranjado). Por otra parte, para la concomitancia TPM-LEV solo 3 pacientes se encontraron por debajo del intervalo de referencia de LEV y 3 por arriba del mismo (gráfica c).

Los resultados del análisis estadístico para la monitorización de CBZ y TPM en los 3 grupos de pacientes se presentan en la Tabla 19.

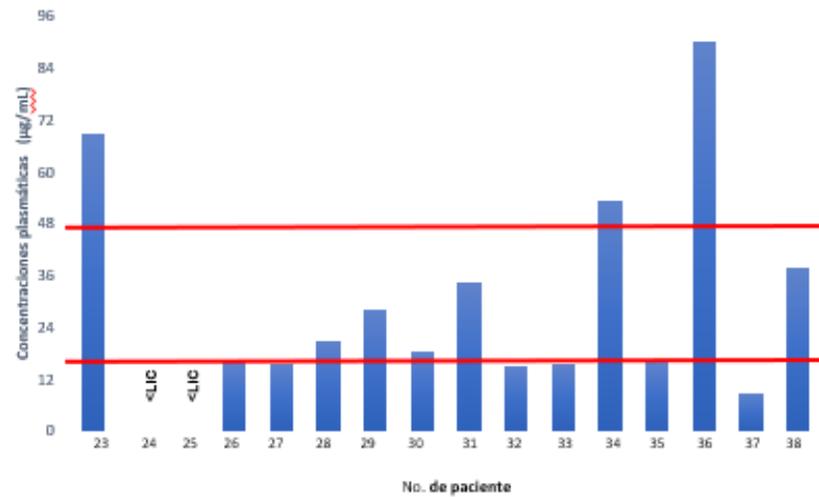
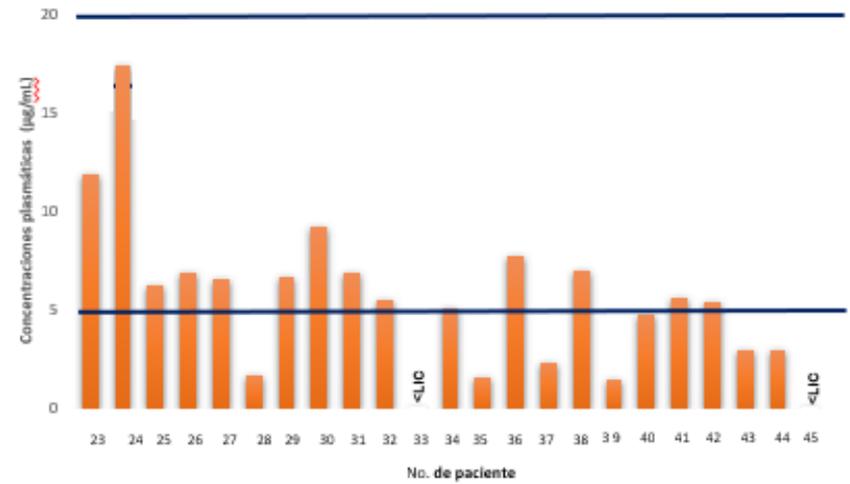
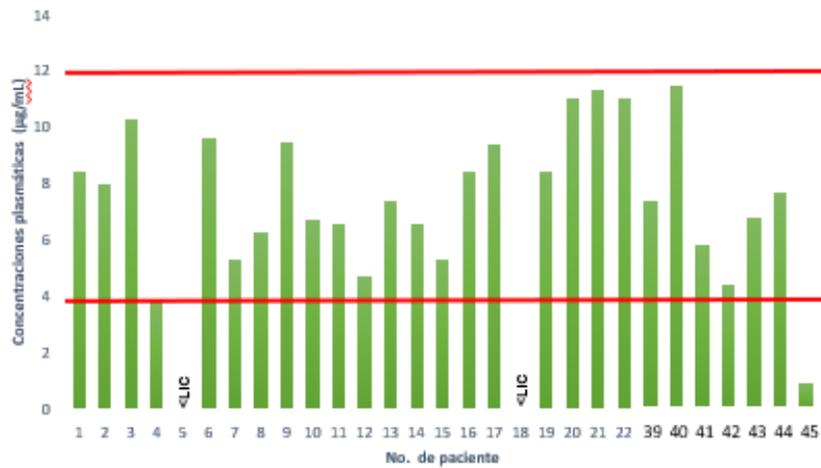


Figura 10. Concentraciones plasmáticas pre-dosis de a) CBZ, b) TPM y c) LEV en pacientes con epilepsia.

**Las líneas horizontales representan el intervalo terapéutico de cada fármaco. CBZ monoterapia (barras color verde) y concomitancia CBZ-TPM (barras color amarillo). TPM en concomitancia CBZ-TPM (barras color morado) y concomitancia TPM-LEV (barras color anaranjado).*

Tabla 19. Comparación estadística de las concentraciones pre-dosis de FAE's entre los grupos de pacientes con epilepsia

Análisis descriptivo para las concentraciones de FAE's en los grupos de estudio					
	Grupo 1 n=22	Grupo 2 n=16		Grupo 3 n=7	
	CBZ	TPM	LEV	CBZ	TPM
Dosis recomendada (mg)	200	100	1000	200	100
Dosis media (mg) ± DE	309 ± 79.67	131.25 ± 80.74	1250 ± 442.53	335.71 ± 113.39	142.86 ± 53.45
Conc. media (µg/mL)	7.18	6.4	27.28	6.36	3.27
DE (µg/mL)	3.14	4.21	24.67	3.25	2.1
Mínimo (µg/mL)	<LIC	<LIC	<LIC	0.9	<LIC
Máximo (µg/mL)	11.3	17.4	90	11.5	5.6
Análisis estadístico para concentraciones de CBZ y TPM entre los grupos de estudio					
Parámetro analizado	Grupos de estudio		Valor de p		
Concentración de CBZ	Gpo 1 vs Gpo 3		0.878		
Concentración de TPM	Gpo 2 vs Gpo 3		0.362		

Al realizar la comparación estadística para el promedio de las concentraciones pre-dosis de CBZ entre los grupos 1 y 3, no se encontró diferencia significativa entre estos valores ($p > 0.05$). Este resultado es de esperar dado que, TPM no altera la disposición de CBZ en pacientes bajo este tratamiento concomitante (13).

Por otro lado, en los grupos 2 y 3, la concentración media de TPM disminuyó 56% en los pacientes con tratamiento simultáneo con CBZ, comparado con aquellos que recibieron LEV como tratamiento concomitante. Lo anterior podría ser consecuencia de la inducción metabólica que ejerce CBZ sobre TPM al administrarse simultáneamente (16). No obstante, debido al limitado número de pacientes en tratamiento con TPM en el grupo 3, no fue posible encontrar una diferencia significativa para esta notable disminución de los niveles plasmáticos en ambos grupos de estudio.

6.4.3 GENOTIPIFICACIÓN DE PACIENTES CON EPILEPSIA

Los resultados del fenotipo metabolizador para cada enzima: (E = metabolizador extensivo, I = metabolizador intermedio, P = metabolizador pobre), se muestran en la tabla 20.

Se puede observar que, para cada una de las enzimas metabolizadoras de los fármacos en los 3 grupos de estudio, el fenotipo metabolizador predominante fue el intermedio. Derivado de lo anterior, se esperaría que las concentraciones pre-dosis de CBZ y TPM estén dentro del margen terapéutico, sin embargo, debido a la inducción metabólica que ejerce la CBZ sobre el TPM, puede existir una disminución en las concentraciones de éste (16). Por otro lado, solamente en el grupo tratado con CBZ se observa predominancia de metabolizadores extendidos (54.2%) para la enzima CYP2C9*2, la cual se identifica por su alta actividad en el metabolismo de este FAE (29). Esta situación podría generar una eliminación de CBZ más rápida en los pacientes con este fenotipo, lo que llevaría a necesitar dosis más altas de CBZ para un tratamiento eficaz (29).

Tabla 20. Resultados de la genotipificación para las enzimas del CYP450 por grupo de estudio

	CBZ			TPM-LEV			CBZ-TPM		
	Metabolizador	No. de pacientes	%	Metabolizador	No. de pacientes	%	Metabolizador	No. de pacientes	%
CYP3A4*22	E	6	27.3	E	5	31.3	E	0	0.0
	I	16	72.7	I	11	68.8	I	6	85.7
	P	0	0.0	P	0	0.0	P	1	14.3
CYP3A5*3	E	7	31.8	E	7	43.8	E	0	0.0
	I	14	63.6	I	8	50.0	I	6	85.7
	P	1	4.5	P	1	6.3	P	1	14.3
CYP2C19*2	E	1	4.5	E	1	6.3	E	0	0.0
	I	13	59.1	I	11	68.8	I	5	71.4
	P	8	36.4	P	4	25.0	P	2	28.6
CYP2C19*17	E	1	4.5	E	2	13	E	0	0.0
	I	15	68.2	I	8	50.0	I	4	57.1
	P	6	27.3	P	6	37.5	P	3	42.9
CYP2C9*2	E	12	54.5	E	6	37.5	E	2	28.6
	I	7	31.8	I	10	62.5	I	4	57.1
	P	3	13.6	P	0	0.0	P	1	14.3

6.4.4 ASOCIACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE NIVELES PLASMÁTICOS PRE-DOSIS DE CBZ Y TPM CON EL FENOTIPO METABOLIZADOR Y CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS DE PACIENTES CON EPILEPSIA

A través de un análisis bivariado no se encontró una asociación entre las concentraciones plasmáticas pre-dosis de CBZ y el fenotipo metabolizador en cada uno de los pacientes ($p > 0.05$) (tabla 21).

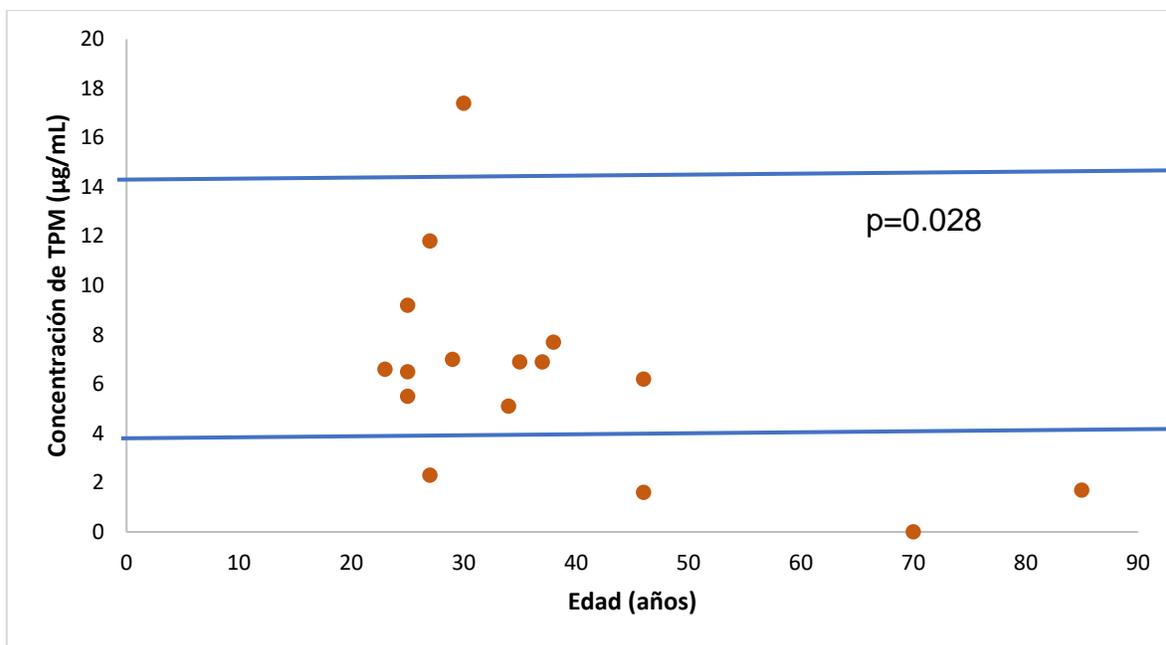
Solamente en el grupo tratado con CBZ-TPM se identificó una asociación de las concentraciones pre-dosis de TPM con el fenotipo metabolizador, en función de los haplotipos en las enzimas CYP2C19*17 y CYP2C9*2 ($p = 0.024$, $p = 0.007$, respectivamente).

Tabla 21. Análisis bivariado entre concentraciones plasmáticas pre-dosis de cada FAE y el fenotipo metabolizador de las enzimas CYP450

Concentración media ($\mu\text{g/mL}$)	Valor de p				
	CYP3A4*22	CYP3A5*3	CYP2C19*2	CYP2C19*17	CYP2C9*2
CBZ (n=22)					
7.18	0.175	0.799	0.386	0.16	0.2
TPM-LEV (n=16)					
TPM					
6.4	0.582	0.061	0.231	0.566	0.874
CBZ-TPM (n=7)					
CBZ					
6.36	0.696	0.057	0.733	0.399	0.638
TPM					
3.27*	0.868	0.088	0.534	0.024*	0.007*

* $p < 0.05$

Por otro lado, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los niveles plasmáticos pre-dosis de TPM y la edad de los pacientes ($p = 0.028$) (figura 11). En los demás casos, no fue posible demostrar asociaciones adicionales, lo cual posiblemente está vinculado al reducido número de participantes en el estudio.



*Líneas azules: rango terapéutico de TPM

Figura 11. Asociación estadística entre la concentración plasmática pre-dosis de TPM y la edad de los pacientes del grupo TPM-LEV

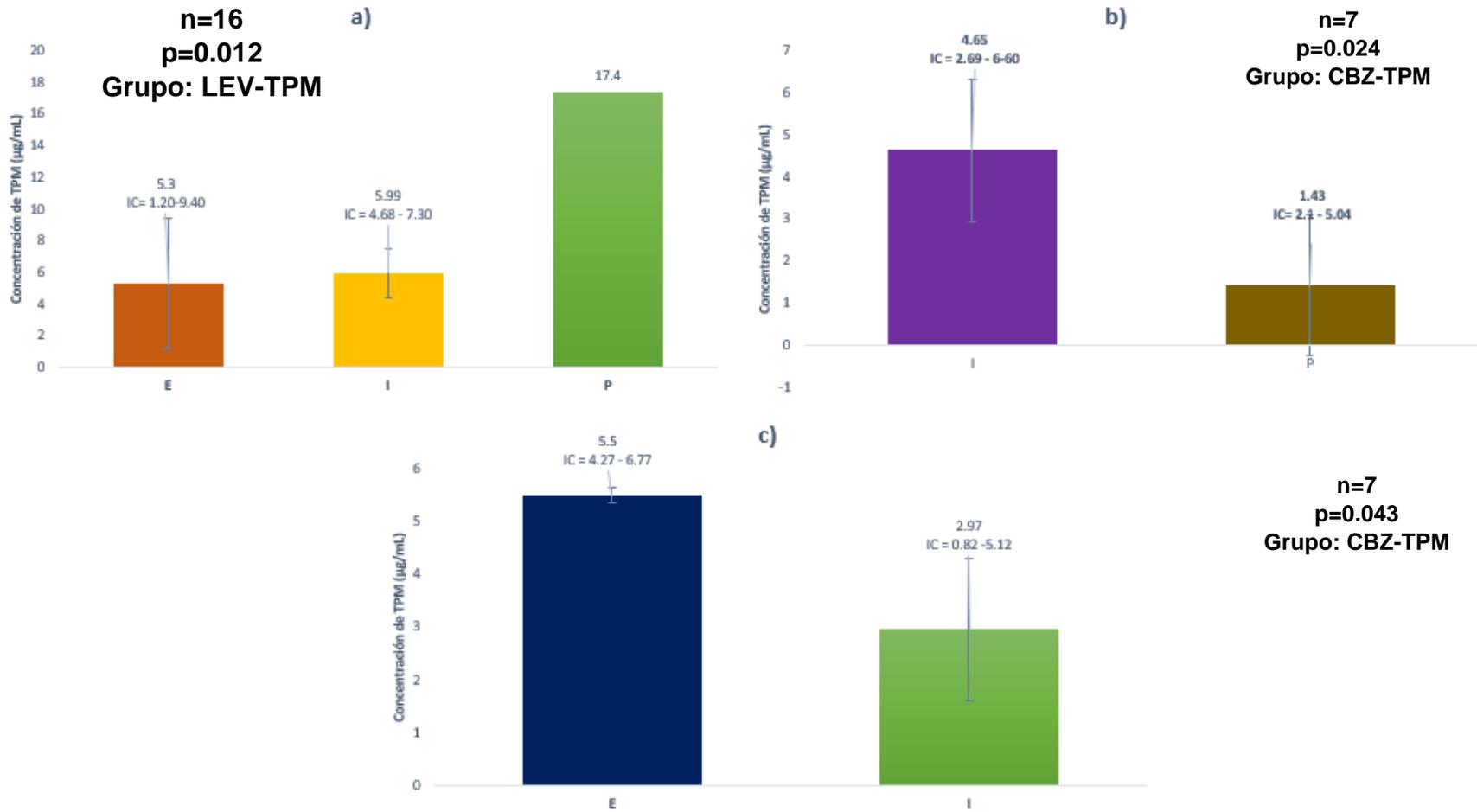
6.4.5 COMPARACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS PRE-DOSIS DE CBZ Y TPM CON EL FENOTIPO METABOLIZADOR DE LAS ENZIMAS CYP450.

Se analizaron las concentraciones pre-dosis de CBZ y TPM con los diversos fenotipos metabolizadores de las enzimas CYP3A4*22, CYP3A5*3, CYP2C9*2, CYP2C19*2 y CYP2C19*17. La clasificación de los fenotipos fue: metabolizador extendido, intermedio y pobre para estos polimorfismos. En la figura 12 se presentan la media y desviación estándar (DE) de las concentraciones pre-dosis de TPM en µg/mL, el intervalo de confianza al 95% (IC 95%), y la significancia estadística del ANOVA.

A través de este análisis se encontró una asociación significativa en el grupo de TPM-LEV para las concentraciones pre-dosis de TPM en función del fenotipo metabolizador pobre de la enzima CYP3A5*3. En este caso, los valores de concentraciones de TPM fueron mayores que en los pacientes con fenotipo metabolizador extensivo e intermedio (27).

En lo que respecta al grupo de CBZ-TPM, se detectaron diferencias significativas para las concentraciones pre-dosis de TPM en función del fenotipo metabolizador

intermedio y pobre para la enzima CYP2C19*17, sin embargo, contrario a lo que se esperaba encontrar, se observaron mayores concentraciones pre-dosis de TPM para el fenotipo intermedio en comparación con el pobre. La misma situación se observó para CYP2C9*2 ya que se registraron mayores niveles de TPM en pacientes con el fenotipo extendido que con el intermedio. Este tipo de resultados puede atribuirse al limitado número de pacientes que fueron medicados únicamente con TPM.



Metabolizador extensivo (E), metabolizador intermedio (I), metabolizador pobre (P),
 Intervalo de confianza al 95% (IC), significancia estadística (p)

Figura 12. Concentraciones plasmáticas medias de TPM en la pre-dosis según el fenotipo metabolizador CYP3A5*3, b) CYP2C19*17, c) CYP2C9*2

6.4.6 ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS PRE-DOSIS DE CADA FAE Y LAS CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DE LOS PACIENTES CON EPILEPSIA

Mediante un análisis multivariado se examinó la posible asociación estadística entre las variables antropométricas, la dosis administrada de cada fármaco en los pacientes (grupo CBZ: 329.55 mg, grupo TPM: 129.69 mg, grupo CBZ-TPM: CBZ = 342.86 mg y TPM = 142.86) y los polimorfismos de las enzimas CYP450 encargadas de su metabolismo con las concentraciones pre-dosis de CBZ y TPM, respectivamente. De esta forma se encontró que la dosis de CBZ fue la única variable con significancia estadística para los valores de sus concentraciones plasmáticas pre-dosis, y lo mismo sucedió con el nivel plasmático pre-dosis de TPM el cual se relacionó estadísticamente con la dosis administrada al paciente. En la tabla 22 se encuentra el modelo de regresión lineal para CBZ y TPM.

Tabla 22. Modelos de regresión lineal para concentraciones plasmáticas de CBZ y TPM

Variable dependiente: Conc. pre-dosis CBZ ($\mu\text{g/mL}$)				
Variable independiente: Dosis de CBZ (mg)				
Modelo				
Constante	r	r ²	b	P
-0.754	0.855	0.731	0.009	0.014
Variable dependiente: Conc. pre-dosis TPM ($\mu\text{g/mL}$)				
Variable independiente: Dosis de TPM (mg)				
Modelo				
Constante	r	r ²	b	P
1.960	0.659	0.434	0.17	0.006

Coefficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r²), pendiente (b) y significancia estadística (p)

7. CAPÍTULO VII

7.1 DISCUSIÓN

Existen diversas metodologías actualmente aplicadas para la monitorización farmacocinética y farmacogenética de CBZ y TPM con la finalidad de optimizar la farmacoterapia en pacientes con epilepsia. El desarrollo de técnicas de bioanálisis y de biología molecular es indispensable para la correcta interpretación de las concentraciones plasmáticas, considerando las manifestaciones clínicas de cada paciente. En el presente estudio se implementó una técnica analítica por UPLC-MS/MS para la cuantificación de CBZ y TPM en plasma, así como una técnica molecular por PCR tiempo real para evaluar los polimorfismos de las enzimas que metabolizan dichos fármacos.

Por un lado, la cuantificación simultánea de las concentraciones plasmáticas de FAE's de primera y segunda línea que se administran de manera concomitante, requiere del desarrollo y optimización de una técnica de bioanálisis práctica y confiable (14).

Habitualmente, existen técnicas de inmunoanálisis que permiten la cuantificación rápida de algunos FAE's, incluyendo los ensayos de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoenzimáticos (EMIT o CEDIA), turbidimétricos (PETINIA) y de quimioluminiscencia (CMI); estos ensayos, generalmente automatizados, se utilizan en la práctica clínica para la cuantificación rápida de ciertos FAE's, pero carecen de especificidad debido a la reactividad cruzada con compuestos endógenos. Actualmente, existen técnicas cromatográficas que permiten la versatilidad de las técnicas de bioanálisis al permitir la cuantificación de varios analitos de manera simultánea, siempre y cuando compartan características fisicoquímicas que permitan su elución y detección en una misma corrida analítica (37,38,39,40).

De manera rutinaria, el fármaco CBZ es cuantificado individualmente mediante FPIA, EMIT o CEDIA en equipos automatizados como el Architect, Aeroset, Axsym, TDX y Viva E. En el caso de TPM, existen ensayos de las mismas características pero que no se encuentran disponibles en los equipos automatizados de uso clínico. Por otro lado, existen reportes de cuantificación individual de TPM y CBZ por HPLC convencional con detección ultravioleta. La incorporación de detectores de espectrometría de masas en tándem ha revolucionado el análisis de fármacos en fluidos biológicos por cromatografía líquida (LC-MS) por su rapidez, versatilidad, sensibilidad, exactitud y precisión. En tal caso, la LC-MS se posiciona en la actualidad como la técnica idónea para su implementación en el laboratorio de bioanálisis (30).

En el presente trabajo, para el desarrollo de la técnica LC-MS se tomaron como referencia los métodos reportados por Karinen (45) y Liu (52), en los cuales se

cuantifican de manera simultánea ambos analitos, por lo que se buscó reproducir y optimizar las especificaciones de la técnica analítica y así poder emplearla en la monitorización farmacoterapéutica del paciente con tratamiento antiepiléptico.

Además de las condiciones señaladas por los autores mencionados, se evaluaron diferentes tipos de columnas, entre las que destaca la columna Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.7 μm , 2.1 mm x 100 mm), la cual consta de una fase completa de sílice de alta resistencia unida a un ligando C18, material compatible con fases móviles acuosas y diseñado para retener y separar moléculas pequeñas e hidrosolubles, como es el caso de TPM y CBZ (40). Además de presentar un alto rendimiento, este tipo de columna proporciona mejor forma de los picos para los compuestos básicos, presenta mayor capacidad de retención y excelente estabilidad a pH bajo. De manera simultánea, se buscó la optimización del gradiente de elución, así como la selección del solvente orgánico (metanol o acetonitrilo) para asegurar la simetría y definición del pico cromatográfico para ambos analitos y mantener tiempos de retención de corrida totalmente razonables (39). En los métodos de referencia se reportan tiempos de corrida de 8.5 min y 6.5 min, aproximadamente.

Se evaluaron tanto los sistemas de bombeo isocrático como en gradiente; sin embargo, debido a la baja polaridad de los analitos, fue necesario asegurar la adecuada retención de TPM y CBZ al inicio de la corrida analítica y utilizar un gradiente inicial con un alto porcentaje de fase acuosa, para posteriormente, aumentar de forma gradual la fase orgánica. En consecuencia, el tiempo de retención de cada analito, es un reflejo de las ligeras diferencias en polaridad entre estos compuestos (TPM>CBZ). Lo anterior, dio como resultado un tiempo total de 6 min para cada corrida analítica.

A pesar de que los tiempos de retención difieren con menos de un minuto de diferencia entre ambos analitos, no fue necesaria una mayor separación cromatográfica entre CBZ y TPM dada la diferencia entre las transiciones m/z entre sí, sin detección cruzada, lo que permitió la monitorización de transiciones únicas para cada compuesto en modo MRM (53).

Las ventajas del método desarrollado radican en:

- La disminución del flujo a 0.3 mL/min, en comparación con el método de Karinen (45) de 0.5 mL/min y el de Liu (52) de 0.4 mL/min;
- La disminución del volumen de inyección de la muestra, de 5 μL utilizados por los dos métodos a 2 μL utilizados en el presente método.

- La facilidad de preparación de la fase móvil, consistente de ácido fórmico 0.1% en agua y acetonitrilo, en comparación con el método de Karinen (45) que utiliza buffer de bicarbonato de amonio y metanol y en contraste al de Liu (52) que prepara dos mezclas: acetato de amonio 5mM en agua y acetato de amonio 5mM en acetonitrilo. El uso de metanol como parte de la fase móvil, compromete la vida útil de las columnas cromatográficas debido a la tendencia a incrementar la presión del sistema.

Las matrices biológicas recomendadas para la cuantificación de FAE's son el suero y el plasma sanguíneo, siempre y cuando se compruebe la ausencia de interacciones con el anticoagulante utilizado. El pretratamiento de la muestra plasmática constituye uno de los pasos críticos antes de su inyección a un sistema LC-MS. Una muestra plasmática contiene una gran cantidad de compuestos endógenos los cuales pueden suprimir la señal analítica e incrementar el nivel de incertidumbre durante la cuantificación, además, puede disminuir la vida útil de las columnas cromatográficas y otros componentes del sistema, tales como el puerto de inyección, válvulas, sellos, pistones y tuberías (38).

Por lo anterior, es importante contar con un método de extracción simple y eficiente con la finalidad de minimizar el tiempo de procesamiento de las muestras. El acetonitrilo fue el solvente de elección como agente precipitante debido a que prácticamente no muestra efecto de supresión iónica al analizar cualquier analito compatible por ESI-MS. En la metodología desarrollada, se añadió acetonitrilo al plasma en una proporción 2:1 para la precipitación de proteínas presentes en la matriz biológica, lo cual resultó en un proceso de extracción simple con excelentes porcentajes de recobro de los analitos. Para favorecer la forma simétrica de los picos durante el análisis cromatográfico y reducir el efecto matriz, el sobrenadante fue evaporado y resuspendido en fase móvil antes de la inyección al sistema analítico (40). Antes de realizar la validación formal del ensayo se evaluaron diferentes factores de dilución y resuspensión durante el proceso de extracción. Las condiciones previamente descritas, mostraron los mejores resultados en términos de simetría de pico, intervalo de la curva de calibración y efecto matriz (40).

Después de que el método de extracción y cuantificación de TPM y CBZ por UPLC-MS/MS en muestras plasmáticas fue completamente estandarizado y optimizado, se desarrolló su validación bajo los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013. Dado que se cumplieron con los criterios previamente establecidos bajo la normativa vigente, se consideró que el método implementado es aceptable para el análisis cromatográfico de muestras de pacientes con TPM y CBZ que requieran de un proceso de monitorización e individualización de la terapia con estos FAE's (42).

En lo que corresponde al estudio de genotipificación para la evaluación de los SNP's de las enzimas del CYP450 que metabolizan a TPM y CBZ, fue necesario disponer

de técnicas moleculares especializadas para el análisis del material genético de los pacientes con epilepsia. En consecuencia, se implementó la técnica de PCR para identificar los polimorfismos asociados a las enzimas metabólicas CYP3A4*22, CYP3A5*3, CYP2C19*2, CYP2Ct19*17 y CYP2C9*2.

La técnica molecular por PCR en tiempo real mediante tecnología Taqman, utiliza gradientes de temperatura para amplificar segmentos de ADN, y combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (33). La técnica de genotipificación fue estandarizada para las sondas C__59013445_10, C__26201809_30, C_25625805_10, C__25986767_70 y C____469857_10 a través de la aplicación de diversas condiciones analíticas para determinar el número de ciclos de amplificación y temperatura adecuados para cada una de ellas. Estas pruebas fueron comparadas con las de otros reportes bibliográficos (14, 26, 27, 33). Finalmente, la técnica quedó estandarizada a 50 ciclos de amplificación, con una temperatura de 60°C, agregando a la reacción 3 µL de máster mix, 2 µL de ADN y 0.7 µL de la sonda TaqMan®. Las condiciones de la PCR tiempo real fueron estandarizadas de modo que todas las sondas se emplearon bajo las mismas condiciones documentadas (10, 13, 27, 29, 40). Lo anterior aportó al presente trabajo un alto grado de especificidad para el estudio de los diferentes polimorfismos genéticos asociados a las enzimas de la familia CYP.

La participación de pacientes en el estudio clínico estuvo limitada, particularmente en el grupo medicado con CBZ-TPM en el cual sólo se registraron 7 personas, en comparación a la estimación de 17 pacientes por grupo que se hizo para el protocolo inicial respecto al tamaño de muestra (55). Esta limitante estuvo lejos de resolverse ante las actuales condiciones sanitarias por la pandemia relacionada al SARS COVID-19. Por indicaciones de las autoridades del Hospital, no se prestaron servicios de consulta externa incluyendo la Clínica de Epilepsia y por ello la gran dificultad para tener acceso a los pacientes con epilepsia.

A través de la metodología analítica implementada, fue posible determinar las concentraciones plasmáticas pre-dosis de TPM en presencia de CBZ o de LEV en pacientes con epilepsia y en tratamiento por lo menos durante dos semanas.

En el presente estudio, el grupo tratado con TPM-LEV obtuvo una concentración media para TPM de 6.4 µg/mL mientras que en el grupo tratado con CBZ-TPM registró un valor de 3.27 µg/mL. Como puede observarse, existe una evidente disminución de TPM en presencia de CBZ, hecho que ya ha sido reportado por otros autores tales como Mimrod y cols. (16), al señalar que su grupo en monoterapia con TPM presentó concentraciones de este FAE entre 7 y 8 µg/mL, mientras que el grupo tratado con CBZ-TPM reportó concentraciones de TPM de 4 a 5 µg/mL (13, 26, 37). Los autores señalaron que los niveles subterapéuticos de TPM en la

concomitancia de CBZ-TPM pueden ser atribuidos al proceso de inducción metabólica que ejerce el uso constante de CBZ (6,7,9). Britzi y cols. (17) en el mismo año corroboraron que la excreción urinaria de los metabolitos de TPM era mayor si los pacientes con epilepsia eran tratados con esta concomitancia. Por su parte, Adín y cols. en 2004 (48) demostraron que la dosis de TPM en pacientes adultos debía ser el doble de la administrada si estaban en tratamiento acompañado con un FAE inductor del metabolismo como CBZ (13, 26, 37). En los datos del presente estudio, se observó que los niveles plasmáticos de TPM fueron menores en un 56% en el grupo TPM-CBZ con relación al grupo TPM-LEV, a pesar de no haber una diferencia significativa atribuida al limitado número de pacientes del grupo CBZ-TPM. En consecuencia, es importante considerar un adecuado ajuste de dosis para este fármaco en este tipo de pacientes.

Mediante el análisis bivariado se encontró que los fenotipos metabolizadores de las enzimas CYP2C19*17 y CYP2C9*2 son variables con significancia estadística asociadas con las concentraciones de TPM en el grupo tratado CBZ-TPM. En estudios anteriores, Xie y cols. (50) y Sie y cols. (51) encontraron metabolizadores pobres en los pacientes portadores de polimorfismos en dichas enzimas involucradas en el metabolismo de TPM, sin embargo, estos autores no midieron los niveles plasmáticos de los FAE's para evaluar el grado de asociación entre dichas variables. (18).

Adicionalmente, se encontró que las concentraciones plasmáticas pre-dosis de TPM mostraron una tendencia a disminuir con la edad de los pacientes. Al respecto, se considera importante evaluar otros factores tales como la adherencia al tratamiento en pacientes con epilepsia y la edad en adultos, dado que este es un problema grave de salud en el tratamiento de enfermedades crónicas en pacientes de edad avanzada (54).

Solamente se identificó que al comparar los niveles pre-dosis de TPM en el grupo de TPM-LEV, éstos fueron mayores en los pacientes de metabolismo pobre en comparación con los pacientes con fenotipo metabolizador extendido e intermedio para la enzima CYP3A5*3, hecho que está reportado por autores como Lee y cols. (27).

En el análisis multivariado se logró observar que las concentraciones pre-dosis de CBZ y de TPM están en función de la respectiva dosis administrada.

Es importante aclarar que los procesos de monitorización clínica consisten en determinar los niveles plasmáticos en el tiempo que se reportan las máximas concentraciones, con el fin de establecer la ubicación de éstas en el intervalo terapéutico de referencia (34, 37), aunque la mayoría de los fármacos deben ser monitorizados en pre-dosis especialmente aquellos donde el analista solo puede

tomar una muestra. No obstante, y en vista de que los pacientes ya habían iniciado el tratamiento por lo menos con 2 semanas de anterioridad, se realizó este estudio con la mayoría de las muestras tomadas en tiempo pre-dosis.

Dada la limitación del número de pacientes incorporados en el presente estudio, en general, no se observó una clara evidencia de la influencia de los polimorfismos genéticos asociados a las enzimas CYP sobre los niveles plasmáticos de los FAE's. Por lo anterior, se sugiere incrementar el tamaño de la muestra en cada grupo de pacientes para estudios posteriores.

Ante la amplia variabilidad de las concentraciones plasmáticas de los FAE's, es importante desarrollar estudios de monitorización farmacocinética y farmacogenética de estos fármacos y las enzimas involucradas en su disposición. Es imprescindible describir las principales características clínicas y genéticas que predisponen a niveles subterapéuticos de FAEs para establecer estrategias de ajuste en el tratamiento, que permitan optimizar la terapia con antiepilépticos.

8. CAPÍTULO VIII

8.1 CONCLUSIONES

- El método analítico por UPLC-MS/MS fue estandarizado en plasma para cuantificar de forma simultánea CBZ y TPM. Conforme a la NOM-177-SSA1-2013 el método fue lineal en el intervalo de 0.6 a 20 µg/mL para cada analito. Es preciso y exacto para los controles de calidad de baja, media y alta concentración; sin efecto de acarreo o de matriz al analizar las muestras. Los controles de calidad fueron estables en 3 ciclos congelación–descongelación y en dos días de almacenamiento.
- La técnica molecular por PCR en tiempo real fue estandarizada empleando sondas TaqMan® a temperatura de 60°C y 50 ciclos de amplificación. Esta técnica está disponible para realizar estudios a partir del material genético de pacientes, con la finalidad de lograr la identificación de los polimorfismos de las enzimas *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* y *CYP2C19* asociados al metabolismo de CBZ y TPM.
- Se aplicaron los métodos anteriores para la respectiva monitorización de TPM y CBZ en pacientes bajo tratamiento con estos fármacos y para la genotipificación de polimorfismos genéticos de las enzimas CYP que participan en su metabolismo.
- No se encontró diferencia significativa en las concentraciones pre-dosis de TPM en concomitancia con CBZ al comparar con los pacientes que recibieron TPM-LEV. Se registró una importante disminución de 56% de los niveles plasmáticos de TPM en presencia de CBZ, lo cual puede deberse al efecto inductor de ésta sobre el metabolismo de TPM.
- Las Cp de CBZ y TPM son una función directa de las dosis administradas. Se logró identificar una asociación estadística entre las concentraciones en plasma de TPM con el fenotipo metabolizador de las enzimas *CYP2C19**17 ($p=0.024$) y *CYP2C9**2 ($p=0.007$) en los pacientes con tratamiento de CBZ-TPM.
- Los métodos analíticos implementados podrán ser aplicados en estudios farmacocinéticos y farmacogenéticos y en procedimientos de monitorización terapéutica durante el tratamiento de los pacientes con epilepsia.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. El abordaje de la epilepsia en el sector de la salud. Washington D.C: *Organización Panamericana de la Salud*; 2018.
2. OMS. Epilepsia 2019 [Available from: <https://www.who.int/topics/epilepsy/es/>].
3. Bender del Busto JE. La epilepsia, un problema de salud a escala mundial. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2018;17(5):660-3.
4. Maestú F, Martín P, Sola R, Ortiz T. Neuropsicología y deterioro cognitivo en la epilepsia. *Rev neurol*. 1999;28(8):793-8.
5. Ildefonso RL. Farmacoterapia racional en epilepsia. *Rev Mex Neuroci*. 2011;12(2):87-94.
6. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676-85.
7. Lopez González R. Epilepsia, tratamiento farmacológico y su monitoreo. *Revista Cúpula*. 2016;30(2):44-53.
8. Rubio F, Reséndiz J, Senties H, Alonso M, Salgado P, Ramos J. Programa prioritario de epilepsia. México: *Secretaría de Salud*; 2007.
9. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *The Lancet*. 2019.
10. Fisiopatología de la epilepsia. *Boletín de Información Clínica Terapéutica de la ANMM*. 2016;59.
11. Reina AG-N, Morales IG. y fisiopatología de la epilepsia. *Medicine*. 2007;9(75):4806-13.
12. Pascual FH, Izquierdo AY. Tratamiento de la epilepsia. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2019;12(72):4232-42.
13. Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, Van Rijn CM. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia*. 2002;43(4):365-85.
14. Mula M. Anticonvulsants-antidepressants pharmacokinetic drug interactions: the role of the CYP450 system in psychopharmacology. *Current drug metabolism*. 2008;9(8):730-7.
15. Roco Arriagada AM, Quiñones Sepúlveda L, Miranda Melo CE, Squicciarini Rueda V, Agúndez J, García Martín E, et al. *Farmacogenética en el laboratorio clínico ¿un lujo o una necesidad en Latinoamérica?* 2009.
16. Mimrod D, Specchio LM, Britzi M, Perucca E, Specchio N, Neve AL, et al. A comparative study of the effect of carbamazepine and valproic acid on the pharmacokinetics and metabolic profile of topiramate at steady state in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2005;46(7):1046-54.
17. Britzi M, Perucca E, Soback S, Levy RH, Fattore C, Crema F, et al. Pharmacokinetic and metabolic investigation of topiramate disposition in healthy subjects in the absence and in the presence of enzyme induction by carbamazepine. *Epilepsia*. 2005;46(3):378-84.
18. Carbamazepina DrugBank2020 [Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00564>].
19. Carbamazepina PubChem2020 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2554>].
20. Carbamazepina Vademecun IQB2020 [Available from: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/c015.htm>].
21. Topiramato DrugBank2020 [Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00273>].
22. Lopez-Garcia MA, Feria-Romero IA, Fernando-Serrano H, Escalante-Santiago D, Grijalva I, Orozco-Suarez S. Genetic polymorphisms associated with antiepileptic metabolism. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2014;6:377-86.

23. Patsalos P. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacology & therapeutics*. 2000;85(2):77-85.
24. Ficha técnica. Levetiracetam 2020 [Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/74893/P_74893.pdf.
25. Świąder M, Kotowski J, Gašior M, Kleinrok Z, Czuczwar SJ. Interaction of topiramate with conventional antiepileptic drugs in mice. *European journal of pharmacology*. 2000;399(1):35-41.
26. Hesselink DA, van Schaik RH, Van Der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJS, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2003;74(3):245-54.
27. Lee JS, Cheong HS, Kim LH, Kim JO, Seo DW, Kim YH, et al. Screening of genetic polymorphisms of CYP3A4 and CYP3A5 genes. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2013;17(6):479-84.
28. Pharmacogene Variation Consortium PharmaVar2020 [Available from: <https://www.pharmvar.org/genes>.
29. Prior-González LA, Garza-González E, de la Fuente HF. Farmacogenética y su importancia clínica: hacia una terapia personalizada segura y eficiente. *Medicina Universitaria*. 2011;13(50):41-9.
30. Daly AK, Rettie AE, Fowler DM, Miners JO. Pharmacogenomics of CYP2C9: functional and clinical considerations. *Journal of personalized medicine*. 2018;8(1):1.
31. Seredina TA, Goreva OB, Talaban VO, Grishanova AY, Lyakhovich VV. Association of cytochrome P450 genetic polymorphisms with neoadjuvant chemotherapy efficacy in breast cancer patients. *BMC medical genetics*. 2012;13(1):45.
32. Kim DW, Lee SK, Chu K, Jang I-J, Yu K-S, Cho J-Y, et al. Lack of association between ABCB1, ABCG2, and ABCC2 genetic polymorphisms and multidrug resistance in partial epilepsy. *Epilepsy research*. 2009;84(1):86-90.
33. Polimorfismos de relevancia farmacogenética de las familias 1a2, 2c y 3a en población indígena del noroeste de México. *Tesis Doctoral*. Universidad de Extremadura; 2012.
34. Jacob S, Nair AB. An updated overview on therapeutic drug monitoring of recent antiepileptic drugs. *Drugs in R&D*. 2016;16(4):303-16.
35. Tratamiento farmacológico de las epilepsias São Paulo: *Leitura Medica*; 2014.
36. Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, Calvo M, Farre M, García B, et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farmacia Hospitalaria*. 2011;35(6):326-39.
37. Krasowski MD. Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications. *Pharmaceuticals*. 2010;3(6):1909-35.
38. Técnicas Cromatográficas. México UNAM; 2007.
39. Cromatografía líquida de alta eficacia [Available from: https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf.
40. Guía del Sistema biológico ACQUITY UPLC H-Class. 2010.
41. Validación de métodos analíticos 2002 [Available from: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf.
42. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de

- biocomparabilidad. México2013 [Available from: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013.
43. Castillo Aguilar B, González Hernández R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista cubana de farmacia*. 1996;30(1).
44. Parámetros estadísticos [Available from: http://docencia.udea.edu.co/cen/MetodosNumericos/capitulo5/parametros_estadisticos.html.
45. Karinen R, Vindenes V, Hasvold I, Olsen KM, Christophersen AS, Øiestad E. Determination of a selection of anti-epileptic drugs and two active metabolites in whole blood by reversed phase UPLC-MS/MS and some examples of application of the method in forensic toxicology cases. *Drug testing and analysis*. 2015;7(7):634-44.
46. Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsura T, Yano I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. *Biomedical Chromatography*. 2012;26(12):1519-28.
47. Marcos M. Determinação de medicamentos antiepilépticos e anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS. *Tesis Doctoral*. 2011.
48. Adín J, Gómez MC, Blanco Y, Herranz JL, Armijo JA. Topiramate serum concentration-to-dose ratio: influence of age and concomitant antiepileptic drugs and monitoring implications. *Therapeutic drug monitoring*. 2004;26(3):251-7.
49. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*. 2005;11(1-2):333-8.
50. Xie, Hong-Guang, et al. "CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance." *Advanced drug delivery reviews* 54.10 (2002): 1257-1270.
51. Sim, Sarah C. "A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 79.1 (2006): 103-113.
52. Liu, H.; Delgado, M.R. Therapeutic drug concentration monitoring using saliva samples. Focus on anticonvulsants. *Clin. Pharmacokinet*. 1999, 26, 453-470. 53. Yoshimura, Yusuke. "Identification of conjugation positions of urinary glucuronidated vitamin D3 metabolites by LC/ESI-MS/MS after conversion to MS/MS-fragmentable derivatives." *Biomedical Chromatography* 33.7 (2019): e4538.
54. Ramos Morales, Luisa Estela. "La adherencia al tratamiento en las enfermedades crónicas." *Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vasculat* 16.2 (2015): 175-189.
55. Aguilar-Barojas S. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*. 2005;11(1-2):333-8.