



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo de un modelo PBPK para  
Clonazepam con aplicaciones forenses

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGA

PRESENTA

Paula Alicia Grandini Rosales



CDMX

2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Francisco Hernández Luis**

**VOCAL:**               **Profesor: José Fausto Rivero Cruz**

**SECRETARIO:**       **Profesora: María Elena Bravo Gómez**

**1°. SUPLENTE:**       **Profesor: Antonio Elías Kuri Pineda**

**2° SUPLENTE:**       **Profesora: María Rosa González Tepale**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE, LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE,  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. María Elena Bravo Gómez**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. en C. Luz Alejandra Castillo Alanis**

## **SUSTENTANTE (S):**

**Paula Alicia Grandini Rosales**

## **Agradecimientos**

A CONACyT, Convocatoria 2014 de Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, Solicitud 247925, por el apoyo económico que permitió realizar este proyecto.

## Abreviaturas

EDO: Ecuación diferencial ordinaria

GUI: Interfaz gráfica de usuario

IV: Intravenoso(a)

IVIVE: Extrapolación *in vivo-in vitro*

PBPK: Modelo Farmacocinético Basado en la Fisiología

PK: Farmacocinética/o

SNC: Sistema Nervioso Central

WST: Tanque bien agitado

EDO: Ecuación diferencial ordinaria

EFS: Extracción en fase sólida

LC: Cromatografía de líquidos

## Parámetros fisiológicos

Parámetro	Abreviatura	Unidades
Coeficiente de partición tejido:sangre	$P_T$	
Gasto cardíaco total	$Q_C$	L/min
Flujo sanguíneo en el tejido	$Q_T$	L/min
Volumen del tejido	$V_T$	L

## Subíndices empleados en el modelo PBPK

cer: Cerebro

ha: Arteria hepática

r: Riñones

hv: Vena hepática

h: Hígado (Total)

b: Bazo

int: Intestino

p: Piel

cor: Corazón

fa: Adiposo

pul: Pulmón

a: Sangre arterial

m: Músculo

v: Sangre venosa

hu: Hueso

### Parámetros farmacocinéticos

Vd: volumen de distribución

CL<sub>r</sub>: aclaramiento renal

t<sub>1/2</sub>: tiempo de vida media

### Símbolos

Unidad SI	Término
cm	Centímetros
kg	Kilogramos
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
L	Litros
mL	Mililitros
°C	Grados centígrados
h	horas
min	minutos
s	segundos

## Índice de contenido

1. Introducción.....	6
1.1. Objetivos .....	8
1.1.1. Objetivo general.....	8
1.1.2. Objetivos particulares .....	8
1.2. Hipótesis .....	8
2. Antecedentes .....	9
2.1. Modelos farmacocinéticos.....	9
2.1.1. Modelos compartimentales .....	11
2.1.1.1. Modelos compartimentales tradicionales .....	12
2.1.2. Modelos no-compartimentales.....	15
1.2. Modelos farmacocinéticos basados en la fisiología (PBPK).....	15
1.2.1. Construcción de modelos PBPK .....	18
1.2.2. Ecuaciones matemáticas utilizadas en los modelos PBPK .....	21
1.2.3. Parámetros necesarios para los modelos PBPK.....	22
1.2.4. Softwares para el desarrollo de modelos PBPK.....	24
1.2.5. Ventajas y limitaciones de los modelos PBPK .....	25
1.2.6. Aplicaciones de los modelos PBPK.....	26
2.3. Clonazepam .....	28
2.3.1. Propiedades generales y usos.....	28
2.3.2. Farmacocinética.....	32
2.3.2.1. Absorción .....	32
2.3.2.2. Distribución .....	33
2.3.2.3. Metabolismo y excreción .....	33

2.3.3. Farmacodinamia .....	35
2.3.4. Interés forense .....	37
3. Metodología .....	39
3.1. Construcción del modelo PBPK .....	39
3.1.1. Parametrización del modelo .....	43
3.1.2. Simulación in silico.....	48
3.2. Farmacocinética <i>in vivo</i> del Clonazepam.....	48
3.2.1. Experimentación con animales .....	48
3.2.2. Toma de muestras .....	49
3.2.3. Determinaciones analíticas .....	50
3.2.3.1. Preparación de la muestra .....	50
3.2.3.1.1. Muestras de sangre .....	50
3.2.3.2. Muestras de cerebro .....	51
3.3.2. Cuantificación de Clonazepam por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.....	52
3.3.2.1. Instrumentación .....	52
3.3.2.2. Condiciones cromatográficas.....	52
3.3.2.3. Condiciones para espectrometría de masas.....	52
3.3.2.4. Cuantificación del analito .....	53
4. Resultados .....	54
4.1. Modelo PBPK.....	54
4.2 Farmacocinética <i>in vivo</i> .....	56
5. Discusión.....	58
6. Conclusiones.....	63
7. Referencias .....	65

## Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros fisiológicos típicos para los modelos PBPK en diferentes especies .....	23
Tabla 2. Parámetros fisiológicos específicos para rata (250g y Gasto cardiaco total, $Q_c$ de 0.055L/min). .....	43
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos específicos del Clonazepam, para el modelo PBPK en rata.....	44
Tabla 4. Parámetros de composición de los tejidos. ....	46
Tabla 5. Datos fisiológicos recopilados y calculados sobre las células sanguíneas, para el cálculo de $K_{aBC}$ .....	47
Tabla 6. Cálculo de los coeficientes de partición tejido:plasma de Clonazepam, usando el modelo planteado por Rodgers et al. 2005 .....	47
Tabla 7. Muestras a obtener por cada tiempo de muestreo en la experimentación con ratas.....	50
Tabla 8. Parámetros calculados con los resultados del modelo PBPK construido para Clonazepam en rata. ....	56
Tabla 9. Parámetros calculados con los resultados de la farmacocinética in vivo del Clonazepam en rata. ....	57

## Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de modelos farmacocinéticos .....	10
Figura 2. Esquema general de los modelos compartimentales.....	11
Figura 3. Modelos compartimentales tradicionales. ....	14
Figura 4. Modelo farmacocinético basado en la fisiología de todo el cuerpo. ....	17
Figura 5. Desarrollo de un modelo PBPK.....	20
Figura 6. Estructura química del Clonazepam.....	28
Figura 7. Biotransformación del Clonazepam.....	34
Figura 8. Estructura del receptor GABA <sub>A</sub> .....	35
Figura 9. Representación esquemática de los diferentes sitios de unión en el receptor GABA <sub>A</sub> .....	36
Figura 10. Sinapsis GABAérgica .....	37
Figura 11. Topología propuesta de órganos y tejidos del modelo PBPK para Clonazepam de 13 compartimentos en rata y en humano .....	40
Figura 12. Diagramas de modelo de un compartimento limitado por el flujo sanguíneo, para los órganos no eliminadores (a) y para los órganos que eliminan al fármaco (b) .....	41
Figura 13. Curva de calibración para Clonazepam .....	53
Figura 14. Curva farmacocinética para sangre venosa de rata construida a partir de la simulación <i>in silico</i> del modelo PBPK para Clonazepam.....	54
Figura 15. Curva farmacocinética para cerebro de rata construida a partir de la simulación <i>in silico</i> del modelo PBPK para Clonazepam .....	54
Figura 16. Curvas farmacocinéticas construidas a partir de la simulación <i>in silico</i> del modelo PBPK para Clonazepam .....	55

Figura 17. Curva farmacocinética <i>in vivo</i> del Clonazepam en sangre venosa. ....	56
Figura 18. Curva farmacocinética <i>in vivo</i> del Clonazepam en cerebro.....	57
Figura 19. Ajuste del modelo PBPK para Clonazepam con base en la farmacocinética descrita <i>in vivo</i> en sangre venosa .....	61
Figura 20. Ajuste del modelo PBPK para Clonazepam con base en la farmacocinética descrita <i>in vivo</i> en cerebro .....	62

## 1. Introducción

Actualmente, el uso de sustancias psicotrópicas representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel nacional e internacional. De acuerdo al World Drug Report 2013, México mantiene una alta prevalencia en el consumo no médico de tranquilizantes y sedantes comparado con otros países, con una prevalencia anual en la población general del 7.8 % (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, 2013).

Las muertes ocasionadas por sustancias de abuso pueden deberse a sobredosis, pero también a cambios en el comportamiento relacionados con su uso que lleven a actos de violencia o imprudenciales. En 2014 se calculó que el número de muertes relacionadas con las sustancias de abuso fue de alrededor de 207400, es decir, 43.5 muertes por millón de personas de entre 15 y 64 años (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, 2016).

En relación a esto, en el informe del 2014 del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de las Adicciones (SISVEA), el Servicio Médico Forense indica que en el país, del total de defunciones en que se sospechan que sucedieron bajo el efecto de alguna sustancia, el alcohol tiene una frecuencia de 79.6%, la cocaína 4.8%, la marihuana 3.7% y tranquilizantes 6.4% (Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud & Epidemiología, 2015). En el mismo caso para el año 2015 la frecuencia de los tranquilizantes se reporta del 12.6% (Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud & Epidemiología, 2016), finalmente para el 2016 los tranquilizantes presentan una prevalencia del 17.4% (Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud & Epidemiología, 2016). Con lo anterior se puede observar un aumento en la frecuencia de los tranquilizantes para los casos de defunciones que se sospecha sucedieron bajo el efecto de alguna sustancia de abuso.

A nivel mundial, a mayoría de los detenidos por delitos relacionados con drogas o sospechosos de haberlos cometido son hombres; la participación de mujeres varía

según el tipo de sustancia y refleja sus preferencias de consumo. El porcentaje más elevado de detenidas o sospechosas se observa en delitos relacionados con sedantes y tranquilizantes (el 25%) (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, 2014).

El problema de las drogas se convierte en un problema de seguridad, y surge la necesidad de conocer si el acto delictivo se atribuye al uso de alguna sustancia de abuso, pues esta atribución es complicada, ya que existe una gran variabilidad interindividual (diferencias genéticas, psicológicas, pato-fisiológicas o ambientales) tanto en la respuesta de la droga y su toxicidad, como en las concentraciones después de la administración de la misma dosis.

Aunque se han desarrollado numerosos métodos para realizar pruebas toxicológicas en diferentes matrices biológicas (Frederick, 2012; Huestis y Smith, 2006), no se cuenta con métodos validados que permitan discernir el tiempo transcurrido desde el último consumo de una sustancia (excepto para Cannabis) en un dopaje positivo (Huestis, et. al., 2005; Lowe, et al., 2009) y son pocos los modelos que permiten estimar la concentración plasmática de las sustancias de abuso a partir de otras matrices biológicas, por estas razones el presente trabajo pretende encontrar relaciones matemáticas entre las concentraciones de la sustancia que permitan construir un modelo matemático para poder predecir su concentración en diferentes órganos y tejidos.

Para lograr el objetivo, se emplearán modelos farmacocinéticos basados en constantes fisiológicas (PBPK), los cuales consisten en una serie de representaciones matemáticas de los tejidos y procesos fisiológicos en el cuerpo que simulan la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los xenobióticos que entran al organismo. Estos modelos, bien diseñados, permiten la extrapolación inter-especies, la estimación de la variabilidad intra-especie, la extrapolación entre rutas de administración, el ajuste de la duración de la exposición y extrapolaciones entre dosis altas y bajas (U.S.Environmental Protection Agency (EPA), 2006).

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general.**

Desarrollar un modelo matemático para Clonazepam a partir de parámetros fisiológicos, fisicoquímicos y bioquímicos, para poder predecir la concentración de la sustancia en diferentes tejidos con respecto al tiempo.

### **1.1.2. Objetivos particulares**

- Recopilar en una base de datos los parámetros fisiológicos para rata, así como las constantes fisicoquímicas y bioquímicas para Clonazepam
- Especificar la estructura del modelo PBPK seleccionando los órganos y tejidos que se incluirán.
- Representar el modelo PBPK mediante ecuaciones diferenciales ordinarias y desarrollarlas *in silico*.
- Construir curvas toxicocinéticas tradicionales para la sustancia de abuso con los datos obtenidos de la experimentación con ratas Wistar.
- Determinar el tiempo en que se presentan las concentraciones plasmáticas máximas y conocer la cinética de eliminación de la sustancia.
- Validar el modelo realizando los estudios toxicocinéticos *in vivo* empleando animales de experimentación.

## **1.2. Hipótesis**

El modelo PBPK construido con parámetros fisiológicos, fisicoquímicos y bioquímicos específicos, y por las ecuaciones diferenciales ordinarias de los compartimentos seleccionados resueltas correctamente, permitirá describir los procesos toxicocinéticos del Clonazepam en distintos tejidos de forma comparable con la cinética realizada *in vivo*.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Modelos farmacocinéticos**

La Farmacocinética es la rama de la farmacología que se dedica al estudio del transcurso de un fármaco en el cuerpo (Aarons, 2005). Una hipótesis fundamental de la farmacocinética es que existe una relación entre la respuesta farmacológica o tóxica a un fármaco y la concentración del fármaco en la sangre, lo cual permite establecer ecuaciones matemáticas para describir los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco (Peng, Cheung, 2009).

Cuando estas relaciones matemáticas se vuelven más complejas, entonces se habla de modelos que describen la farmacocinética de una sustancia (Bonate, 2006). La complejidad del modelo farmacocinético planteado dependerá de la vía de administración, la magnitud y duración de la distribución en distintos líquidos y tejidos corporales, los procesos de eliminación y la aplicación que se intenta dar al modelo (Gennaro, 2000).

Para evaluar la utilidad de los modelos farmacocinéticos estos deben ser juzgados por tres puntos de vista: retrodicción, predicción y comprensión. La retrodicción es la capacidad de recordar lo que sucedió en un experimento: ¿el modelo es consistente con el conocimiento experimental? El modelo también debe ser predictivo. ¿Qué pasará en futuros experimentos? Y por último, ¿el modelo incrementa nuestra comprensión del sistema primario bajo estudio? (Rescigno, et. al., 1987).

Algunas otras propiedades que debe poseer un modelo farmacocinético son (Bonate, 2006):

1. Capacidad de caracterizar los datos observados e incluir las características más importantes de los datos.
2. Validado por observaciones empíricas.
3. Robusto a pequeños cambios en los datos.

4. Nivel adecuado de precisión y detalle.
5. Lo más sencillo posible.
6. Puede permitir la extrapolación fuera del rango de datos.

Los modelos farmacocinéticos que cumplen con estas características son ampliamente empleados en la farmacología y tienen una gran cantidad de usos, entre los que se encuentran (Gennaro, 2000):

1. Predicción de la concentración de droga en sangre/plasma o tejidos.
2. Cálculo de un régimen de dosificación.
3. Determinación cuantitativa del efecto de una enfermedad sobre la disponibilidad de la droga.
4. Dilucidación de los mecanismos de las alteraciones inducidas por la enfermedad sobre la disponibilidad de la droga.
5. Determinación de los mecanismos de las interacciones entre drogas.
6. Predicción de la relación entre la concentración de la droga y el efecto.

Existen varias clasificaciones para los modelos farmacocinéticos, una de ellas consiste en el modelado basado en compartimentos (Holz y Fahr, 2001) y el modelado no basado en compartimentos (Veng-Pedersen, 2001) (Figura 1).

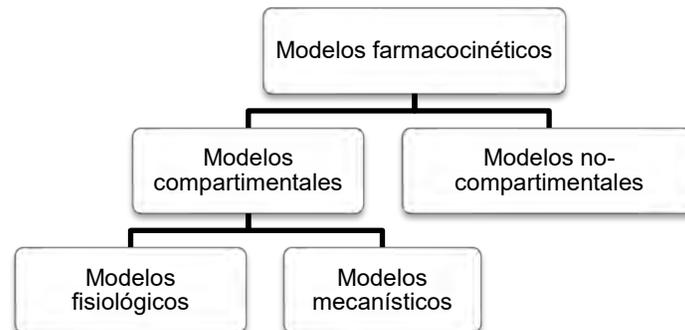


Figura 1. Clasificación de modelos farmacocinéticos

### 2.1.1. Modelos compartimentales

Los modelos compartimentales pueden a su vez clasificarse en modelos fisiológicos y modelos mecánicos. Los modelos fisiológicos se basan en compartimentos bien definidos y estructurados interconectados por el flujo sanguíneo, flujo linfático u otros flujos bioquímicos, y son los modelos más completos (Holz y Fahr, 2001). Los modelos mecánicos pueden relacionar los procesos fisiológicos, pero no reflejan necesariamente todas las entidades funcionales del organismo, estos pueden subdividirse en: modelo mamilar; consiste en un compartimiento central que interactúa con varios compartimentos periféricos que lo rodean y modelo catenario; comprende una cadena de compartimentos interconectados (Peng y Cheung, 2009) (Figura 2).

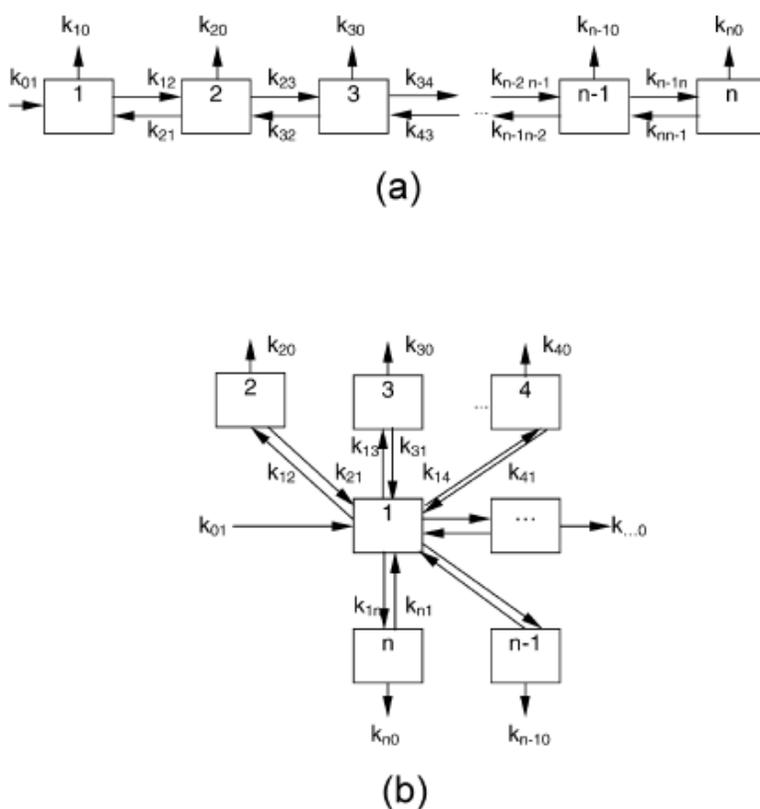


Figura 2. Esquema general de los modelos compartimentales. (a) Modelo catenario. (b) Modelo mamilar. En el esquema cada uno de los compartimentos se representa mediante una caja y el transporte de la sustancia es representado por las flechas con sus respectivas constantes. Recuperado de Henry Peng, Bob Cheung (2009) A review on pharmacokinetic modeling and the effects of environmental stressors on pharmacokinetics for operational medicine: operational pharmacokinetics, Defence R&D Canada.

### **2.1.1.1. Modelos compartimentales tradicionales**

Para poder simplificar y entender los procesos de absorción, distribución, y eliminación de un fármaco, en el organismo humano se suelen considerar tres compartimentos de acuerdo a la velocidad con que el fármaco o sustancia química los ocupa y los abandona (Flórez, 2014):

a) Compartimento central: que considera el agua plasmática, intersticial e intracelular fácilmente accesible, por lo que involucra a los tejidos altamente irrigados, como el corazón, pulmones, hígado, riñón, glándulas endocrinas y el SNC en algunos casos.

b) Compartimento periférico superficial: que incluye el agua intracelular poco accesible, es decir, a los tejidos pobremente irrigados, tales como la grasa, los músculos, la piel, la médula ósea y depósitos celulares (proteínas y lípidos) a los que la sustancia química se une laxamente.

c) Compartimento periférico profundo: formado por los depósitos tisulares donde la sustancia química o fármaco permanece durante más tiempo debido a su afinidad.

Para simular la cinética de distribución y la cinética de eliminación de un fármaco se pueden construir tres tipos de modelo (Figura 3):

1. El monocompartimental, que considera que el cuerpo y todos sus tejidos y líquidos son parte de un solo compartimento, asumiendo que el fármaco se distribuye rápida y uniformemente por todo el organismo (Flórez, 2014), es decir, que la absorción, el metabolismo y la excreción son directamente proporcionales a la concentración del fármaco en el compartimento desde el que se produce la transferencia. Por ello, este modelo es muy deficiente, pues no considera que la irrigación sanguínea, el coeficiente de reparto de la sustancia química y la permeabilidad de los capilares a la misma sustancia sean muy distintos en cada órgano, tales como el cerebro, la grasa corporal y los músculos (Rang, 2008).

2. El modelo bicompartimental, donde la distribución del fármaco o sustancia química administrado por vía I.V. en el compartimento central es rápida, y en el compartimento periférico es lenta. La mayoría de los fármacos se pueden adaptar a estos modelos (Floréz, 2014).
  
3. El modelo tricompartmental ayuda a describir la fuerte unión de los fármacos a determinados tejidos en los que se acumulan y que se liberan con lentitud (Floréz, 2014). El principio del diseño de un modelo tricompartmental es análogo al del modelo bicompartimental, con la diferencia en que se asume la existencia de dos compartimentos periféricos, superficial y profundo existiendo diferencias en la velocidad de distribución del fármaco (Rang, 2008).

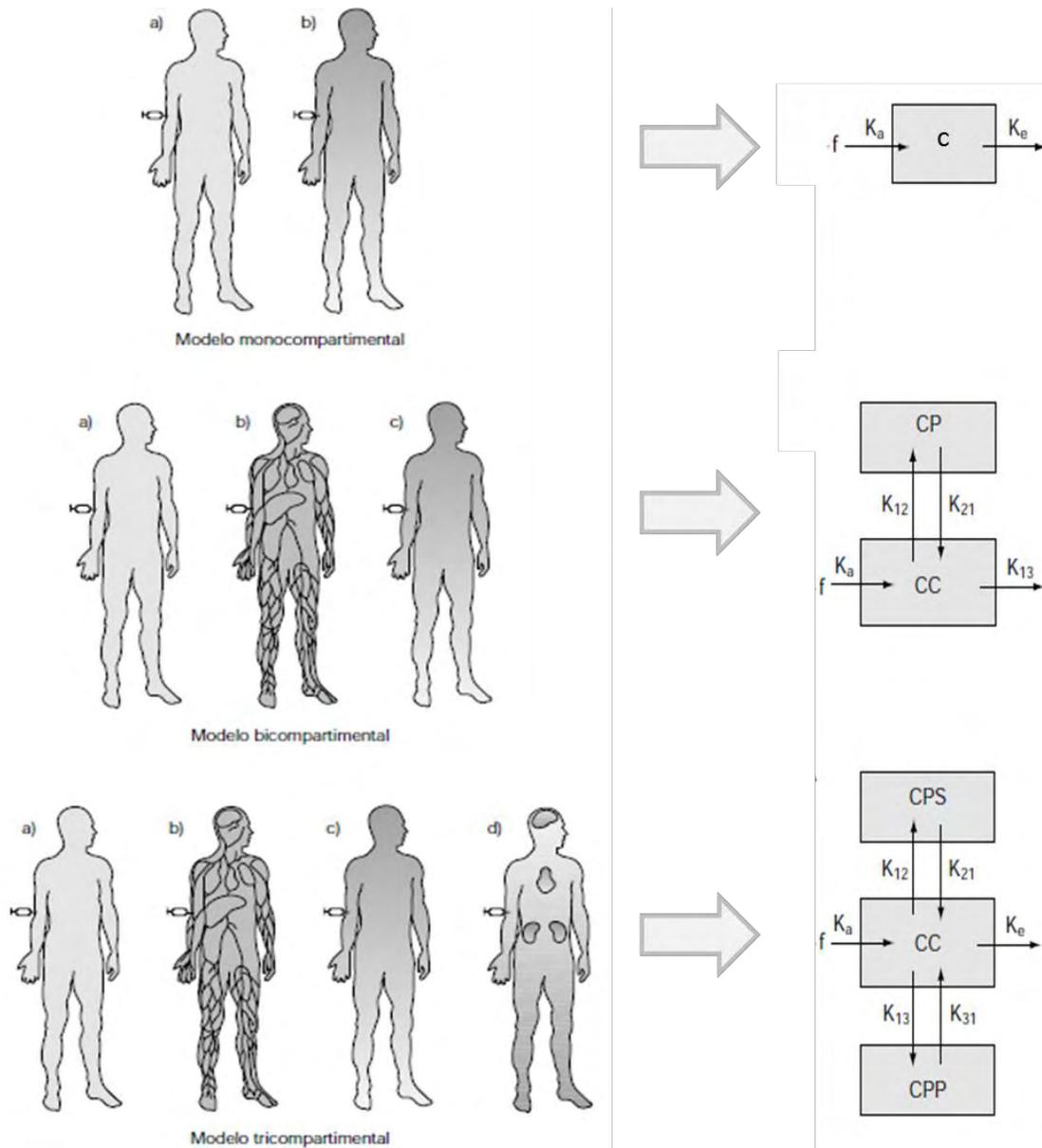


Figura 3. Modelos compartimentales tradicionales. A la izquierda se representa la manera en que se distribuye el fármaco o sustancia química en el organismo y a la derecha se esquematizan los compartimentos con cuadros, con flechas se indican el sentido y la velocidad de transferencia de la sustancia, se muestran las constantes farmacocinéticas que intervienen. Modelo monocompartimental: a) antes de la administración y b) después de la administración. El esquema de un solo compartimento indica la dosis del fármaco,  $f$ , la concentración del fármaco en el compartimento,  $C$ , y las constantes de absorción y eliminación del fármaco,  $K_a$  y  $K_e$ . Modelo bicompartimental: b) el fármaco difunde a los órganos altamente irrigados; c) se llega a un equilibrio en el resto del organismo. El esquema del modelo incluye la concentración del fármaco en el compartimento central (CC) y en el compartimento periférico (CP), y las constantes de proporcionalidad entre los dos compartimentos,  $K_{12}$  y  $K_{21}$ . Modelo tricompartmental: d) acumulación en los órganos a los que el fármaco se une fuertemente. En el esquema del modelo se adiciona otro cuadro para distinguir la concentración en el compartimento periférico superficial (CPS) y la del periférico profundo (CPP), así como las constantes de transferencia del fármaco entre este último compartimento y el central,  $K_{13}$  y  $K_{31}$ . Recuperado de Flórez J. (1989). *Farmacología Humana*. 3ª Edición. España: Masson SAS.

### **2.1.2. Modelos no-compartimentales**

Los modelos no-compartimentales se basan en principios de análisis de sistemas lineales en lugar de estructuras anatómicas o propiedades fisiológicas (Veng-Pedersen 2001). Se utilizan principalmente para: (1) estimar parámetros farmacocinéticos; (2) describir la relación entre la tasa de entrada y la concentración de fármaco sistémico resultante y (3) describir una fase terminal en el curso de un fármaco (Peng y Cheung, 2009).

Aunque son útiles para la descripción de datos y la interpolación, los modelos no compartimentales no toman mucha consideración sobre la fisiología y por lo tanto los parámetros del modelo no tienen ninguna interpretación fisiológica. Debido a eso, es difícil predecir y extrapolar la farmacocinética con estos modelos cuando se producen cambios fisiológicos. Sin embargo, pueden complementarse con los modelos farmacocinéticos fisiológicos, en el sentido de que proporcionan métodos matemáticos generales aplicables (Gillespie 1991).

### ***1.2. Modelos farmacocinéticos basados en la fisiología (PBPK)***

Fueron introducidos por Haagard en 1924 (Peng y Cheung, 2009). Los modelos PBPK emulan la estructura del organismo vivo que se está estudiando y representan los diversos órganos y tejidos como compartimentos en el modelo que están conectados a través de un circuito de circulación sanguínea que se subdivide en grupos arteriales y venosos (Figura 4) (Khalil y Läer, 2011).

Los modelos PBPK y los modelos farmacocinéticos tradicionales pertenecen al conjunto más general de los modelos compartimentales, ya que ambos dividen el organismo en varias subunidades, denominadas "compartimentos" (Anderson, 1983). Es erróneo hacer una distinción entre un modelo compartimental y un modelo PBPK, la verdadera diferencia radica en que en los modelos PBPK los compartimentos representan los espacios reales de tejidos, órganos y volúmenes

físicos donde los procesos fisiológicos, fisicoquímicos y bioquímicos se describen matemáticamente (Nestorov, 2003).

Existen tres tipos de modelos PBPK:

- Modelos PBPK de cuerpo entero utilizando un concepto de circulación en bucle cerrado (Figura 4) (Nestorov, 2003).
- Los modelos PBPK parciales de sistemas corporales aislados (por ejemplo, miembros posteriores perfundidos, tracto gastrointestinal, etc.) (Willmann, Schmitt et al., 2004);
- Los modelos PBPK metabólicos que describen la eliminación hepática de fármacos usando parámetros fisiológicos y bioquímicos (por ejemplo, flujo sanguíneo hepático, eliminación intrínseca, unión a proteínas, etc.) (Liu y Pang, 2006).

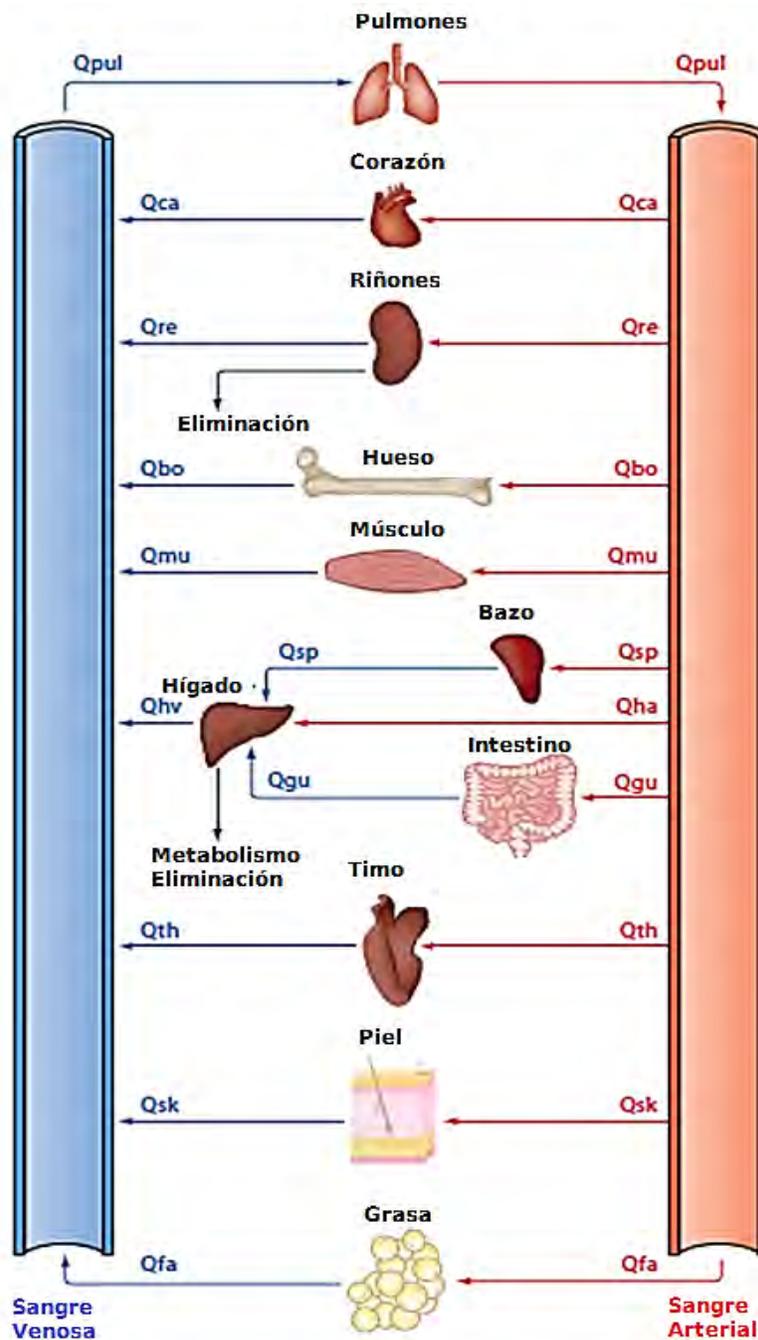


Figura 4. Modelo farmacocinético basado en la fisiología de todo el cuerpo. Q se refiere al flujo de sangre: para los pulmones ( $Q_{pul}$ ), el corazón ( $Q_{ca}$ ), los riñones ( $Q_{re}$ ), los huesos ( $Q_{bo}$ ), los músculos ( $Q_{mu}$ ), el bazo ( $Q_{sp}$ ), el hígado ( $Q_{ha}$ ), el vena hepática ( $Q_{hv}$ ), el intestino ( $Q_{gu}$ ), el timo ( $Q_{th}$ ), la piel ( $Q_{sk}$ ), y la grasa ( $Q_{fa}$ ). La entrada puede ser de cualquier sitio del cuerpo. La eliminación se representa como que ocurre solamente de hígado y los riñones, mientras que se puede producir también en otros sitios para algunos medicamentos. Algunos medicamentos pueden sufrir recirculación enterohepática. El modelo se puede ampliar para incluir un modelo similar para metabolitos formados. Recuperado de Rowland M, Peck C, Tucker G. (2011). *Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science*.

### 1.2.1. Construcción de modelos PBPK

Como cualquier otro modelo farmacocinético, los modelos PBPK se desarrollan con el fin de organizar y describir la información disponible sobre los procesos cinéticos relacionados con la fármaco en un organismo. Basado en la información disponible (datos y conocimientos) (Nestorov, 2003). El procedimiento de desarrollo de un modelo de PBPK de cuerpo entero no difiere sustancialmente de una secuencia de modelado general y puede resumirse en los siguientes pasos (Nestorov, 2007) (Figura 5):

1. Definir el propósito del modelo.
2. Especificar la estructura del modelo (tejidos y órganos que se incluirán).
3. Escritura y codificación de ecuaciones.
4. Especificación y/o estimación de los parámetros del modelo.
5. Validación del modelo.
6. Aplicación del modelo.

La estructura de un modelo PBPK debe: i) derivarse de la estructura anatómica del organismo, identificando los compartimentos entre los órganos del cuerpo y el sistema; y ii) corresponden al propósito de modelado.

No existe una regla general para determinar la estructura y el nivel de complejidad necesarios para la aplicación de un modelado particular. Por lo tanto, se tiene que decidir qué elementos se deben incluir en la estructura del modelo para una sustancia química y además tener en claro la aplicación específica que se busca. En este contexto, se suele aplicar un concepto conocido como parsimonia, que se refiere a que el modelo sea lo más simple como sea posible, es decir, minimizando el número de parámetros, utilizando únicamente los que sean necesarios, pues entre más complejo se vuelva el modelo, más difícil se hace su validación (Clewell, et. al., 2007). Para seleccionar la estructura del modelo se debe tomar en cuenta el nivel de detalle en el transporte del fármaco y las descripciones del metabolismo, la inclusión de rutas de exposición química y el agrupamiento de los órganos y tejidos (Rowland, 2011) (Espíe, 2009). La base natural para la elección de los

compartimentos son los datos disponibles sobre la anatomía y la fisiología del sistema biológico desde el nivel celular hasta el cuerpo entero. Sin embargo, esto no determina por sí mismo cuántas regiones del cuerpo, o compartimentos, son necesarios, la elección también depende del propósito del modelo y de las propiedades físico-químicas y farmacológicas del fármaco modelado (Khalil y Läer, 2011).

Para la simplificación del modelo se hace necesaria la agrupación de los órganos, que se puede llevar a cabo por dos caminos: “lumping” o “splitting”. El primero se basa en que "Los tejidos farmacocinéticamente y toxicológicamente indistinguibles pueden agruparse", y los grupos más comunes de encontrar son los órganos altamente perfundidos, y los órganos pobremente perfundidos. Por el otro lado, el “splitting” se basa en que "Los tejidos que son farmacocinéticamente o toxicológicamente distintos deben ser separados", por lo que se reduce la inversión de la recopilación de datos y suele ser más eficiente al comenzar con menos compartimentos (Clewel, et. al., 2011).

Siempre que se considere necesario y justificado el “lumping” de tejidos, éste debe ejecutarse sobre la base de principios formales, de manera que se preserve la pertinencia cinética del modelo. El principio del “lumping” de tejidos en el modelado PBPK se formuló por primera vez en 1998, afirmando que sólo los tejidos con cinéticas similares deben agruparse y sugiriendo relaciones para calcular algunos de los parámetros de los compartimentos agrupados a partir de los parámetros de los tejidos involucrados. El enfoque presentado fue probado y ampliado por Bjorkman (Bjorkman, 2003). Recientemente, se han propuesto métodos formales para el “lumping” de tejidos (Brochot, et. al., 2005), basados en las derivaciones de la teoría del sistema lineal originalmente aplicado a la cinética química (Nestorov, 2007).

El siguiente paso en el desarrollo de un modelo PBPK es la parametrización del modelo: los valores de todos los parámetros del modelo deben especificarse tanto en la especie animal experimental como en la humana. Se debe determinar la fuente de cada valor de parámetro utilizado en el modelo, incluyendo si se obtuvo de la

literatura, se determinó directamente por experimento separado, o se estimó ajustando el modelo a datos experimentales. Se prefieren las estimaciones de parámetros independientes de los datos de los tiempos de los tejidos o de la respuesta a la dosis (Clewell, 1995).

Ya establecidos todos los parámetros se procede a la resolución del conjunto de ecuaciones planteadas y después su validación mediante la obtención de datos experimentales, es decir, que se efectúa una extrapolación *in vitro-in vivo* (IVIVE) (Clewell, 1995).

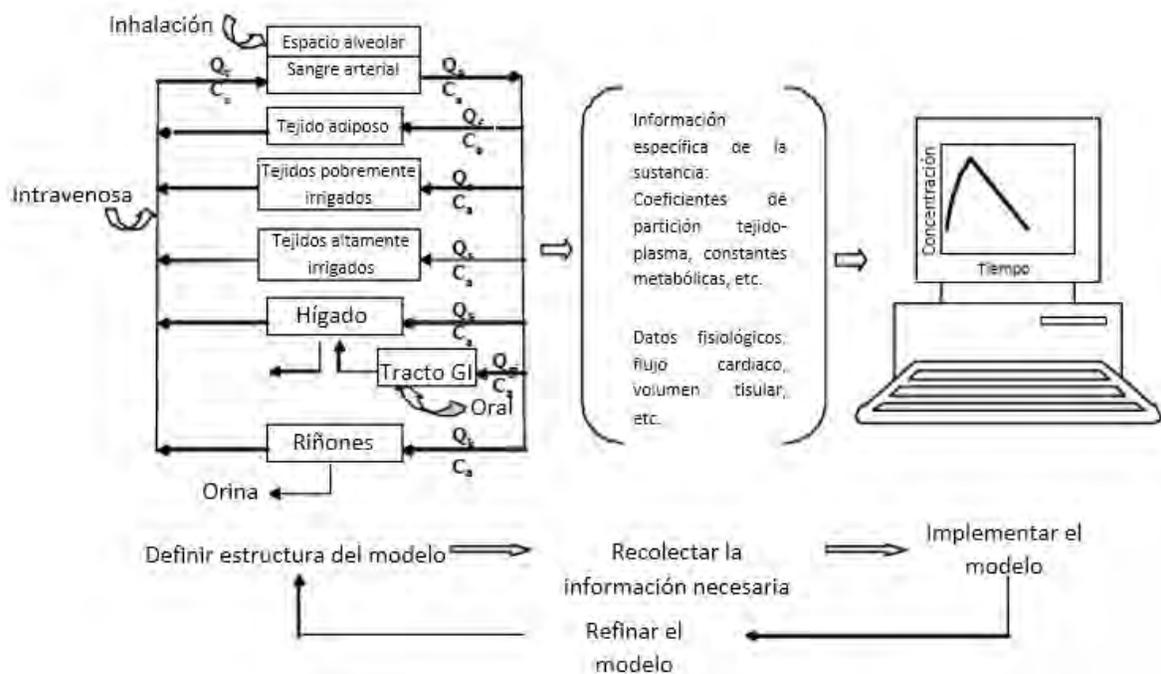


Figura 5. Desarrollo de un modelo PBPK.  $Q_c$  representa el flujo sanguíneo y  $C$  la concentración de fármaco, respectivamente. Los subíndices v, a, f, r, s, li, k denotan sangre venosa, sangre arterial, grasa, tejidos altamente irrigados, pobremente irrigados, hígado, gastrointestinal, riñón. Basado en: Clewell RA y Clewell HJ (2007). *Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment*. Regul Toxicol Pharmacol.

### 1.2.2. Ecuaciones matemáticas utilizadas en los modelos PBPK

Como los procesos cinéticos son esencialmente fenómenos de transferencia de masa, las ecuaciones que los describen se derivan de la ley de acción de masas (Baxter, et. al., 1995). Es una buena idea incluir una ecuación de equilibrio de masa en el sistema que describe el modelo PBPK de cuerpo entero (Nestorov, 2003). Comprobar el balance de masa cada vez (la masa total del fármaco en todos los compartimentos en cada momento más la masa total eliminada hasta este momento debe dar la dosis total administrada) para comprobar si las ecuaciones están correctamente escritas o no. La falta de balance de masas afectará la capacidad predictiva y descriptiva del modelo (Nestorov, 2007).

Hasta ahora se han utilizado cuatro tipos de descripciones matemáticas de los tejidos dentro de los modelos PBPK (Khalil y Läer, 2011):

- Se utilizan ecuaciones algebraicas en lugar de ecuaciones diferenciales cuando se supone que los procesos se equilibran instantáneamente y pueden considerarse estáticos. Un ejemplo típico son las ecuaciones de equilibrio para las concentraciones de aire alveolar y aire inhalado en modelos PBPK para estudios de inhalación.
- Las ecuaciones diferenciales ordinarias lineales son la descripción más común de los procesos farmacocinéticos dinámicos utilizados en PBPK. El resultado es un sistema lineal de ecuaciones diferenciales ordinarias que se utiliza para la estimación de parámetros y/o la simulación de procesos.
- Las ecuaciones diferenciales no lineales se utilizan cuando hay procesos no lineales en tejidos particulares. La mayoría de las linealidades comunes son la depuración y/o la unión dependientes de la concentración. Un ejemplo clásico de porciones no lineales dentro de los modelos PBPK de cuerpo entero en el metabolismo hepático tipo Michaelis-Menten.

- Las ecuaciones diferenciales parciales se usan cuando se asumen modelos de tejido de dispersión.

### 1.2.3. Parámetros necesarios para los modelos PBPK

Una vez que las ecuaciones matemáticas están descritas, se deben especificar y/o estimar los parámetros que permitan su aplicación. A diferencia de los modelos farmacocinéticos empíricos, donde todos los parámetros son específicos para el compuesto de interés, los modelos PBPK de cuerpo entero tienen dos grupos de parámetros (Khalil y Läer, 2011):

- Parámetros fisiológicos, pertenecientes a las características anatómicas y fisiológicas de las especies, que son independientes del fármaco y se han documentados en la literatura (Williams y Leggett, 1989; Price, et al., 2003). Es esencial encontrar una fuente confiable y consistente para establecer los parámetros fisiológicos, esto representa uno de los mayores conflictos en los modelos PBPK (Khalil y Läer, 2011). En la Tabla 1 se muestran los parámetros fisiológicos típicos para los modelos PBPK.
- Parámetros dependientes del compuesto, relacionados con los procesos que el compuesto está experimentando en el cuerpo, caracteriza las propiedades farmacocinéticas de la molécula particular.

Las principales fuentes de estos parámetros del modelado PBPK de cuerpo entero son las siguientes:

- Estimación a partir de datos generados durante experimentos *in vivo* en las especies de interés específicamente diseñadas para apoyar el ejercicio de modelado PBPK.
- Integración de datos generados a partir de experimentos *in vitro*. (Nestrov, 2003).

- Predicción computacional (a veces denominada *in silico*) basada en información fisicoquímica y/o composición de tejidos.
- Extrapolación de otras especies, basada en suposiciones mecanicistas sobre las relaciones entre especies existentes. En la mayoría de los casos, se supone que los coeficientes de partición de tejido a sangre son los mismos en las especies de mamíferos (a menos que haya razones específicas para no hacer esta suposición), proporcionando el fundamento para la extrapolación de PBPK (por ejemplo, de animales a humanos (Thakur, 1991).
- Cualquier combinación de las anteriores, como la extrapolación entre especies que incluye datos *in vivo* de una especie modelo (animal), así como datos *in vitro* de las especies objetivo (Sweeney, et. al., 2003).
- Cualquier combinación de las anteriores, como la extrapolación entre especies que incluye datos *in vivo* de una especie modelo (animal), así como datos *in vitro* de las especies objetivo (Sweeney, et. al., 2003). Este enfoque ha sido propuesto para compensar las insuficiencias de la extrapolación basadas únicamente en información *in vitro*.

**Tabla 1. Parámetros fisiológicos típicos para los modelos PBPK en diferentes especies**

	Ratón	Rata	Humano
Ventilación Alveolar (L/h <sup>-1</sup> kg) <sup>a</sup>	29 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>
<b>Flujos sanguíneos</b>			
Total (L/h <sup>-1</sup> kg) <sup>a</sup>	16.5 <sup>c</sup>	15 <sup>c</sup>	15 <sup>c</sup>
Músculo (fracción)	0.18	0.18	0.18
Piel (fracción)	0.07	0.08	0.06
Grasa (fracción)	0.03	0.06	0.05
Hígado (arterial) (fracción)	0.035	0.03	0.07
Intestino (portal) (fracción)	0.165	0.18	0.19
Otros órganos (fracción)	0.52	0.47	0.45
<b>Volúmenes de tejidos</b>			
Peso corporal (kg)	0.02	0.3	80

Agua corporal (fracción)	0.65	0.65	0.65
Plasma (fracción)	0.04	0.04	0.04
Músculo (fracción)	0.34	0.36	0.33
Piel (fracción)	0.17	0.195	0.11
Grasa (fracción)	0.10 <sup>d</sup>	0.01 <sup>d</sup>	0.21
Hígado (fracción)	0.046	0.037	0.023
Intestino (fracción)	0.031	0.033	0.045
Otros órganos (fracción)	0.049	0.031	0.039
Lumen intestinal (fracción)	0.054	0.058	0.053

<sup>a</sup> escalado alométricamente:  $QC=QCC \cdot BW.75$

<sup>b</sup> Varía significativamente con el nivel de actividad (rango: 15-40 L/h<sup>-1</sup> kg)

<sup>c</sup> Varía con el nivel de actividad (rango 15-25 L/h<sup>-1</sup> kg)

<sup>d</sup> Varía substancialmente (más bajo en animales más jóvenes, más alto en animales más viejos).

Fuente: Clewell RA, Clewell HJ. (2007). Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. Regul Toxicol Pharmacol.

#### 1.2.4. Softwares para el desarrollo de modelos PBPK

En el último paso se acopla todo el sistema y las ecuaciones que describen el modelo se codifican en un lenguaje de software particular para la posterior estimación y/o simulación de parámetros (Khalil y Läer, 2011).

Los softwares disponibles para la construcción de un modelo PBPK generalmente son clasificados en tres clases (Nestorov, 2007):

- La primera clase comprende el software general de modelado matemático y de ingeniería. El único requisito aquí es que el paquete ofrezca un integrador de ecuaciones diferenciales relativamente bien desarrollado.
- El segundo tipo de software que se puede utilizar para el modelado PBPK es el software general de modelado PK, que no es específico para PBPK, sino destinado a aplicaciones PK generales.
- El tercer tipo de productos de software, que empiezan a surgir más recientemente, son los paquetes de software de modelado PBPK especializados. A menudo incluyen una interfaz gráfica de usuario con

bibliotecas de bloques de construcción para los componentes del modelo PBPK, que permiten hacer clic y arrastrar la estructura de todo el cuerpo.

La selección del tipo de software para el desarrollo y la aplicación del modelo PBPK debe basarse en el propósito de modelado, el nivel de sofisticación del modelador y el problema específico (Nestorov, 2001).

### **1.2.5. Ventajas y limitaciones de los modelos PBPK**

El modelado PBPK requiere datos completos sobre los procesos fisiológicos, bioquímicos y fisicoquímicos que se producen en sistemas biológicos en diferentes grupos de edad o bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas (Subramanian, 2005). Estos datos no están disponibles a partir de una sola fuente, lo que puede conducir a cierta confusión y a un problema en el establecimiento de una fuente fiable de información precisa y coherente. Los modelos PBPK reflejan el conocimiento científico actual, y aunque algunos procesos se tienen bien caracterizados, otros están parcialmente o mal caracterizados, y pueden existir vacíos de información (Khalil y Läer, 2011).

Sin embargo la implementación de los modelos PBPK está determinada por sus tres ventajas principales en comparación con los modelos compartimentales farmacocinéticos empíricos (Nestorov, 2003).

1. Contenido de información más rico; debido a la presencia de parámetros independientes del fármaco y específicos del fármaco, algunos de los cuales pueden ser tomados de fuentes independientes.
2. Estructura modular; como la compartimentación se deriva de la estructura anatómica del cuerpo, los tejidos participantes, fluidos y órganos pueden ser desenchufados del sistema del cuerpo entero, estudiados por separado e independientemente y la información generada puede ser reunida de nuevo en el modelo PBPK.

3. Universalidad; la estructura del modelo PBPK es común a todas las especies de mamíferos. Al mismo tiempo, los valores de los parámetros fisiológicos para las especies animales más comunes (ratón, rata, perro, mono, hombre) están más o menos disponibles de fuentes independientes.

A través de su capacidad mejorada para integrar la información generada a partir de diversas fuentes, los modelos PBPK se han utilizado tradicionalmente para todo tipo de ejercicios de extrapolación, tales como la extrapolación entre vías de administración (Chiu y White, 2006), la interpolación entre dosis (Simmons, et. al., 2005) y la extrapolación entre especies (Maruyama, et. al., 2006).

#### **1.2.6. Aplicaciones de los modelos PBPK**

Aunque el modelado PBPK fue originalmente generado en el campo farmacéutico, tiene más aplicaciones en toxicología ambiental y evaluación de riesgos y se ha convertido en una técnica común y ampliamente utilizada.

Sin embargo, el modelado de PBPK puede usarse para una variedad de otros propósitos y se está volviendo más popular en los campos de la farmacología y el desarrollo de fármacos (Chien, et. al., 2003; Poulin y Theil, 2002; Lüpfer y Reichel, 2005).

La técnica de modelado de PBPK también ha surgido como una herramienta de aprendizaje que puede ayudar a comprender la influencia de diferentes procesos y/o parámetros involucrados en la determinación de la disposición de fármacos y el comportamiento farmacocinético. Una vez validados los modelos PBPK permiten la predicción de los siguientes procesos (Rowland, 2011; U.S.Environmental Protection Agency (EPA), 2006):

- Predicción del aclaramiento del fármaco. La aplicación del método IVIVE para predecir el aclaramiento del fármaco ha sido exitosa, en particular para las moléculas de fármacos convencionales (moléculas liposolubles con un PM inferior a 300-500 g mol<sup>-1</sup>). Esta parte se asocia con el metabolismo del fármaco,

y para obtener resultados precisos es esencial: la calidad de los datos *in vitro* (y los datos *in vivo*, que pueden ser muy variables y limitados), el uso de los factores de escala apropiados, la corrección de la unión inespecífica en las preparaciones *in vitro* y, en casos específicos, la tolerancia a la absorción activa.

- Predicción de la distribución del fármaco. Se mide la afinidad tisular con base en el volumen de distribución en estado estacionario, que se estima a partir de datos plasmáticos obtenidos tras la administración intravenosa de fármacos.
- Predicción de concentración plasmática del fármaco: Perfil de tiempo. Ya se ha descrito que los modelos de PBPK se usan para combinar las predicciones de absorción, distribución y eliminación, como ninguna otra metodología, y esto es lo que se pueda evaluar de manera realista el tiempo completo de la exposición sistémica de los fármacos y metabolitos, esto bajo todas las condiciones y situaciones que puedan encontrarse durante el desarrollo clínico del fármaco.
- Predicción de interacciones de fármaco-fármaco. Ésta se relaciona con el metabolismo mediado por CYP, y considera las citoquinas liberadas por proteínas terapéuticas, además de la interacción con enzimas en el hígado y el intestino.
- Predicción de los efectos por la edad. Los modelos IVIVE y PBPK tienen el potencial de anticipar las diferencias farmacocinéticas en pacientes pediátricos en relación con pacientes adultos, y de esta manera ayudar en la selección y diseño óptimo de las investigaciones *in vivo*.
- Predicción de los efectos por la genética. Los polimorfismos genéticos en las enzimas que metabolizan los fármacos y sus frecuencias en diversos grupos étnicos están documentados, y esta es la información que se utiliza para evaluar su impacto en la exposición a fármacos. En estas predicciones se utilizan simuladores que permiten el modelado estocástico de poblaciones virtuales.

Predicción de los efectos por enfermedad. Se puede predecir la farmacocinética en estados patológicos específicos definidos por etiología y gravedad, al incorporar rasgos patológicos en los modelos PBPK (Clewell, 2011).

## 2.3. Clonazepam

### 2.3.1. Propiedades generales y usos

El Clonazepam es una benzodiazepina cuyo nombre químico es 5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona. La estructura química básica de las benzodiazepinas se forma a partir de la fusión de un anillo de benceno y un anillo de diazepina de siete miembros (Browne, 1976) (Figura 6). El Clonazepam está estructuralmente relacionado con el clorhidrato de clordiazepóxido (Librium) y diazepam (Valium).

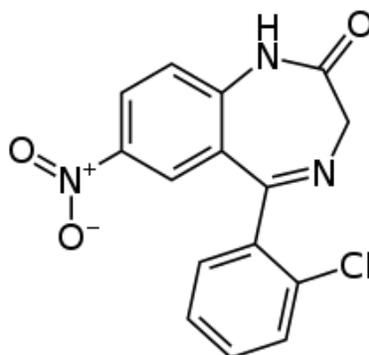


Figura 6. Estructura química del Clonazepam

Su apariencia es de sólido cristalino color amarillo pálido con peso molecular de 315.715 g/mol (Browne, 1976). El Clonazepam exhibe valores de pKa de 1.5 y 10.5. El pKa de 1.5 corresponde a la eliminación del protón del nitrógeno protonado en la posición 4 de la molécula, y el pKa de 10.5 corresponde a la desprotonación del nitrógeno en la posición 1. Por lo tanto, el compuesto se encontraría no disociado en todo el rango del pH fisiológico (Kaplan, et. al., 1974).

Actualmente, el Clonazepam está aprobado por la FDA para su uso solo o como un anticonvulsivo complementario para los siguientes tipos de convulsiones: ausencia, espasmos infantiles, ausencia atípica, acinética, "motor menor" y el "síndrome de Lennox-Gastaut" (Lennox, et. al., 1960).

Por vía oral, el Clonazepam puede convertirse en el fármaco de elección para tratar las convulsiones motoras menores de la infancia. En ausencias de pequeño tamaño, el Clonazepam produce una reducción de más del 50% de las convulsiones en aproximadamente el 75% de los pacientes. La actividad convulsiva en niños con el síndrome de Lennox-Gastaut se elimina en aproximadamente un tercio de los pacientes y se reduce significativamente en un tercio adicional, estos pacientes a menudo no han respondido al nitrazepam o a los fármacos antiepilépticos convencionales (Pinder, et. al., 1976).

Se usa principalmente como terapia adjunta para tratar a pacientes con una amplia gama de ataques primarios generalizados y secundariamente resistentes al tratamiento (Trimble, 2002). También es efectivo para controlar el estado epiléptico.

El Clonazepam es un medicamento potente, en términos farmacológicos la potencia de las benzodiazepinas se refiere a la afinidad *in vivo* del fármaco (o sus metabolitos activos) por su receptor (Nelson, et. al., 1999). Las benzodiazepinas se clasifican como de potencia baja, media (por ejemplo, clorazepato y diazepam) o alta (por ejemplo, Clonazepam y lorazepam) (Chouinard, 2004).

La dosis inicial para bebés y niños (hasta 10 años de edad o 30 kg de peso corporal) debe ser de 0.01 a 0.03 mg/kg/día pero no superior a 0.05 mg/kg/día administrada en dos o tres dosis divididas. La dosis inicial para adultos no debe exceder 1.5 mg/día dividida en tres dosis (Browne, 1976).

La dosis se puede aumentar en incrementos de 0.5 a 1 mg cada tres días hasta que las convulsiones se controlen adecuadamente o los efectos secundarios impidan

cualquier aumento adicional. La dosis de mantenimiento debe ser individualizada dependiendo de la respuesta. La cantidad diaria máxima recomendada en adultos es de 20 mg (Browne, 1976).

La dosis de Clonazepam es esencialmente individual y depende de la edad, la tolerancia a los efectos secundarios y la respuesta clínica. Para minimizar los efectos secundarios iniciales, es necesario aumentar la cantidad diaria progresivamente hasta alcanzar la dosis de mantenimiento adecuada para cada paciente, generalmente después de 2 a 4 semanas de tratamiento (Pinder, et. al., 1976). Las dosis de mantenimiento en bebés, niños pequeños, niños en edad escolar y adultos son, respectivamente, de 0.5 a 1.0 mg, de 1.5 a 3.0 mg, de 3 a 6 mg y de 4 a 8 mg al día. Estos deben administrarse en 3 o 4 dosis orales divididas, y se pueden exceder con seguridad si es necesario (Pinder, et. al., 1976).

La toxicidad aguda de Clonazepam es muy baja. La  $DL_{50}$  es superior a 4000 mg/kg en ratas y ratones, ya sea 24 horas o 10 días después de la administración oral o intraperitoneal (Blum et al., 1973). En ratones y ratas que recibieron dosis subtóxicas de 300 a 1000 mg/kg de Clonazepam por vía oral, los principales signos fueron somnolencia y sedación (Pinder, et. al., 1976).

Los principales efectos secundarios del Clonazepam son: somnolencia, ataxia y cambios de comportamiento. La somnolencia y la ataxia están relacionadas con la dosis, tienden a ocurrir temprano en el transcurso de la administración y pueden desaparecer con la administración crónica (Lund, et. al., 1973).

Las alteraciones del comportamiento causadas por Clonazepam ocurren solo en una minoría de pacientes, generalmente niños, pero pueden ser graves. En algunos pacientes estos trastornos representan una exacerbación de un trastorno previo y en otros pueden surgir de novo (Caso, et. al., 1973) (Lehtovaara, 1973). Los niños afectados se describen como irritables, agresivos, excitables, irracionales, antisociales, temperamentales, violentos, desobedientes, ruidosos y difíciles de

disciplinar, al igual que el comportamiento "desinhibido" que a veces los barbitúricos causan en los niños puede requerir la interrupción del medicamento o pueden ser controlables con metilfenidato o dextroanfetamina (Carson, et. al., 1975) (Hanson, et. al., 1972). El Clonazepam, un tranquilizante potente, causa una mejora en el comportamiento en algunos otros pacientes.

Otros efectos secundarios incluyen: hipotonía, mareos y habla espesa. Al igual que con la somnolencia y la ataxia, estos efectos están relacionados con la dosis y algunos pacientes desarrollan tolerancia a ellos. La hipotonía y la debilidad muscular pueden ser responsables de disfagia, disartria y estreñimiento (Browne, 1976).

La hipersalivación y la hipersensibilidad bronquial ocurren en un pequeño número de pacientes y pueden crear dificultades respiratorias en los bebés (Dumermuth, et. al., 1974) (Martin, et. al., 1973).

La taquicardia puede surgir después de la administración vía intravenosa de Clonazepam en pacientes con estado epiléptico (Weinmann, et. al., 1973).

Ha habido informes ocasionales de mareos y vértigo, estado de ánimo depresivo, náuseas y vómitos, anorexia, dispepsia, alteraciones visuales y del sueño, pérdida de la libido e impotencia, sed anormal, pigmentación de la piel y erupciones cutáneas, edema facial y malestar general. La trombocitopenia es una ocurrencia rara (Veall, et. al., 1975).

El Clonazepam puede causar aumento de peso en algunos pacientes, especialmente en niños, lo que posiblemente esté asociado con la hiperfagia (Dreifuss et al., 1975) (Hanson, et. al., 1972). La terapia a largo plazo no se ha asociado con ningún cambio bioquímico o alteraciones en la función hepática o renal (Chandra, 1975) (Gastaut, 1970) (Nieto, 1973).

La disminución de la eficacia del tratamiento continuo es común para la mayoría de los fármacos antiepilépticos, particularmente las benzodiazepinas (Browne, et. al., 1973) (Tousch, 1973). El Clonazepam no es la excepción, pero la opinión general es que es mejor en cuanto a esto respecta que el diazepam o nitrazepam. Además, el Clonazepam se administra con frecuencia a pacientes que ya no presentan efectos benéficos con otras benzodiazepinas u otros fármacos antiepilépticos (Pinder, et. al., 1976). La mayoría de los autores coinciden en que la eficacia disminuida se produce principalmente en los primeros 6 meses de tratamiento, y que la interrupción del tratamiento durante varias semanas en pacientes tolerantes al Clonazepam a menudo puede resultar, al menos inicialmente, en beneficio completo con la reintroducción del fármaco . El efecto inmediato de dosis orales pequeñas también puede aprovecharse cuando se toma según sea necesario, incluso en pacientes que han recaído en la terapia a largo plazo (Kruse, et. al., 1973).

### **2.3.2. Farmacocinética**

El Clonazepam se encuentra en gran medida no ionizado en todo el rango de pH fisiológico. Es relativamente insoluble en agua (19 mg/L a pH 7,4), pero cruza fácilmente las membranas biológicas (Kaplan,et. al., 1974).

#### **2.3.2.1. Absorción**

Los estudios farmacocinéticos han demostrado que el Clonazepam se absorbe bien después de la administración oral, el 90% se absorbe en comparación con la administración intravenosa (Eschenhof, 1973). Los niveles plasmáticos máximos se alcanzan entre 1 y 10 horas, generalmente ocurren de dos a cuatro horas después de la administración oral, aunque los niveles máximos pueden no alcanzarse hasta ocho horas más tarde en algunos pacientes, y disminuyen lentamente durante varios días (Kaplan, et. al., 1974). Existen amplias variaciones individuales en los niveles alcanzados con la misma dosis. Los niveles plasmáticos máximos parecen

estar escasamente correlacionados con los efectos terapéuticos o los efectos secundarios del fármaco (Pinder, et. al., 1976).

La vida media plasmática del Clonazepam es de aproximadamente 1 a 2 días. En un estudio en pacientes epilépticos que reciben terapia con Clonazepam (Dreifuss, et. al., 1975) determinaron que la vida media era de 22 a 33 horas con una media de 28,7 horas.

Los resultados preliminares indican una vida media biológica de 22 a 32 horas y una concentración sérica terapéutica de 5 a 50 ng/mL (Browne, 1976).

### **2.3.2.2. Distribución**

No hay estudios publicados sobre la distribución de Clonazepam, el volumen promedio de distribución se estima cercano a 3 L/kg y el grado de unión *in vitro* a la albúmina sérica humana se reporta con datos variables como 47% (Müller, et. al., 1973) u 86% (Riss, et. al., 2008).

### **2.3.2.3. Metabolismo y excreción**

El Clonazepam se excreta principalmente en la orina, pero muy poca de la dosis administrada aparece como el fármaco inalterado, menos del 0.5% se excreta sin cambios en la orina (Eschenhof, 1973) (Kaplan, et. al., 1974).

Existe un extenso metabolismo para 7-amino y 7-acetamino-clonazepam. El clonazepam experimenta una biotransformación extensa, pero no se forman metabolitos activos (Pinder, et. al., 1976). Se biotransforma ampliamente por el citocromo P450 3A4, principalmente por reducción a 7-aminoclonazepam y acetilación a 7-acetaminoclonazepam, con trazas de los derivados 3-hidroxi de los tres compuestos y sus conjugados de glucurónido y sulfato (Knop et. al., 1975) (Figura 7).

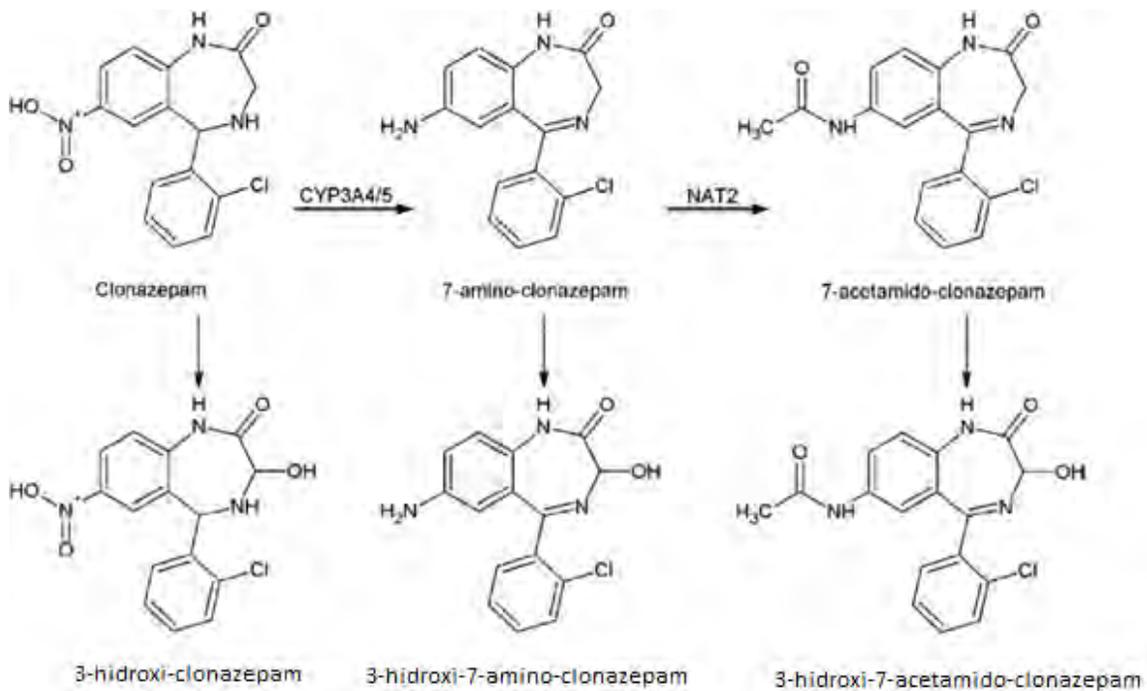


Figura 7. Biotransformación del Clonazepam. Recuperado de [Toth, K., et al., \(2016\). Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient's CYP3A Status and NAT2 Genotype.](#)

El derivado 7-amino es el metabolito principal que se encuentra en la sangre humana y se acetila para formar un derivado de acetamida. Los resultados preliminares indican que el derivado 7-amino del Clonazepam tiene poca actividad anticonvulsiva (Naestoft, et. al., 1974).

También se produce la hidroxilación de Clonazepam en la posición C-3, lo que da como resultado la eliminación de estos metabolitos como sus conjugados de glucurónido y sulfato. El Clonazepam se excreta casi en su totalidad como estos metabolitos. Menos del 0.5% de Clonazepam se excreta sin cambios en la orina (Kaplan, et. al., 1974).

El aclaramiento total del Clonazepam se estima de 55 L/min (Browne, 1976).

### 2.3.3. Farmacodinamia

Existen tres subtipos principales de receptores de ácido c-aminobutírico (GABA). Los canales iónicos activados por ligando que son selectivamente bloqueados por bicuculina y modulados por esteroides, benzodiazepinas y barbitúricos son conocidos como receptores GABA<sub>A</sub>. Las benzodiazepinas se unen a los receptores GABA<sub>A</sub>, proteínas transmembrana ionotrópicas localizadas en las membranas neuronales del sistema nervioso central (SNC) (Chebib, et. al., 1999). El receptor GABA<sub>A</sub> consiste en una estructura pentamérica con múltiples subunidades que son necesarias para la función fisiológica normal. Las subunidades de receptor se ensamblan a partir de combinaciones de 19 (Simon, et. al., 2004); diferentes combinaciones de subunidades determinan las propiedades farmacológicas del receptor (Sieghart, et. al., 1999) (Macdonald, et. al., 1994) (Figura 8). El número y los tipos de subunidades varían según la ubicación del receptor en el SNC (McKernan, et. al., 1996). El neurotransmisor inhibitorio GABA se une al receptor para abrir las compuertas de iones cloruro y producir una corriente inhibitoria.

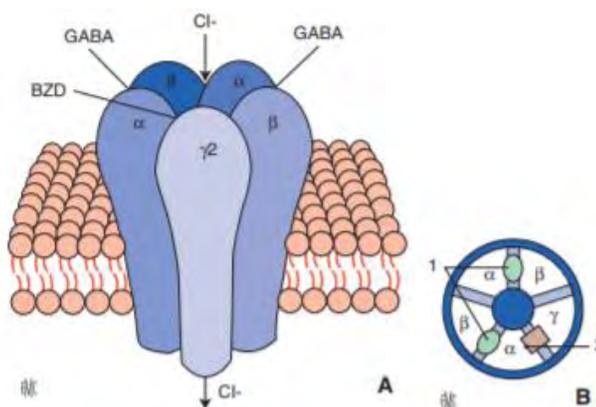


Figura 8. Estructura del receptor GABA<sub>A</sub>. A. El receptor GABA<sub>A</sub> es un complejo macromolecular pentamérico que consta de cinco subunidades alrededor de un canal de cloro. Estas subunidades forman una roseta constituida por dos subunidades α, dos subunidades β y una subunidad γ. Cuando el ácido gamma-aminobutírico (GABA) se fija a este receptor (dos moléculas en las interfaces α-β), se produce la apertura del canal de cloro, lo que provoca una hiperpolarización de la célula postsináptica responsable de la inhibición de la neurotransmisión y clínicamente de la sedación. B) Las benzodiazepinas potencian la acción del GABA al fijarse a un sitio alostérico del GABA (en la interfase α-γ). Aumentan la frecuencia de apertura del canal de cloro y de este modo, la actividad inhibitoria del GABA cuando este se fija a su receptor. 1. Sitios GABA; sitio benzodiazepina HIS 101. Recuperado de Boussofara, M., et. al., (2016). *Farmacología de las benzodiazepinas utilizadas en anestesia-reanimación*.

La unión de las benzodiazepinas a la subunidad  $\alpha$  del receptor (Figura 9) es importante en la potenciación de la inhibición GABAérgica (Mihic, et. al., 1994). La diferenciación entre benzodiazepinas y GABA es importante. Las benzodiazepinas no sustituyen a GABA, sino que aumentan los efectos inhibidores de GABA. Las benzodiazepinas se unen alostéricamente al receptor en una ubicación diferente a la del GABA y aumentan la conductancia del canal de cloruro al aumentar la frecuencia de apertura del canal con puerta (Campo-Soria, et. al., 2006) (Figura 10).

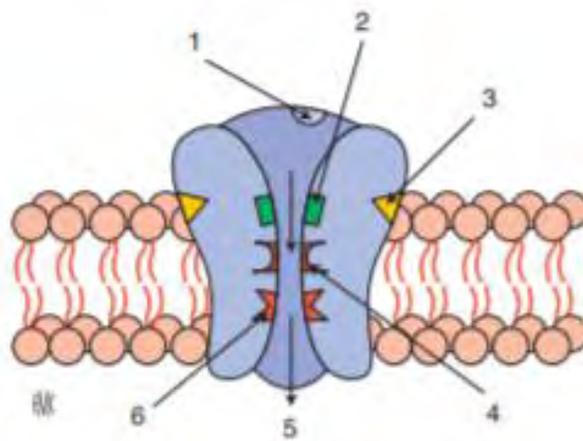


Figura 9. Representación esquemática de los diferentes sitios de unión en el receptor GABA<sub>A</sub>. 1. Sitio de GABA; 2. Sitio de los barbitúricos; 3. Sitio de las benzodiazepinas; 4. Sitio de los esteroides; 5. Canal de cloro; 6: sitio de la picrotoxina. Recuperado de Boussofara, M., et. al., (2016). *Farmacología de las benzodiazepinas utilizadas en anestesia-reanimación*.

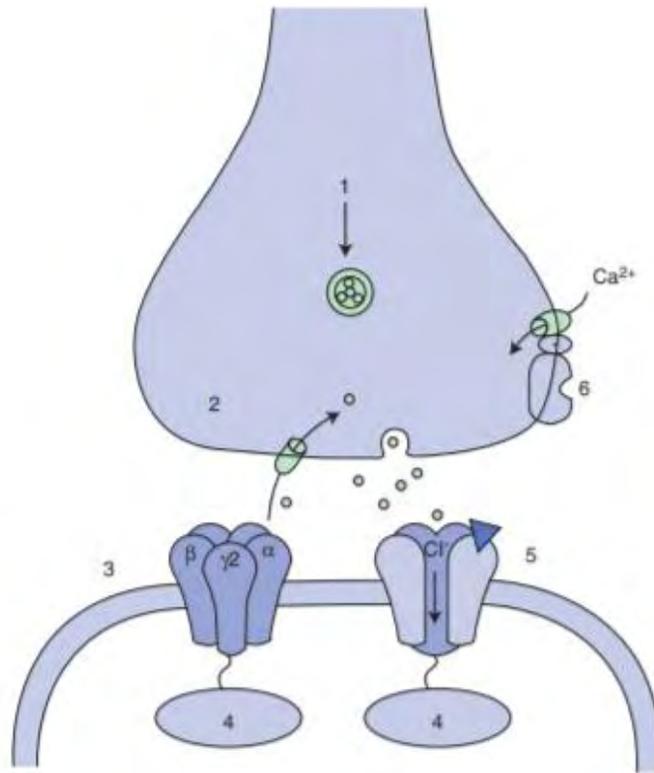


Figura 10. Sinapsis GABAérgica. El ácido gamma-aminobutírico (GABA) se almacena en las vesículas presinápticas y después se libera por exocitosis. Cuando se libera en la hendidura sináptica, se fija, entre otros, a los receptores GABA<sub>A</sub> postsinápticos. El receptor GABA<sub>A</sub> es un complejo macromolecular que consta de 5 subunidades alrededor de un canal de cloro. En la cara citoplasmática, los receptores GABA<sub>A</sub> están anclados a una proteína denominada gefirina. 1. GABA; 2. Transportador de GABA; 3. Receptor GABA<sub>A</sub>; 4. Gefirina; 5. Benzodiazepina; 6. Receptor GABA<sub>B</sub>. Recuperado de Boussofara, M., et. al., (2016). *Farmacología de las benzodiazepinas utilizadas en anestesia-reanimación*.

### 2.3.4. Interés forense

El número de delitos facilitados por drogas parece haber aumentado durante los últimos años, esto puede deberse a un mejor conocimiento de los efectos secundarios de las drogas como ansiolíticos o hipnóticos en personas comunes, y también a una sensibilidad mejorada de los aparatos utilizados para toxicología forense (McGregor, et. al., 2003) (Negrusz, et. a., 2003).

Además del etanol, el cannabis y el éxtasis, las benzodiazepinas y análogos son las sustancias más comunes utilizadas en delitos facilitados por drogas (Ghyssel, et. al.,

1998). Las propiedades sedante y anterógrada de la amnesia de las benzodiazepinas son ampliamente utilizadas para este propósito.

Dentro de los delitos facilitados por drogas se encuentra la agresión sexual, donde la lista de benzodiazepinas utilizadas es larga y, entre otras, incluye: flunitrazepam, diazepam, temazepam, Clonazepam y oxazepam. Muchas víctimas de agresión sexual facilitada por las drogas no informan el incidente, sino hasta varios días después. La razón de esto puede ser una combinación de emociones características de la victimización por agresión sexual (incluyendo vergüenza, miedo, rechazo, negación, desconfianza en las autoridades), pero a menudo, es la amnesia causada por la droga. Por lo tanto, es muy importante saber cuánto tiempo después de una dosis única (como se esperaría en una agresión sexual facilitada por drogas) se podrían recolectar muestras biológicas de la víctima para confirmar la presencia de la sustancia y posiblemente ayudar a esclarecer lo sucedido en el caso y procesar exitosamente al perpetrador (Chèze, et. al., 2004).

En el caso de un presunto delito facilitado por drogas, el análisis de orina y sangre debe hacerse antes del análisis del cabello, si es posible, para la interpretación de los resultados cuantitativos y cualitativos (Chèze, et. al., 2004). Como la administración única de tabletas de benzodiazepina conduce a niveles bajos del fármaco y metabolitos en la orina y el cabello, dado que las concentraciones en estado estacionario generalmente se alcanzan solo después de algunos días de tratamiento, las técnicas clásicas como GC/MS y LC/DAD (Negrusz, et. al., 2000).

### **3. Metodología**

#### **3.1. Construcción del modelo PBPK**

Para la construcción del modelo matemático para Clonazepam se tomaron ecuaciones previamente descritas en la literatura (Pilari, 2010). Se decidió plantear un modelo de tanque bien agitado (WST, por sus siglas en inglés), en el que no se detallan las barreras biofísicas entre los compartimentos (órganos) y la distribución se limita por el flujo sanguíneo. El modelo comprende 13 compartimentos que representan importantes tejidos, órganos u otros espacios dentro del cuerpo humano: la sangre venosa (por ser el sitio de administración y muestreo) y la sangre arterial, el cerebro (órgano donde se presenta la mayor actividad farmacodinámica), los riñones y el hígado (órganos de eliminación y de metabolismo), el tejido adiposo y el músculo (por ser sitios posibles de almacenamiento), los pulmones (conectan a la sangre venosa y arterial) y los demás órganos para completar el balance de masa (corazón, bazo, intestino, piel y hueso) (Figura 11). Es importante entender que este modelo se hace siguiendo las direcciones y conexiones de la circulación sanguínea real en el organismo.

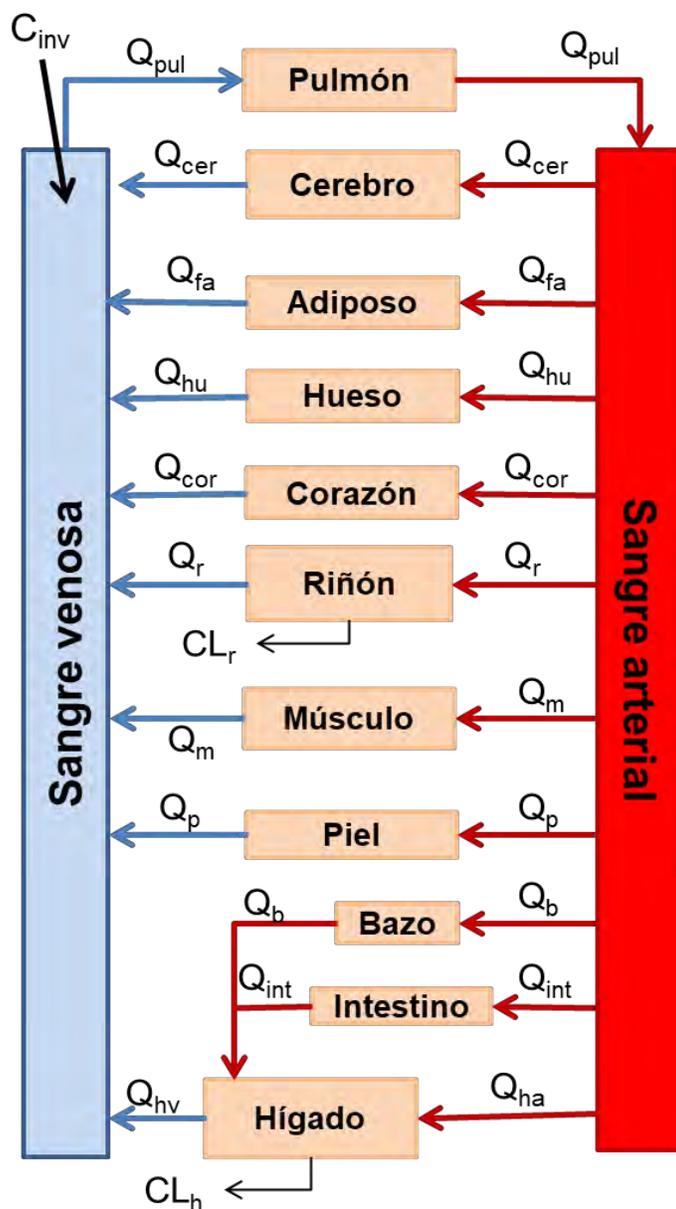


Figura 11. Topología propuesta de órganos y tejidos del modelo PBPK para Clonazepam de 13 compartimentos en rata y en humano. La administración del Clonazepam es por vía intravenosa. La eliminación se representa como que ocurre solamente de hígado ( $CL_h$ ) y los riñones ( $CL_r$ ).

Para plantear las ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) de los trece compartimentos, asumimos que el fármaco se distribuye dentro del cuerpo por el flujo sanguíneo y por difusión pasiva homogénea en órganos y tejidos, y que el fármaco se metaboliza en el hígado y se elimina en los riñones. Para entender el

planteamiento de la ecuación se considera a cada tejido como un compartimento aislado (Figura 12).

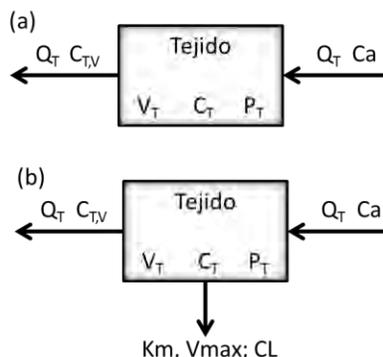


Figura 12. Diagramas de modelo de un compartimento limitado por el flujo sanguíneo, para los órganos no eliminadores (a) y para los órganos que eliminan al fármaco (b). Q=flujo sanguíneo; C=concentración; V=volumen; P=coeficiente de partición tejido:sangre; subíndice T indica el tejido; Km y Vmax son parámetros de una cinética enzimática de Michaelis-Menten; y CL=aclaramiento.

De esta manera, la siguiente ecuación diferencial describe los procesos de distribución en cada órgano/tejido no-eliminador:

$$V_T \frac{dC_T(t)}{dt} = Q_T \times \left( 0.14C_a(t) - \frac{C_T(t)}{P_T} \right) \quad (1)$$

donde  $C_T$  representa la concentración total de fármaco en el órgano/tejido y  $0.14C_a$  representa la concentración sanguínea afluyente, debido a que únicamente el 14% del Clonazepam se encuentra no unido a proteínas en la sangre (Riss, 2008) . En la mayoría de los casos, esta es la concentración de sangre arterial.  $V_T$  y  $Q_T$  denotan el volumen de tejido y el flujo sanguíneo, respectivamente. El coeficiente de partición de tejido a sangre,  $P_T$ , relaciona la concentración de fármaco tisular en estado estacionario con la concentración sanguínea en estado estacionario. El término  $C_T/P_T$  representa la concentración sanguínea que sale del compartimiento.

Obsérvese que sólo las concentraciones ( $C_T$  y  $C_a$ ) son dependientes del tiempo ( $t$ ), mientras que  $V$ ,  $Q$  y  $P$  son constantes fisiológicas específicas para cada órgano, y sus valores se presentan en la Tabla 1.

Para el caso del hígado, la ecuación diferencial es:

$$V_h \frac{dC_h(t)}{dt} = Q_h \times \left( C_{in} - \frac{C_h(t)}{P_h} \right) \quad (2)$$

donde  $C_{in}$  es la concentración de Clonazepam que entra al hígado, la cual proviene de la suma de la sangre arterial, del bazo y del intestino como se observa en la Figura 6 y se traduce de la siguiente manera:

$$C_{in} = \frac{1}{Q_h} \times \left( Q_{ha} * 0.14C_a(t) + Q_b \frac{C_b(t)}{P_b} + Q_i \frac{C_i(t)}{P_i} \right) \quad (3)$$

Y al incorporar la Ecuación 4 en la 3, la EDO para el hígado queda como:

$$V_h \frac{dC_h(t)}{dt} = \left( Q_{ha} * 0.14C_a(t) + Q_b \frac{C_b(t)}{P_b} + Q_i \frac{C_i(t)}{P_i} - Q_h \frac{C_h(t)}{P_h} \right) \quad (4)$$

Para los compartimentos arterial y venoso, las ecuaciones diferenciales son:

$$V_a \frac{dC_a(t)}{dt} = Q_c \times \left( \frac{C_{pu}(t)}{P_{pu}} - C_a(t) \right) \quad (5)$$

$$V_{pu} \frac{dC_{pu}(t)}{dt} = Q_{pu} \times \left( 0.14C_v(t) - \frac{C_{pu}(t)}{P_{pu}} \right) \quad (6)$$

donde  $Q_c$  denota el gasto cardíaco. Para todos los órganos excepto pulmón, hígado, arteria y vena, es  $C_{in}=C_{art}$ . Para el pulmón, es  $C_{in}=C_{ven}$ , y para la arteria, es  $C_{in}=C_{pulmón}$ .

Las concentraciones de Clonazepam en la sangre venosa se definen por las sumas ponderadas por el flujo sanguíneo de todas las concentraciones de órganos que suministran estos compartimentos y se agrega un término que indica la eliminación de Clonazepam.

$$V_v \frac{dC_v(t)}{dt} = \left[ Q_{ce} \frac{C_{ce}(t)}{P_{ce}} + Q_{ad} \frac{C_{ad}(t)}{P_{ad}} + Q_{ht} \frac{C_{ht}(t)}{P_{ht}} + Q_{co} \frac{C_{co}(t)}{P_{co}} + Q_r \frac{C_r(t)}{P_r} + \right. \\ \left. Q_m \frac{C_m(t)}{P_m} + Q_p \frac{C_p(t)}{P_p} + Q_h \frac{C_h(t)}{P_h} \right] - [Q_c * 0.14C_v(t)] - \\ [CL_T * 0.14C_v(t)] \quad (7)$$

donde se toma en cuenta la suma del tejido cerebro, tejido adiposo, hueso, corazón, riñones, músculo, piel e hígado.  $CL_T$  corresponde al aclaramiento total, el cual es producto de la suma de los aclaramientos individuales de los dos órganos eliminadores que son el hígado y los riñones.

### 3.1.1. Parametrización del modelo

Los modelos PBPK de cuerpo entero requieren parámetros fisiológicos específicos de la especie además de parámetros fisicoquímicos de la sustancia. En la Tabla 2 se encuentran los flujos sanguíneos para cada órgano y los volúmenes de los tejidos para una rata de 0.25kg y con un gasto cardíaco de 0.055 L/min.

**Tabla 2. Parámetros fisiológicos específicos para rata (250g y Gasto cardíaco total,  $Q_c$  de 0.055L/min).**

Parámetro →	Flujo sanguíneo ( $Q_c=0.055$ L/min) <sup>d</sup>		Volumen del tejido (BW= 0.25kg)		
	%Gasto Cardíaco	$Q_t$ (L/min)	%BW	Densidad (kg/L) <sup>b</sup>	Volumen (L) $V_t$
Cerebro (cer)	2.82 <sup>a</sup>	0.0016	0.6 <sup>c</sup>	1.04	0.0014
Riñones (r)	14.1 <sup>b</sup>	0.0078	0.98 <sup>d</sup>	1.05	0.0023
Hígado Total (ht)	19.94 <sup>b</sup>	0.0110	4.9 <sup>d</sup>	1.04	0.0123
Arteria hepática (ha)	2.4 <sup>b</sup>	0.0013	----	----	----

<b>Vena hepática (hv)</b>	17.54	0.0096	----	----	----
<b>Bazo (b)</b>	2 <sup>c</sup>	0.0011	0.26 <sup>e</sup>	1.05	0.0006
<b>Intestino (int)</b>	15.54 <sup>a</sup>	0.0085	3.8 <sup>e</sup>	1.04	0.0091
<b>Corazón (cor)</b>	5.8 <sup>d</sup>	0.0032	0.33 <sup>b</sup>	1.03	0.0008
<b>Pulmón (pul)</b>	100 <sup>c</sup>	0.0550	0.67 <sup>d</sup>	1.05	0.0016
<b>Músculo (m)</b>	27.8 <sup>b</sup>	0.0153	40.43 <sup>b</sup>	1.04	0.0972
<b>Hueso (hu)</b>	5.4 <sup>d</sup>	0.0030	7.7 <sup>d</sup>	1.43	0.0135
<b>Piel (p)</b>	10.5 <sup>e</sup>	0.0058	16.9 <sup>d</sup>	1.11	0.0381
<b>Adiposo (fa)</b>	5.1 <sup>d</sup>	0.0028	8.2 <sup>d</sup>	0.916	0.0224
<b>Sangre arterial (a)</b>	100 <sup>c</sup>	0.0550	2.72 <sup>f</sup>	1.054	0.006451
<b>Sangre venosa (v)</b>	100 <sup>c</sup>	0.0550	5.44 <sup>f</sup>	1.054	0.012903

Nota. Fuente: a) Sakaeda, et. al., 1998; b) Brown, et. al., 1997; c) Thompson, et. al., 2012; d) Delp, et. al., 1998; e) Davies, et. al., 1993; f) Poulin, et. al., 2002.

Los parámetros fisicoquímicos específicos del Clonazepam se encuentran en la Tabla 3 y permiten calcular los coeficientes de partición tejido:sangre ( $P_t$ ) de cada órgano (Tabla 6).

**Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos específicos del Clonazepam, para el modelo PBPK en rata.**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Log coeficiente de partición octanol: agua de la molécula no ionizada (LogP)</b>	2.41 <sup>a</sup>
<b>Fracción no unida a proteínas en plasma (<math>f_u^p</math>)</b>	0.14 <sup>b</sup>
<b>Constante de ionización (pKa)</b>	pka1=1.5; pka2=10.5 <sup>c</sup>

Nota. Fuente: a) Hansch, et al., 1995 b) Riss, et. al., 2008 c) O'Neil, et. al., 2006.

El siguiente paso para el desarrollo del modelo PBPK es considerar las propiedades de afinidad del Clonazepam a los diferentes tejidos, por lo que se realizó el cálculo de los coeficientes de partición tejido:plasma ( $P_{t:p}$ ) para los diferentes órganos. El coeficiente de partición se utiliza para cuantificar la distribución de fármacos entre tejidos y plasma en condiciones de equilibrio (Poulin, et. al., 2000), y se determinó a partir del coeficiente de partición tejido: plasma no unido ( $Kup$ ) con la siguiente relación:

$$P_t = \frac{f_u^p}{B:P} * Kup_t \quad (8)$$

Dónde  $f_u^p$  es la fracción de Clonazepam no unida en plasma; y B:P es la relación sangre-plasma.  $Kup_t$  se predijo de acuerdo al siguiente modelo (Rodgers, et al., 2005) con un alto porcentaje de confianza (84-89%) (Pilari, 2010).

$$Kup = f_{EW} + \left( \frac{1+10^{pKa-pH_{IW}}}{1+10^{pKa-pH_p}} * f_{IW} \right) + \left( \frac{Ka*[AP^-]_T * 10^{pKa-pH_{IW}}}{1+10^{pKa-pH_p}} \right) + \left( \frac{P*f_{NL} + ((0.3P+0.7)*f_{NP})}{1+10^{pKa-pH_p}} \right) \quad (9)$$

Dónde:  $f_{EW}$ ,  $f_{IW}$ ,  $f_{NL}$  y  $f_{NP}$  son las fracciones de agua extracelular, de agua intracelular, de lípidos neutros y fosfolípidos neutros en el tejido, respectivamente;  $[AP^-]_T$  son los fosfolípidos ácidos del tejido;  $pKa$  es el logaritmo negativo de la constante de disociación del Clonazepam;  $P$  es el coeficiente de partición octanol:agua de la molécula no ionizada a pH 7.4;  $Ka$  es la constante de afinidad de la sustancia por los fosfolípidos en el tejido;  $pH_{IW}$ ,  $pH_p$ , se refieren al pH del agua intracelular del tejido y del plasma, respectivamente.

Para estimar el valor de  $Ka$  se hizo un re-arreglo de la Ecuación 10, aplicándolo a las células sanguíneas (subíndice BC).

$$K\alpha_{BC} = \left( K\rho_{BC} - \left( \frac{1+10^{pK_a-pH_{BC}}}{1+10^{pK_a-pH_p}} * f_{IW,BC} \right) - \left( \frac{P*f_{NL,BC}+(0.3P+0.7)*f_{NP,BC}}{1+10^{pK_a-pH_p}} \right) \right) * \left( \frac{1+10^{pK_a-pH_p}}{[AP^-]_{BC}*10^{pK_a-pH_{BC}}} \right) \quad (10)$$

Dónde  $K\rho_{BC} = \frac{B:P}{Ht*fu^p} - \frac{1-Ht}{Ht*fu^p}$ , que es la proporción de la concentración de agua célula sanguínea-plasma; y Ht es el hematocrito.

Los parámetros de composición de los tejidos para rata se muestran en la Tabla 4, y los datos de las células sanguíneas para el cálculo de  $K\alpha_{BC}$  en la Tabla 5.

**Tabla 4. Parámetros de composición de los tejidos.**

Tejido	Fracción de peso del tejido húmedo				Concentración tisular de fosfolípidos ácidos (mg/g)
	Lípidos neutros (f <sub>NL</sub> )	Fosfolípidos neutros (f <sub>NP</sub> )	Agua extracelular (f <sub>EW</sub> )	Agua Intracelular (f <sub>IW</sub> )	
<b>Células sanguíneas</b>	0.0017	0.0029	NA	0.603	0.5
<b>Adiposo</b>	0.853	0.0016	0.135	0.017	0.4
<b>Hueso</b>	0.017	0.0017	0.1	0.346	0.67
<b>Cerebro</b>	0.039	0.0015	0.162	0.62	0.4
<b>Intestino</b>	0.038	0.0125	0.282	0.475	2.41
<b>Corazón</b>	0.014	0.0111	0.32	0.456	2.25
<b>Riñón</b>	0.012	0.0242	0.273	0.483	5.03
<b>Hígado</b>	0.014	0.024	0.161	0.573	4.56
<b>Pulmón</b>	0.022	0.0128	0.336	0.446	3.91
<b>Músculo</b>	0.01	0.0072	0.118	0.63	1.53
<b>Piel</b>	0.06	0.0044	0.382	0.291	1.32
<b>Bazo</b>	0.0077	0.0113	0.207	0.579	3.18

Nota. Fuente: Rodgers T, et al. (2005). Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling 1 : Predicting the Tissue Distribution of Moderate-to-Strong Bases.

**Tabla 5. Datos fisiológicos recopilados y calculados sobre las células sanguíneas, para el cálculo de KaBC**

Parámetro	Valor
pH del plasma (pHp)	7.4 <sup>a</sup>
pH del agua intracelular del tejido (pHIW)	7 <sup>b</sup>
pH de las células sanguíneas (pHBC)	7.22 <sup>c</sup>
Hematocrito rata macho (Ht)	51.3 <sup>d</sup>
Coefficiente de partición octanol: agua de la molécula no ionizada (P)	257.04 <sup>e</sup>
Proporción de la concentración de agua célula sanguínea-plasma (Kpu <sub>BC</sub> )	7.1442 <sup>e</sup>

Nota Fuente: a) Waddell, et. al., 1969, b) Tehrani, et al.1982, c) Kummerow, et al. 2000, d) Arcila, et al. 2010, e) calculado

KaBC calculado= 1.01

**Tabla 6. Cálculo de los coeficientes de partición tejido:plasma de Clonazepam, usando el modelo planteado por Rodgers et al. 2005**

Tejido	Pt
Cerebro	1.2563
Riñón	14.5257
Hígado	13.1753
Bazo	9.2260
Intestino	7.0153
Corazón	6.5585
Pulmón	11.3187
Músculo	4.4904
Hueso	1.9831
Piel	3.8793
Adiposo	1.1912

### 3.1.2. Simulación *in silico*

Para la resolución del modelo PBPK planteado para Clonazepam se utilizó el programa Maple™ 18.Ink ©Maplesoft 2014, empleando las herramientas de ecuaciones diferenciales *with (DEtools)*.

Se aplicó el método de Euler para resolver las EDO del modelo (Palacios, 2008), que se basa en la pendiente estimada de la función para extrapolar desde un valor anterior a un valor nuevo:

$$y_{i+1} = y_i + \phi h$$

Nuevo valor = valor anterior + pendiente × tamaño de paso

Donde: La pendiente es la EDO;  $\phi = \frac{dy}{dx} = f(x,y)$

Y el tamaño de paso se refiere a que la formula se aplica para encontrar el siguiente valor consecutivo. Para el modelo se usó un tamaño de paso de 0.01 (*stepsize=0.01*), lo que especifica que se tome una distancia de 0.01 unidades entre un cada punto en la variable independiente.

Para graficar el modelo matemático se consideraron como condiciones iniciales que las concentraciones al tiempo cero, en cualquier órgano es de cero, y en el caso de la concentración venosa es igual a la cantidad de Clonazepam administrada entre el volumen sanguíneo venoso. Debido a que la administración se realiza por vía I.V., si la administración es por otra vía, deberán realizarse ajustes en las condiciones iniciales y el sistema de ecuaciones diferenciales.

## 3.2. Farmacocinética *in vivo* del Clonazepam

### 3.2.1. Experimentación con animales

Para la validación del modelo con animales de experimentación se estudió la toxicocinética del Clonazepam en 14 ratas Wistar-machos de 10 semanas de edad

y 200g en promedio de peso corporal. La administración se realizó por vía intravenosa, en una dosis de 0.44 mg/kg. Para el cálculo de la dosis se consideraron los factores de conversión  $K_m=37$  para humano y  $K_m=6$  para rata basados en el área corporal (body surface area) (Reagan-Shaw, et. al., 2008) y la dosis terapéutica de Clonazepam por vía intravenosa de 5 mg en adultos (Roche & Pharmaceuticals, 2007).

### **3.2.2. Toma de muestras**

Para la construcción de las curvas farmacocinéticas se colectaron muestras de sangre y cerebro de la siguiente forma:

Muestras sanguíneas: se colectaron muestras de 500  $\mu$ L de sangre por punción en el seno venoso ocular a diferentes tiempos: 0.08, 0.25, 0.5, 1, 4, 8, 10, 24, 34, 48, 72 y 96 hrs. Antes de cada toma de muestra se administró isoflurano por vía inhalatoria. Se muestrearon 2 animales por tiempo hasta las 96 hrs (Tabla 7). Estas muestras se almacenaron a 4°C.

Muestras de cerebro: se sacrificó un animal por tiempo de muestreo, las muestras se recolectaron posterior a la eutanasia del animal en los tiempos 0.25, 0.5, 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 h y se conservaron a 4°C hasta su análisis.

**Tabla 7. Muestras a obtener por cada tiempo de muestreo en la experimentación con ratas.**

Tiempo (h)	Muestras a obtener	
	Sangre	Cerebro
0.08	x	
0.25	x	x
0.5	x	x
1	x	x
4	x	x
8	x	x
10	x	x
24	x	x
34	x	x
48	x	x
72	x	x
96	x	x
120		x

### **3.2.3. Determinaciones analíticas**

#### **3.2.3.1. Preparación de la muestra**

##### **3.2.3.1.1. Muestras de sangre**

Basado en el método propuesto por Jing y colaboradores (Jing, et.al., 2014) y modificado de acuerdo a las condiciones de las muestras se realizó la siguiente metodología. Se transfirieron 500 µL de sangre a un tubo para centrifuga de 15 mL y se agregó 1.0 mL de agua Milli-Q y 1.0 mL de solución saturada de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para obtener un pH final de 9. La mezcla se agitó en vortex por 5 minutos y se añadieron 2.5 mL de acetato de etilo para después colocarse en el sonicador durante 10 minutos, posteriormente se agitó y centrifugó la mezcla durante 5 minutos y a 4000 rpm por 10 minutos respectivamente. Se recolectó la fase orgánica en un tubo para centrifuga y para la fase acuosa se repitió la extracción en dos ocasiones más, agregando para cada extracción 2.5 mL de

acetato de etilo. Se sonicó durante 5 minutos y se agitó en el vortex por 5 minutos más para finalmente centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos y poder recolectar la fase orgánica superior. Las fases orgánicas recolectadas, se pasaron a través de un cartucho de extracción en fase sólida C18, previamente acondicionado con 3.0 mL de etanol, la fase resultante se evaporó a 40°C bajo flujo de nitrógeno. El extracto se reconstituyó en 0.5 mL de metanol, y se filtró con una membrana de nylon (tamaño de poro 0.22 µm) para inyectarlo en el cromatógrafo.

### **3.2.3.2. Muestras de cerebro**

Basado en el método propuesto por Jing y colaboradores (Jing, Yintao, Junwei, 2014) y modificado de acuerdo a las condiciones de las muestras se realizó la siguiente metodología. Se pesaron 500 mg de la muestra de cerebro. Se trituró el tejido pesado lo más posible con ayuda de un mortero de ágata y se adicionó 1.0 mL de agua Milli-Q y 1.0 mL de solución saturada de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Una vez triturado el tejido, se transfirió la mezcla a un tubo para centrifuga de 15 mL y se agregaron 1.0 mL de agua Milli-Q y 1.0 mL de solución saturada de carbonato de sodio adicionales con estas soluciones se lavó previamente el mortero en el que se trituró el tejido. Se sonicó el tubo durante 10 minutos y posteriormente se agitó con ayuda del vortex por 5 minutos. A la mezcla resultante se le añadieron 3.0 mL de acetato de etilo (grado HPLC) y se colocó nuevamente en el sonicador durante 5 minutos, posteriormente se agitó durante 5 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. La fase orgánica se recolectó en otro tubo para centrifuga y se repitió la extracción con la fase acuosa en dos ocasiones más. Para para cada extracción se agregaron 2.0 mL de acetato de etilo, se sonicó la mezcla durante 5 minutos y se agitó en el vortex por 5 minutos más, finalmente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se recolectó la fase orgánica superior. Las fases orgánicas recolectadas se pasaron por un cartucho de extracción en fase sólida C18, previamente acondicionado con 3.0 mL de etanol, la fase resultante se evaporó a 40°C bajo flujo de nitrógeno. El extracto se reconstituyó en 0.5 mL de metanol, y se filtró con una membrana de nylon (tamaño de poro 0.22 µm) para inyectarlo en el cromatógrafo.

### **3.3.2. Cuantificación de Clonazepam por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas**

#### ***3.3.2.1. Instrumentación***

El análisis de las muestras se realizó utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución Agilent® (Agilent 1200 Series LC) mediante detección por espectrometría de masas de triple cuadrupolo SCIEX® (API 3200MD series). Las muestras fueron procesadas con el software Analyst de SCIEX® (versión 1.7).

#### ***3.3.2.2. Condiciones cromatográficas***

La separación cromatográfica fue realizada con una columna Phenomenex C18 (Synergi™ 4 µm Fusion-RP 80 Å 50x2 mm), la fase móvil compuesta por los eluyentes A= buffer de acetatos 5 mM a pH 4.0 y B= acetonitrilo grado HPLC. Volumen de inyección 10 µL. Flujo de la fase móvil de 350 µL/min. Gradiente de elución: 0.00-1.00 minutos el gradiente del eluyente A disminuye de 90% a 10%; 1.00-3.00 minutos la composición de la fase móvil permanece constante con un porcentaje de 10% del eluyente A; 3.00-4.00 minutos, el gradiente del eluyente A aumenta a 90%; 4.00-8.00 minutos la composición de la fase móvil permanece constante con un porcentaje de 90% del eluyente A.

#### ***3.3.2.3. Condiciones para espectrometría de masas***

Ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva con un rango de barrido completo de 50 a 500 m/z Da. Para la detección y la cuantificación de Clonazepam se aplicaron las siguientes condiciones de entrada ESI: gas 1, nitrógeno (55 psi); gas 2, nitrógeno (65 psi); voltaje de rociado de iones, 5000 V; temperatura de la fuente de iones, 500 ° C; gas de cortina, nitrógeno (35 psi).

Modo de adquisición dependiente de la información (IDA). Esta adquisición de datos, las configuraciones específicas del analito se determinaron utilizando el software Analyst en el modo de optimización cuantitativa.

### 3.3.2.4. Cuantificación del analito

Para la determinación analítica de las concentraciones de la muestra, se preparó una curva de calibración que se muestra en la Figura 13, obteniéndose la ecuación que se presenta a continuación:

$$y = 1.91x + 351 \quad (r=0.9987) \quad (11)$$

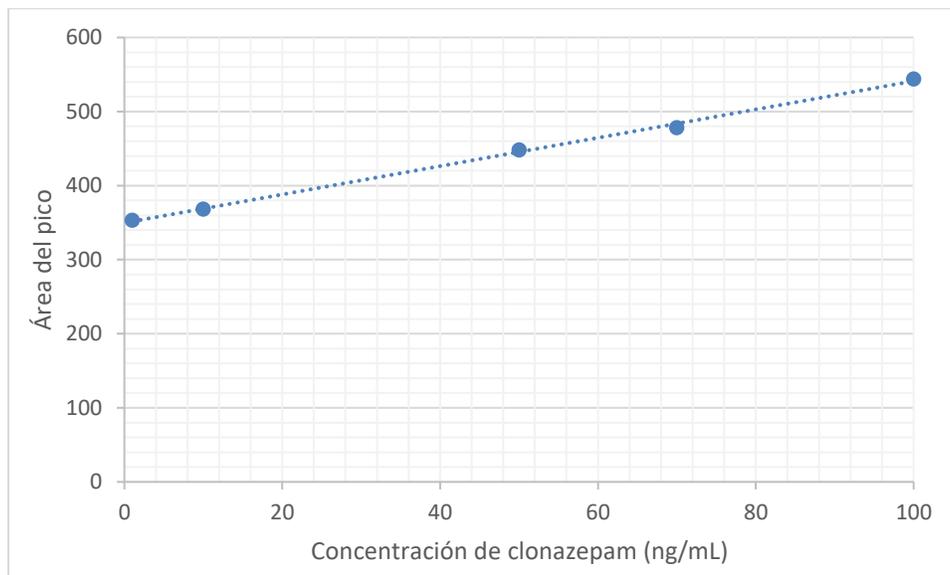


Figura 13. Curva de calibración para Clonazepam

Con los datos obtenidos de las áreas de cada una de las muestras y la ecuación 12, se despeja el valor de la concentración.

$$\text{Concentración de clonazepam en la muestra} \left( \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Área del pico} - 351}{1.91} \quad (12)$$

## 4. Resultados

### 4.1. Modelo PBPK

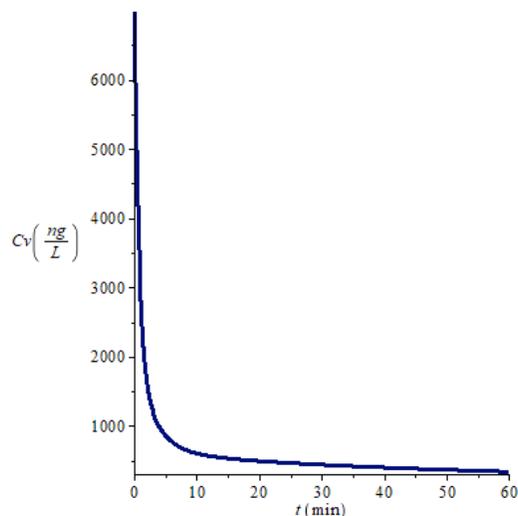


Figura 14. Curva farmacocinética para sangre venosa de rata construida a partir de la simulación *in silico* del modelo PBPK para Clonazepam. La gráfica muestra las concentraciones predichas por el modelo PBPK de Clonazepam ( $\text{ng/L}$ ) en cerebro de rata a diferentes tiempos ( $\text{min}$ ), con una concentración inicial en sangre de 6982.82  $\text{ng/L}$  (correspondiente a una dosis de 0.44  $\text{mg/kg}$ ).

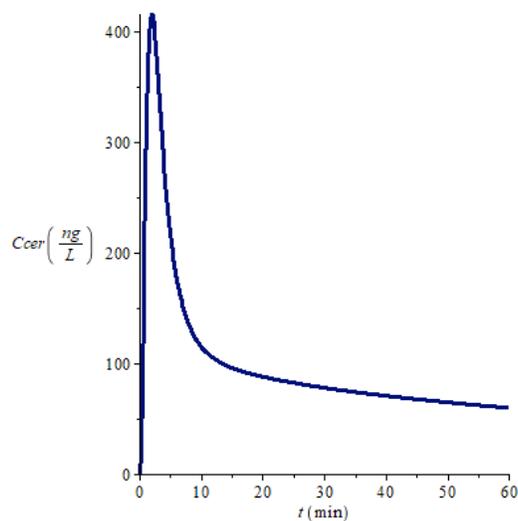


Figura 15. Curva farmacocinética para cerebro de rata construida a partir de la simulación *in silico* del modelo PBPK para Clonazepam. La gráfica muestra las concentraciones predichas por el modelo PBPK de Clonazepam ( $\text{ng/L}$ ) en cerebro de rata a diferentes tiempos ( $\text{min}$ ), con una concentración inicial en sangre de 6982.82  $\text{ng/L}$  (correspondiente a una dosis de 0.44  $\text{mg/kg}$ ).

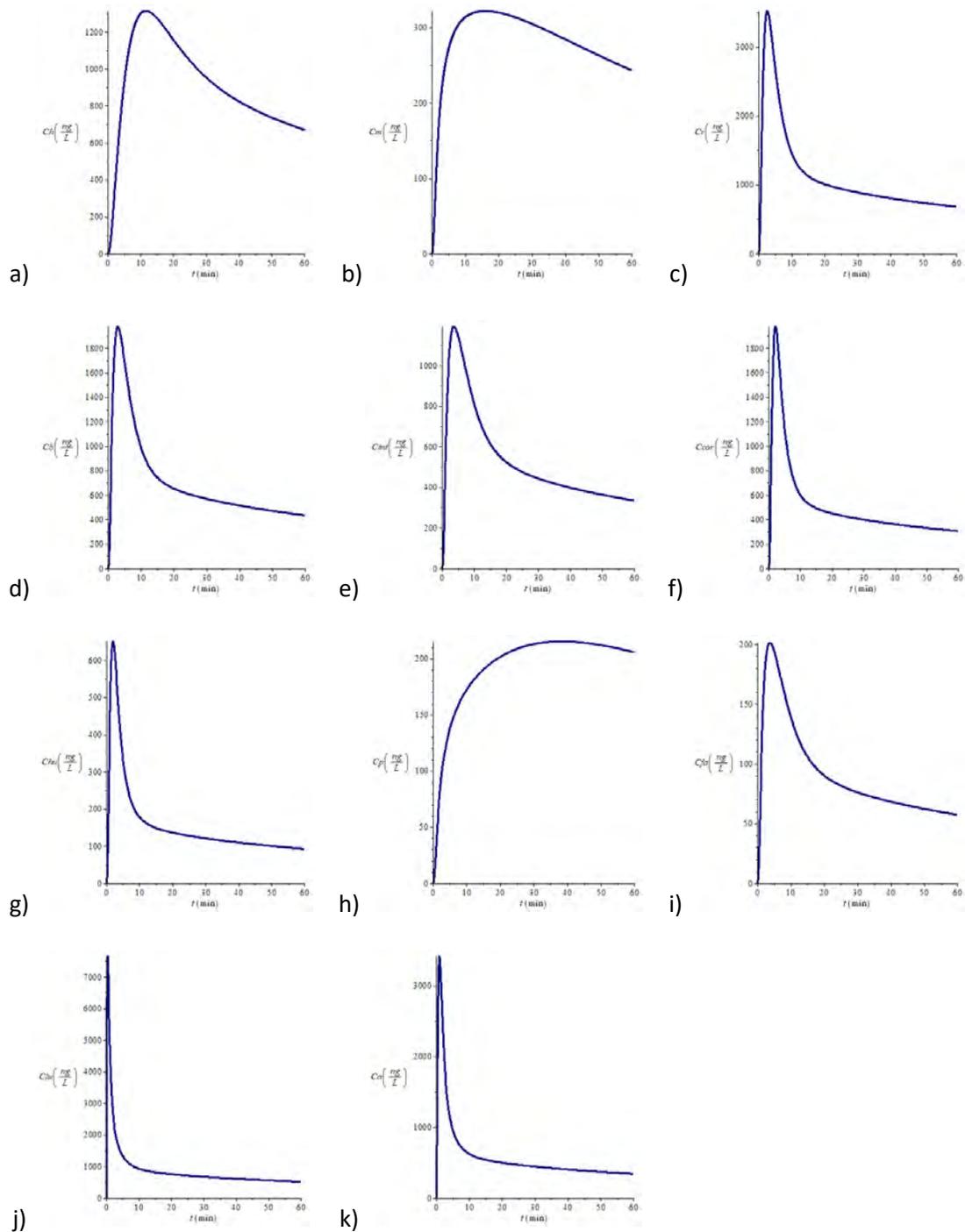


Figura 16. Curvas farmacocinéticas construidas a partir de la simulación *in silico* del modelo PBPK para Clonazepam. Las gráficas muestran las concentraciones predichas por el modelo PBPK de Clonazepam (ng/L) en a) hígado, b) músculo, c) riñón, d) bazo, e) intestino, f) corazón, g) hueso, h) piel, i) tejido adiposo, j) pulmón, k) sangre arterial de rata. Con una concentración inicial en sangre de 6982.82 ng/L (correspondiente a una dosis de 0.44 mg/kg).

Con los resultados obtenidos en la simulación del modelo PBPK para Clonazepam en rata se pudieron calcular los parámetros farmacocinéticos que se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8. Parámetros calculados con los resultados del modelo PBPK construido para Clonazepam en rata.**

Parámetro	Cálculo	Valor
Volumen de distribución	$V_d = V_v + V_a + \sum V_T P_T$	3.37 L/kg
$K_{el}$ (sangre venosa)	Pendiente al graficar $\ln C_v$ vs $t$	$0.0517 \text{ min}^{-1}$
$t_{1/2}$ (sangre venosa)	$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}}$	13.40 minutos

## 4.2 Farmacocinética *in vivo*

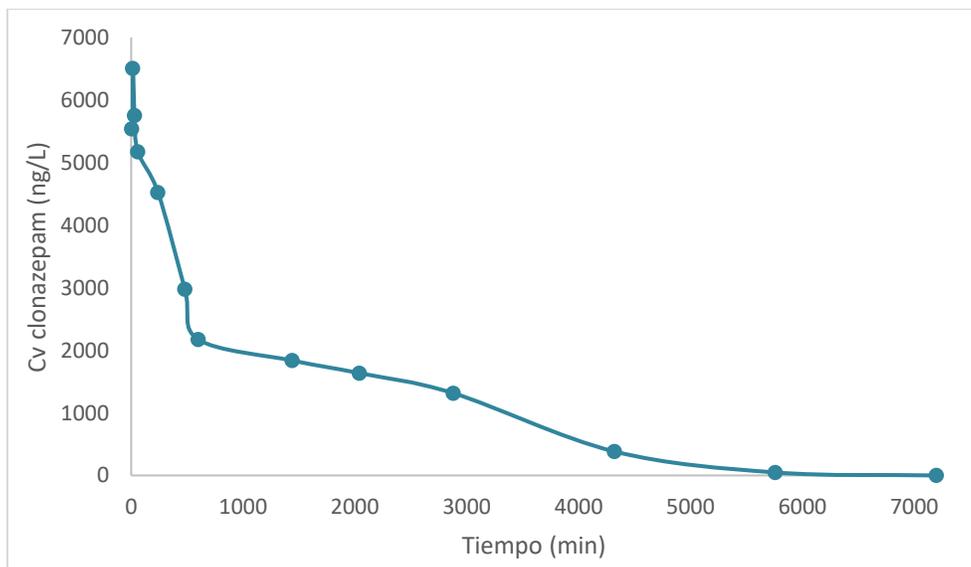


Figura 17. Curva farmacocinética *in vivo* del Clonazepam en sangre venosa. La gráfica muestra las concentraciones de Clonazepam (ng/L) obtenidas experimentalmente en sangre de rata a diferentes tiempos (min), tras la administración de una dosis de Clonazepam de 0.44 mg/kg.

**Tabla 9. Parámetros calculados con los resultados de la farmacocinética *in vivo* del Clonazepam en rata.**

Parámetro	Cálculo	Valor
$K_{el}$ (sangre venosa)	Pendiente al graficar $\ln C_v$ vs $t$	$0.0345 \text{ h}^{-1}$
$t_{1/2}$ (sangre venosa)	$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}}$	20.09 h

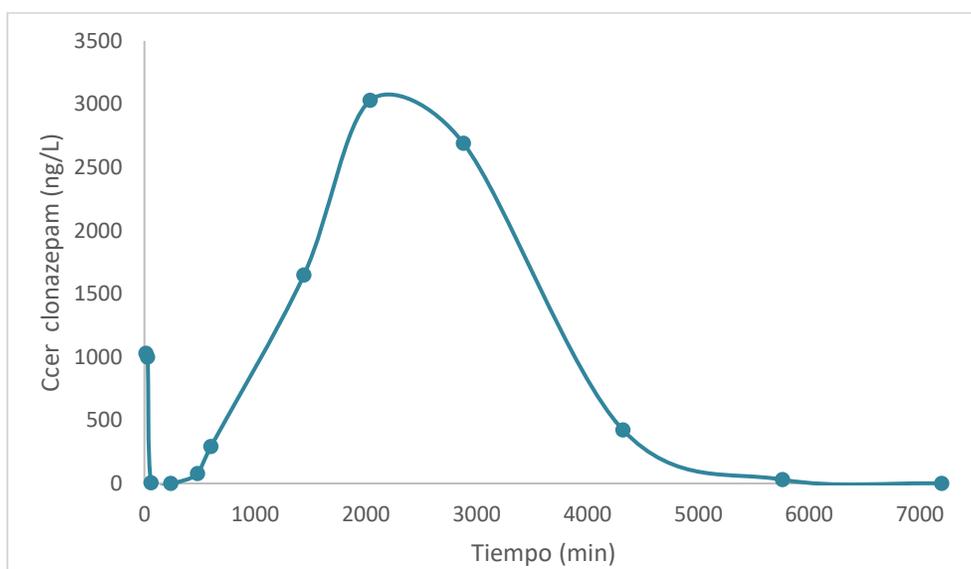


Figura 18. Curva farmacocinética *in vivo* del Clonazepam en cerebro. La gráfica muestra las concentraciones de Clonazepam (ng/L) obtenidas experimentalmente en cerebro de rata a diferentes tiempos (min), tras la administración de una dosis de Clonazepam de 0.44 mg/kg.

## 5. Discusión

Para la construcción del modelo PBPK para Clonazepam se siguió el principio de parsimonia, por lo cual el modelo planteado es lo más simple posible, de esta manera se pudieron minimizar el número de parámetros empleados y se evitó el uso de ecuaciones diferenciales complejas. Debido a lo anterior y a falta de literatura científica disponible, la farmacocinética del Clonazepam se presenta de manera sencilla, en la cual la eliminación de la sustancia es por medio del aclaramiento total, el cual comprende el aclaramiento renal y el aclaramiento hepático y no se incluyeron procesos enzimáticos ya que existe más de una ruta de biotransformación y no se encuentran disponibles los parámetros necesarios para integrarlos al modelo.

Inicialmente se planteó la idea de agrupar algunos órganos (“lumping”) de acuerdo a sus características fisiológicas y de esta forma mantener sencillo el modelo PBPK, sin embargo se observó que esto no sería posible, ya que para realizar este “lumping” es necesario conocer la farmacocinética del Clonazepam en todos los órganos y normalizar sus perfiles de concentración-tiempo, para identificar aquellos órganos que tengan una cinética de eliminación similar (Pilari, 2010), no obstante en los artículos consultados esto no se menciona.

De la simulación en Maple™ 18 se obtuvieron gráficos para los 13 compartimentos como resultado de la resolución de las ecuaciones planteadas y la correspondiente parametrización. De acuerdo con esto se observó que el tiempo de vida media del Clonazepam en sangre de rata es muy corta (13.40 min), sugiriendo que una vez que la sustancia se administra vía intravenosa, es casi inmediata su biotransformación y eliminación, el mismo comportamiento sucede en todos los compartimentos. Al comparar lo anterior con datos reportados en la literatura no se encuentra una correspondencia, lo cual indica que se debe proponer un adecuado balance de masas en el modelo, ya sea modificando alguna de las ecuaciones diferenciales o añadiendo otra.

Para comparar el modelo construido con la farmacocinética *in vivo* del Clonazepam se realizó el procedimiento experimental, que además permitiría refinar el modelo. Los resultados se presentan en la Tabla 9 y las Figuras 17 y 18, donde la concentración máxima de Clonazepam es mayor en sangre venosa que en cerebro. *In vivo* la concentración máxima encontrada en sangre venosa es de 6506.67 ng/L, la cual es ligeramente menor a la administrada, que es la que se observa en el modelo PBPK, además de que *in vivo* esta concentración máxima no se presenta al tiempo 0. Con respecto al cerebro, se observa que la concentración máxima encontrada *in vivo* sucede a las 38 horas y es aproximadamente 10 veces mayor a la que predice el modelo PBPK.

Los datos obtenidos no son significativos ya que corresponden solamente a dos ratas por tiempo de muestreo para la cuantificación de Clonazepam en sangre y una rata en el caso de la cuantificación de Clonazepam en cerebro, por lo que no pueden considerarse como resultados absolutos para validar el modelo PBPK para Clonazepam construido. Se buscó en la literatura resultados obtenidos *in vivo* que describieran la farmacocinética del Clonazepam en rata, desafortunadamente no se encontraron artículos con los cuales se pudiera hacer la comparación.

Aun tomando los datos obtenidos experimentalmente, es evidente que el modelo necesita ser refinado, ya que la eliminación del Clonazepam no es tan rápida como se observa, de acuerdo a la literatura el tiempo de vida media del Clonazepam es de 28.7 horas (Dreifuss, et. al., 1975). Esto indica que las ecuaciones diferenciales de los compartimentos sanguíneos y del pulmón deben corregirse o añadirse algún término que permita que la concentración de Clonazepam no descienda tan rápidamente y deberá comprobarse que este cambio sea significativo para el ajuste del modelo, pues Bonate no encontró diferencia estadística entre incluir o no sitios de unión en los pulmones (Bonate, 2006).

Otro parámetro calculado a partir del modelo *in silico* es el volumen de distribución, que se determinó considerando los volúmenes de los compartimentos y los coeficientes de partición, obteniendo un valor de (3.37 L/kg). Para el cálculo de este parámetro se realiza la suma de los volúmenes de los distintos compartimentos e

involucra la lipofiliidad (con los coeficientes de partición), lo cual podría explicar la diferencia entre los valores, ya que estos parámetros varían para cada rata, debido a su peso y el de cada uno de sus órganos (Sun, et. al., 2001). Para humanos el valor de volumen de distribución se estima de 3 L/kg (Müller, et. al., 1973), el cual es similar al calculado, sin embargo se trata de una especie diferente.

Se puede observar un fenómeno en común en las curvas farmacocinéticas obtenidas por el modelo *in silico* las obtenidas de la experimentación *in vivo*, este corresponde a un retraso en el cual se alcanza la concentración máxima de Clonazepam en el cerebro, ya que esta concentración máxima se obtiene cuando en el compartimento sanguíneo la concentración de Clonazepam se encuentra decayendo. Este es uno de los resultados más importantes obtenidos, ya que en este órgano (cerebro) es donde el Clonazepam tiene la mayor actividad farmacodinámica y permite comprobar que los niveles plasmáticos máximos de Clonazepam están escasamente correlacionados con los efectos terapéuticos o los efectos secundarios del fármaco (Pinder, et. al., 1976), lo cual fue previamente reportado por Ellinwood y colaboradores mediante estudios comportamentales (Ellinwood, et. al., 1993). De acuerdo con lo anterior, el fenómeno descrito se conoce como histéresis, en este caso del Clonazepam, lo cual se refiere al retardo entre el máximo de la concentración plasmática y el máximo de la concentración en el sitio-efecto (Sepúlveda, 2012).

Esto nos indica que el obtener una muestra sanguínea para realizar el análisis toxicológico podría no ser suficiente, por lo tanto el diagnóstico de intoxicación por Clonazepam debe incluir criterios clínicos que se manifiesten sobre el Sistema Nervioso central, cardiovascular y respiratorio (Ellinwood, et. al., 1993), y en los casos en que una muestra *perimortem* de cerebro se encuentre disponible, esta será una mejor muestra forense para el análisis toxicológico cuando se sospeche del consumo de Clonazepam. Adicionalmente el análisis toxicológico de una muestra *postmortem* de cerebro permitiría inferir el consumo de Clonazepam.

Dentro de las mejoras realizadas al modelo se probó ajustar este a los resultados obtenidos experimentalmente, lo cual permitió obtener un retraso para la eliminación

de Clonazepam en sangre venosa y cerebro, sin embargo se concluyó que era necesario el ajuste en todos los órganos para que este cambio fuera realmente significativo y predijera de manera correcta la farmacocinética del Clonazepam en los distintos órganos. Por esto para refinar adecuadamente el modelo PBPK y validarlo, la farmacocinética *in vivo* requerirá la extracción de los órganos propuestos en el modelo y la obtención de las curvas farmacocinéticas que ilustren el comportamiento del Clonazepam en estos a lo largo del tiempo, posteriormente de esta manera cada uno de los 13 compartimentos del modelo *in silico* podrá ajustarse.

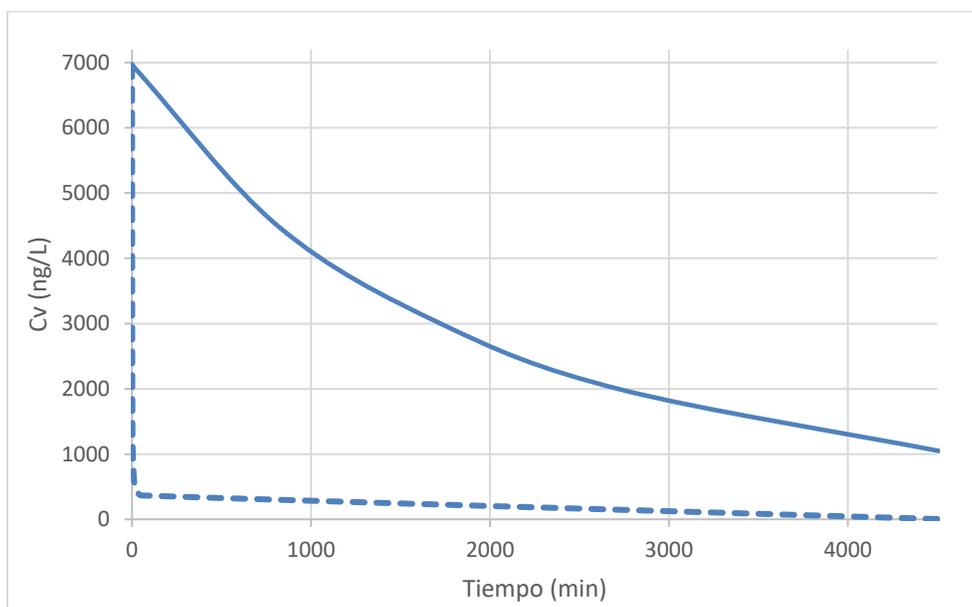


Figura 19. Ajuste del modelo PBPK para Clonazepam con base en la farmacocinética descrita *in vivo* en sangre venosa. La línea punteada representa el comportamiento del modelo PBPK en el compartimento de sangre venosa sin ajustar. La línea continua indica el retraso ocasionado en el modelo para la farmacocinética en sangre venosa, ajustado con los datos obtenidos experimentalmente.

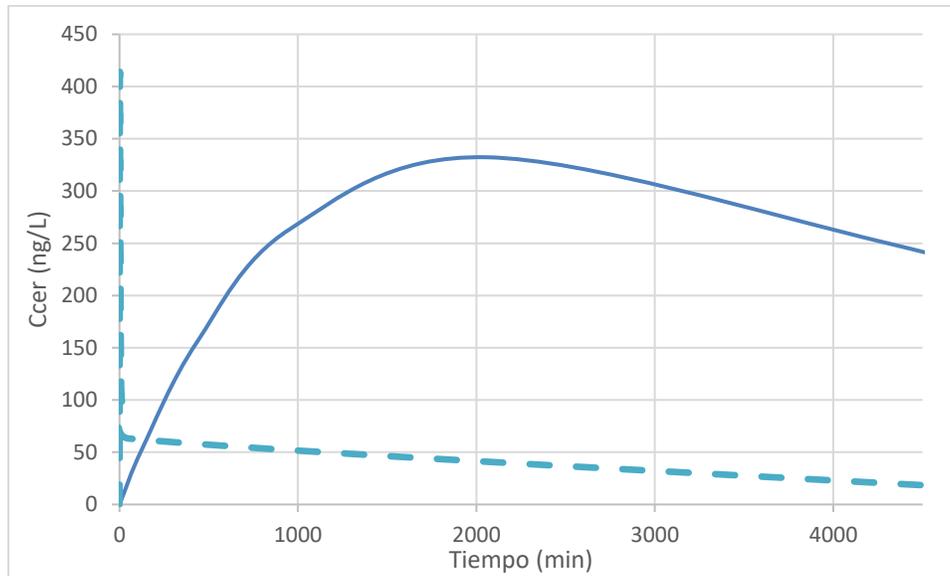


Figura 20. Ajuste del modelo PBPK para Clonazepam con base en la farmacocinética descrita *in vivo* en cerebro. La línea punteada representa el comportamiento del modelo PBPK en el compartimento del cerebro sin ajustar. La línea continua indica el retraso ocasionado en el modelo para la farmacocinética en el cerebro ajustado con los datos obtenidos experimentalmente.

Para mejorar la predicción del modelo PBPK se propone determinar algunos de los parámetros experimentalmente, como la unión a proteínas en plasma y los coeficientes de partición tejido:plasma del Clonazepam, debido a que no se encontraron reportados en la literatura y tuvieron que ser calculados o en el caso de la unión de Clonazepam a proteínas plasmáticas se empleó el dato reportado para humanos. De igual manera se podría utilizar otro programa computacional que permita realizar el ajuste de todas las ecuaciones matemáticas simultáneamente, lo cual sería muy útil cuando se tengan datos experimentales significativos para poder validar el modelo.

## 6. Conclusiones

Se construyó un modelo PBPK para describir la farmacocinética del Clonazepam en los 13 órganos seleccionados, observándose una cinética de eliminación muy rápida en todos los compartimentos.

El modelo no pudo ser validado con los resultados obtenidos experimentalmente, debido a que estos no se asemejaban a los datos publicados de la literatura, además de que no son significativos debido al diseño del experimento y a que solamente se construyeron las curvas obtenidas en 2 de los órganos considerados para el modelo PBPK.

El modelo PBPK se formuló basándose en parámetros fisiológicos específicos para rata, la composición de los tejidos y parámetros específicos del Clonazepam, estos fueron recopilados de la literatura o calculados, por lo que en las gráficas se muestra que el Clonazepam se distribuye de distinta manera en los diferentes órganos.

Hace falta refinar el modelo para que se ajuste a los datos de la literatura y a la cinética *in vivo* del Clonazepam, para lo cual se deben considerar distintos aspectos fisiológicos, para evitar el desbalance de masas así como considerar un diferente diseño experimental para obtener datos significativos, de igual manera se propone determinar algunos parámetros como la unión a proteínas y los coeficientes de reparto de manera experimental, para minimizar los errores por estimar estos parámetros o utilizar los de otra especie.

También será pertinente incluir la biotransformación del Clonazepam para que las concentraciones de la sustancia de abuso sean más exactas, e inclusive se podría modelar la formación, distribución y eliminación de al menos un metabolito para que se realicen las determinaciones de este y sea posible una doble comprobación del modelo. La cuantificación de al menos un metabolito permitiría ampliar las aplicaciones del modelo, ya que al establecer una relación Clonazepam/metabolito se podría conocer el último tiempo de consumo de la sustancia.

El modelo planteado es una primera aproximación a la farmacocinética real del Clonazepam en rata, y demuestra tener potencial para relacionar las concentraciones sanguíneas con las de cerebro, lo cual permitirá un mejor entendimiento sobre el fenómeno de histéresis del Clonazepam y así poder hacer mejores predicciones de la temporalidad de sus efectos para fines forenses.

Con estos resultados obtenidos no se puede establecer un modelo que describa totalmente y de forma acertada la toxicocinética del Clonazepam, pero permite inferir su comportamiento y distribución en los diferentes órganos.

## 7. Referencias

- Aarons L. *Physiologically based pharmacokinetic modelling: A sound mechanistic basis is needed*. Br J Clin Pharmacol. 2005; 60(6):581-583. doi:10.1111/j.1365-2125.2005.02560.x.
- Anderson DA. *Compartmental modeling and tracer kinetics: lecture notes*. Vol. 50. New York: Springer-Verlag; 1983.
- Arcila V, Conde C, Nieto J, García F. *Comparación de los valores de referencia hematológicos en ratas wistar/UIS (Rattus norvegicus) con parámetros establecidos en laboratorios de altos estándares*. Rev Spei Domus. 2010; 6(12):45-51. <http://wb.ucc.edu.co/sdmvz/files/2013/06/articulo-6-vol-6-n-12.pdf>.
- Baxter LT, Zhu H, Mackensen DG, Butler WF, Jain RK. *Biodistribution of monoclonal antibodies: scale-up from mouse to human using a physiologically based pharmacokinetic model*. Cancer Res. 1995; 55:4611-4622.
- Bennett T y Holloway K. *The Causal Connection Between Drug Misuse and Crime*. Br J Criminology. 2009; 49(4), 513–531. <http://doi.org/10.1093/bjc/azp014>
- Bjorkman S. *Reduction and lumping of physiologically based pharmacokinetic models: prediction of the disposition of fentanyl and pethidine in humans by successively simplified models*. J Pharmacokinetic Pharmacodyn. 2003; 30(4):285-307.
- Blum JE, Haefely W, Jalfre M, Pole P, Scharer K. *Pharmakologie und Toxikologie des Antiepileptikums Qonazepam*. Arzneimittel-Forschung 23: 377.

- Bonate PL. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation*. New York, Springer Science+Business Media, LLC. 2006.
- Brochot C, Toth J, Bois F.Y. *Lumping in pharmacokinetics*. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2005; 32(5-6):719-736
- Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. *Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models*. Toxicol Ind Health. 1997; 13(4):407-484.
- Browne TR y Penry JK. *Benzodiazepines in the treatment of epilepsy*. Epilepsia. 1973; 14: 277.
- Browne T. *Clonazepam. A Review of a New Anticonvulsant Drug*. Arch Neurol. 1976; Vol.33. 326-332.
- Campo-Soria C, Chang Y, Weiss DS. *Mechanism of action of benzodiazepines on GABAA receptors*. Br J Pharmacol. 2006; 148:984–90.
- Caso A, Fernandez R, Romo A, et. al. *Evaluacion neuropsiquiatrica del clonazepam en pacientes epilepticos*. Gac Med Mex. 1973; 106:385-392.
- Carson, M.J. and Gildea, C. *Treatment of minor motor seizures with clonazepam*. Developmental Medicine and Child Neurology. 1975; 17: 306.
- Chandra, B. *Long-term treatment with clonazepam*. Modern Medicine of Asia. 1973; 11: 15.
- Clewell RA y Clewell HJ. *Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment*. Regul Toxicol Pharmacol.

2007; 50(1):129-143. doi:10.1016/j.yrtph.2007.10.012.

Chebib M y Johnston GA. *The ABC of GABA receptors: a brief review*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1999; 26:937–40.

Chèze M, Villainb M, Pèpina G. *Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS Application to forensic cases of drug facilitated crimes*, Forensic Science International. 2004; 145; 123-130.

Chien JY y Mohutsky MA. *Physiological approaches to the prediction of drug-drug interactions in study populations*. Curr Drug Metab. 2003; 4: 347-356.

Chiu W y White P. *Steady-state solutions to PBPK models and their applications to risk assessment I: route-to-route extrapolation of volatile chemicals*. Risk Anal. 2006; 26(3):769-780.

Chouinard G. *Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound*. J Clin Psychiatry. 2004; 65:7–12.

Clewell H. *The application of physiologically based pharmacokinetic modeling in human health risk assessment of hazardous substances*. Toxicol Lett. 1995; 79(1-3):207-217. doi:10.1016/0378-4274(95)03372-R.

Clewell H, Clewell RA, Andersen ME, Hammer Institutes for Health Sciences; Research Triangle Park; NC U. *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Risk Assessment*. Elsevier BV All rights Reserv. 2011; 536-570.

Davies B, Morris T. *Physiological parameters in laboratory animals and humans*.

Pharm Res. 1993; 10(7):1093-109

Delp MD, Evans MV, Duan C, Michael D. *Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer-344 rats.* J Appl Physiol 1998; 1813-1822.

Dreifuss FE, Penry JK, Rose SW, Kupferberg HJ, Dyken P, Sato S. *Serum clonazepam concentrations in children with absence seizures.* Neurology. 1975; 25: 255.

Dumermuth G, Hanson RA, Menkes JM. *A new anticonvulsant in the management of minor motor seizures.* Developmental Medicine and Child Neurology. 1972; 14: 3.

Dumermuth G y Kovacs E. *Die Wirkung von Clonazepam in der peroralen Langzeittherapie schwerer Epilepsieformen des Kindesalters.* Schweizerische Medizinische Wochenschrift. 1974; 104: 608.

Ellinwood E, Nikaido A, Gupta S, Douglas G. *Comparison of the relationship between structure and CNS effects for lorazepam, clonazepam and alprazolam.* J Psychopharmacol. 1993; 7(1); 24-32.

Eschenhof E. *Untersuchungen iiber das Schicksal des Antikonvulsivums Qonazepam in Organismus der Ratte, des Hundes und des Menschen.* Arzneimittelforschung. 1973; 23: 390.

Espié P, Tytgat D, Sargentini-Maier ML, Poggesi I, Watelet JB. *Physiologically based pharmacokinetics (PBPK).* Drug Metab. 2009; Rev; 41: 391-407. doi:10.1080/10837450902891360.

Flórez J. *Farmacología Humana*. 6a. Edición. Elsevier Masson SAS, España. 2014.

Frederick DL. *Toxicology testing in alternative specimen matrices*. Clinics in Laboratory Medicine. 2012; 32(3), 467–92.

Gastaut H. *Proprietes anti-epileptiques exceptionnelles d'une benzodiazepine nouvelle le clonazepam*. La Vie Medicale. 1970; 51: 5115.

Gennaro A. *Remington Farmacia*. 20° Ed. Médica Panamericana. 2003; 1324-1326.

Ghyzel MH, Pèpin G, Kintz. *Drug submission*, Toxicorama. 1998: 10; 126–127.

Gillespie, WR. *Noncompartmental versus compartmental modelling in clinical pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet. 1991; 20: 253-62.

Hansch C, Leo A, Hoekman D. *Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. Washington, DC: American Chemical Society. 1995.

Hanson RA y Menkes JM. *A new anticonvulsant in the management of minor motor seizures*. Developmental Medicine and Child Neurology. 2009; 14: 3.

Holz M y Fahr A. *Compartment modeling*. Adv Drug Deliv Rev. 2001; 48: 249-264.

Huestis MA, Barnes A., Smith ML. *Estimating the time of last cannabis use from plasma delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol concentrations*. Clin Chem. 2005; 51(12), 2289–95. doi:10.1373/clinchem.2005.056838

Huestis MA y Smith ML. *Modern analytical technologies for the detection of drug abuse and doping*. Drug Discovery Today. Technologies. 2006; 3(1), 49–57.

doi:10.1016/j.ddtec.2006.03.004

Jing D, Yintao S, Junwei, W. *Qualitative and Quantitative Analysis of Clonazepam and its Metabolite 7-aminoclonazepam in Blood by LC-tandem QTOF/MS and LC-MS/MS*. Forensic Sci Sem. 2014; 4(1), 45–52.

Kaplan SA, Alexander K, Jack ML, Puglisi CV, De Silva JA, Lee JT, Weinfeld RE. *Pharmacokinetic Profiles of Clonazepam in Dog and Humans and of Flunitrazepam in Dog*. J Pharmacol Sciences, Vol. 63. 1974; 527-532.

Khali F, y Läer S. *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: Methodology, Applications, and Limitations with a Focus on Its Role in Pediatric Drug Development*. J Biomed and Biotech. 2011. DOI:10.1155/2011/907461

Knop IF, Kleijn E, Edmunds LC. The determination of clonazepam in plasma by GLC. Pharmaceutisch Weekblad. 1975; 110: 297

Kruse R y Blankenhorn V. *Zusammenfassender Erfahrungsbericht iiber die klinische Anwendung und Wirksamkeit von Clonazepam auf verschiedene Formen epileptischer Anfälle*. Acta Neurologica Scandinavica 49. 1973; (Suppl. 53): 60.

Kummerow D, Hamann J, Browning J, Wilkins R, Ellory J, Bernhardt I. *Variations of intracellular pH in human erythrocytes via K<sup>+</sup>(Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup>exchange under low ionic strength*. J Membr Biol. 2000; 176:207-216.

Lennox WG y Lennox MA. *Epilepsy and Related Disorders*. Boston, Little Brown & Co. 1960; 156-170.

Lehtovaara R. *A clinical trial with clonazepam*. Acta Neurol Scand 49. 1973; (suppl

53):77-81.

Liu L y Pang KS. *An integrated approach to model hepatic drug clearance*. Eur J Pharm Sci. 2006; 29: 215-230.

Lowe RH, Abraham TT, Darwin WD, Hering R, Cadet JL, Huestis MA. *Extended urinary Delta9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure*. Drug and Alcohol Dependence. 2009; 105(1-2), 24–32. doi:10.1016/j.drugalcdep.2009.05.027

Lund M y Trolle E. *Clonazepam in the treatment of epilepsy*. Acta Neurol Scand 49. 1973; (suppl 53):82-9.

Lüpfert C y Reichel A. *Development and application of physiologically based pharmacokinetic-modeling tools to support drug discovery*. Chem Biodiversity. 2005; 1462- 1486.

Macdonald RL, Olsen RW. *GABA<sub>A</sub> receptor channels*. Annu Rev Neurosci. 1994; 17:569–602.

Martin D y Hirt I. *Klinische Erfahrungen mit Clonazepam (Rivotril) in der Epilepsiebehandlung bei Kindern*. Neuropaediatric. 1973; 4: 245.

Maruyama W, Hirano S, Kobayashi T, Aoki Y. *Quantitative risk analysis of particulate matter in the air: interspecies extrapolation with bioassay and mathematical models*. Inhal. Toxicol. 2006; 18(13):1013-1023.

McGregor MJ, Lipowska M, Shah S, Du Mont J, De Siato C. *An exploratory analysis of suspected drug-facilitated sexual assault seen in a hospital emergency department*, Woman Hlth. 2003; 37; 71–80.

- McKernan RM, Whiting PJ. *Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?* Trends Neurosci. 1996; 19:139–43.
- Mihic SJ, Whiting PJ, Klein RL, Wafford KA, Harris RA. *A single amino acid of the human gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma 2 subunit determines benzodiazepine efficacy.* J Biol Chem. 1994; 269:32768–73.
- Muller W y Wollert U. *Characterisation of the binding of benzodiazepines to human serum albumin.* Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 1973; 280: 229.
- Naestoft J, Larsen NE. *Quantitative determination of clonazepam and its metabolites in human plasma by gas chromatography.* J Chromatogr. 1974; 93:113-122.
- Negrusz A, Gaensslen RE. *Analytical developments in toxicological investigation of drug-facilitated sexual assault,* Anal Bioanal Chem. 2003; 376; 1192–1197.
- Negrusz A, Moore CM, Kern JL, Janicak PG, Strong MJ, Levy NA. *Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-Aminoclonazepam in hair,* J Anal Toxicol. 2000; 24; 614–620.
- Nelson J y Chouinard G. *Guidelines for the clinical use of benzodiazepines: pharmacokinetics, dependency, rebound and withdrawal.* Can J Clin Pharmacol. 1999; 6: 69–83.
- Nestorov I. *Modelling and simulation of variability and uncertainty in toxicokinetics and pharmacokinetics.* Toxicol Lett. 2001; 120: 411-20.
- Nestorov I. *Whole Body Pharmacokinetic Models.* Clin Pharmacokinet.. 2003; 40: 883-908.

Nestorov I. *Whole-body physiologically based pharmacokinetic models*. Toxicol Lett. 2007; 235-48. DOI: 10.1517/17425255.3.2.235

Nieto M. *Valoración clínica de clonazepam en epilepsia infantil*. Revista Española de Pediatría. 1973; 29 : 443.

Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. *Informe Mundial sobre las Drogas 2016*. Journal of Chemical Information and Modeling. 2016; 53(9), 1689–1699.

O'Neil MJ. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc. 2006; 401.

Palacios F. *Métodos Numéricos: Resumen Y Ejemplos Tema 4: Resolución Aproximada de EDO's*. <http://epsem.upc.edu/~fpq/numerico/resum/num-edos-resum.pdf>. 2008.

Peng H, Cheung B. *A review on pharmacokinetic modeling and the effects of environmental stressors on pharmacokinetics for operational medicine: operational pharmacokinetics*, Defence R&D Canada. 2009.

Pilari S, Wilhelm H. *Lumping of physiologically-based pharmacokinetic models and a mechanistic derivation of classical compartmental models*. J Pharmacokinetic Pharmacodyn. 2010; 37:365–405.

Pinder RM, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. *Clonazepam: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy in Epilepsy*. ADIS Press. 1976; pp 321-361.

Price P, Conolly R, et al. *Modeling interindividual variation in physiological factors*

*used in PBPK models of humans. Crit Rev Toxicol. 2003; 33: 469-503.*

Poulin P, Theil FP. A priori prediction of tissue: Plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *J Pharm Sci. 2000; 89(1):16-35.*

Poulin P, Theil FP. *Prediction of Pharmacokinetics prior to In Vivo Studies. II. Generic Physiologically Based Pharmacokinetic Models of Drug Disposition. Pharm Assoc J Pharm Sci. 2002; 91(91):1358-1370.*

Rang, HP; Dale M. *Farmacología*. 6a. Edición. Elsevier Masson SAS, España. 2008.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. *Dose translation from animal to human studies revisited. The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008; 22(3), 659–661.*

Rescigno A, Beck JS, Thakur AK. *The use and abuse of models and commentary. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. 1987; 15: 327–344.*

Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S. *Benzodiazepines in epilepsy: Pharmacology and pharmacokinetics. Acta Neurologica Scandinavica. 2008; 118(2), 69–86.*

Roche & Pharmaceuticals. *Rivotril Data Sheet. 2007. Retrieved from <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/r/Rivotrilabdopinj.pdf>*

Rodgers T, Leahy D, Rowland M. *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling 1: Predicting the Tissue Distribution of Moderate-to-Strong Bases. J Pharm Sci. 2005; 94(6):1259-1276.*

Rowland M, Peck C, Tucker G. *Physiologically-based pharmacokinetics in drug*

*development and regulatory science. Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011; 51:45-73.

Sakaeda T, Fukumura K, Takahashi K, Matsumura S. *Blood Flow Rate in Normal and Tumor-bearing Rats in Conscious State , under Urethane Anesthesia , and during Systemic Hypothermia.* *Journal of Drug Targeting.* 1998; 6(4):261-272.

Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, & D. G. de, & Epidemiología. *Sistema de Vigilancia Epidemiológica para las Adicciones. Informe 2014.* 2015

Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, & D. G. de, & Epidemiología. *Sistema de Vigilancia Epidemiológica para las Adicciones. Informe 2015.* 2016

Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, & D. G. de, & Epidemiología. *Sistema de Vigilancia Epidemiológica para las Adicciones. Informe 2016.* 2016

Sepulveda P. *Conceptos farmacocineticos en tiva.* 2012.  
<http://www.medens.com/UploadedMediaFiles/M1L3.3 Farmacolog.a II.pdf>.

Sieghart W, Fuchs K, Tretter V et al. *Structure and subunit composition of GABAA receptors.* *Neurochem Int.* 1999; 34:379–85.

Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. *Analysis of the set of GABAA receptor genes in the human genome.* *J Biol Chem.* 2004;279:41422–35.

Simmons JE, Evans MV, Boyes WK. Moving from external exposure concentration

to internal dose: duration extrapolation based on physiologically based pharmacokinetic derived estimates of internal dose. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2005; 68(11-12):927-950.

Subramanian, K. *truPK -- human pharmacokinetic models for quantitative ADME prediction*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005; 1: 555-564.

Sun L, Lau CE. *Arteriovenous serum cocaine concentration difference after intravenous bolus injection and constant-rate infusions: Relation to pharmacodynamic estimates in rats*. *Eur J Pharm Sci*. 2001;14(4):261-269.

Sweeney LM, Gargas ML, Strother DE, Kedderis GL. *Physiologically based pharmacokinetic model parameter estimation and sensitivity and variability analyses for acrylonitrile disposition in humans*. *Toxicol. Sci*. 2003; 71(1):27-40.

Tehrani A, Lam Y, Lin A, Dosch S, Ho C. *Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of human red blood cells*. *Blood Cells*. 1982; 8(2):245-261.

Thakur AK. *Model: Mechanistic versus empirical*. In: *New Trends in Pharmacokinetics*. Resigno A, Thakur AK (Eds), Plenum Press, New York, USA. 1991; 41-51.

Thompson, Matthew, Beard, Daniel, Wu. *Use of partition coefficients in flow-limited physiologically based*. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*. 2012; 39(4):313-327. doi:10.1007/s10928-012-9252-6.

Tousch C. *Epuisement d'effet au cours du traitement par le clonazepam*. *Semaine des Hopitaux*. 1973; 49 (Suppl. 53).

- Trimble MR. *On the use of tranquillisers in epilepsy*. *Epilepsia*. 2002; 43:25–7.
- UNODC. *World Drug Report 2013*. United Nations publication. 2013; No. E. 13.XI.6.  
<http://doi.org/10.1002/yd.20002>
- UNODC. Informe mundial sobre las Drogas. Oficina de Las Naciones Unidas Contra La Droga Y El Delito. 2014; 10. <http://doi.org/10.2810/871615>
- U.S.Environmental Protection Agency (EPA), *Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment*. 2006; EPA/600/R–05/043f
- Veall RM y Hogarth HC. *Thrombocytopenia during treatment with clonazepam*. *British Medical Journal*. 1975; 4: 462.
- Veng-Pedersen P. *Noncompartmentally-based pharmacokinetic modeling*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001; 48: 265-300.
- Waddell W y Bates R. *Intracellular pH*. *Physiol Rev*. 1946; 49(2):1969.
- Weipmann HM y Willms E. *Kurzer Erfahrungsbericht uber die Wirksamkeit des Antikonvulsivums auf verschiedene Epilepsieformen*. *Acta Neurologica Scandinavica* 1973; 49 (Suppl. 53): 124.
- Williams LR y Leggett RW. *Reference values for resting blood flow to organs of man*. *Clin Phys Physiol Meas*. 1989;10: 187-217.
- Willmann S, Schmitt W, et al. *A physiological model for the estimation of the fraction dose absorbed in humans*. *J Med Chem*. 2004; 47: 4022-4031.