



00563
3
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

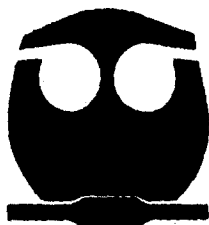
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE UNA FORMA
FARMACEUTICA DE LIBERACION MODIFICADA
DE CLOMIPRAMINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA
(BIOFARMACIA)

P R E S E N T A :
DEA HERRERA RUIZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEX. D.F. JUNIO 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS

COMPLETA

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

PRESIDENTE	M. en C. Juan Manuel Rodríguez
PRIMER VOCAL	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
SECRETARIO	M. en C. Lourdes Mayet Cruz
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Inés Fuentes Noriega
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Dinora F. González Esquivel

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 112, Departamento de Farmacia. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, U.N.A.M. y en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

Asesor:

M. en C. Helgi Jung Cook

Sustentante:

Q.F.B. Dea Herrera Ruiz

Se realizó un estudio para evaluar la biodisponibilidad que presenta un producto farmacéutico de liberación sostenida que contiene clomipramina, en relación a su producto innovador (*Anafranil*).

El estudio se realizó en dos etapas. En la *etapa I* participaron 12 voluntarios sanos, el diseño experimental empleado fue el cruzado de 2 x 2 con un periodo de lavado de 2 semanas. Se administró una dosis única de 75 mg de cada forma farmacéutica de acuerdo al periodo y se tomaron muestras sanguíneas a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de su administración. En la *etapa II* participaron 6 pacientes que presentaban un cuadro depresivo y que requerían clomipramina para su terapia. Se empleó el mismo diseño experimental administrando la dosis preestablecida por el médico. En este estudio se midieron los niveles en el estado estacionario; así, el primer periodo de análisis de muestras fue 10 días después de la administración de la forma farmacéutica y el segundo después de 15. Se tomaron muestras sanguíneas de los pacientes medicados con la *formulación A* (innovador) a las 0, 1, 2, 4, 6, 8 hrs; y para la *formulación B* (prueba) a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 hrs. El plasma se separó y se congeló hasta el momento de su análisis utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) previamente validado.

Los parámetros farmacocinéticos calculados para la clomipramina en sujetos mexicanos, no mostraron diferencias significativas con aquellos reportados para otras poblaciones. La fracción de fármaco biodisponible de la formulación de liberación sostenida fue de 0.92. El estudio en el estado estacionario confirmó que las dos formulaciones son igualmente biodisponibles y que la forma farmacéutica de liberación sostenida permite mantener concentraciones terapéuticas en el intervalo de dosificación establecido.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	3
II. GENERALIDADES	
2.1 Estudios de biodisponibilidad relativa	7
2.2 Clomipramina. Ubicación mundial	8
2.3 Propiedades fisicoquímicas	10
2.4 Farmacodinamia	10
2.4.1 Acción farmacológica y mecanismo de acción	
2.5 Farmacocinética	13
2.5.1 Absorción	
2.5.2 Distribución y unión a proteínas	
2.5.3 Metabolismo y eliminación	
2.5.4 Polimorfismo genético de la hidroxilación	
2.5.5 Farmacocinética en condiciones normales después de una dosis única	
2.5.6 Farmacocinética bajo condiciones de estado estacionario	
2.5.7 Interacciones farmacocinéticas fármaco - fármaco	
2.6 Concentración plasmática terapéutica	20
2.7 Efectos secundarios relacionados a la concentración plasmática	20
2.8 Usos terapéuticos	23
2.9 Dosificación y vías de administración	23
2.10 Formas farmacéuticas de liberación controlada	24
2.11 Métodos analíticos para la determinación de clomipramina y desmetilclomipramina en fluidos biológicos	26
III. OBJETIVOS	33

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos y materiales empleados en el estudio	37
4.1.1 Reactivos	
4.1.2 Estándares	
4.1.3 Productos comerciales empleados en el estudio. Adquisición	
4.1.4 Equipo	
4.1.5 Lavado de material	
4.2 Control de calidad de los productos	38
4.2.1 Identificación	
4.2.2 Tiempo de desintegración	
4.2.3 Uniformidad de contenido	
4.2.4 Valoración del principio activo	
4.3 Método analítico para la cuantificación de clomipramina y desmetilclomipramina en plasma (CLAR)	40
4.3.1 Preparación de las disoluciones	
4.3.2 Procedimiento para el análisis de las muestras plasmáticas	
4.3.3 Validación del método analítico	
4.4 Estudio de biodisponibilidad relativa	
ETAPA I. Estudio en dosis única, voluntarios sanos	46
4.4.1 Diseño experimental del estudio	
4.4.2 Número de voluntarios	
4.4.3 Secuencia y dosis administrada de los medicamentos	
4.4.4 Horario de toma de muestras y su conservación	
4.4.5 Criterios de inclusión	
4.4.6 Restricciones para los voluntarios admitidos en el estudio	
ETAPA II. Estudio en el estado estacionario en pacientes con depresión.	48
4.4.7 Diseño experimental del estudio	
4.4.8 Secuencia y dosis administrada de los medicamentos	
4.4.9 Horario de toma de muestras y su conservación	
4.4.10 Criterios de inclusión	
4.4.11 Criterios de exclusión	
4.4.12 Control de los pacientes incluidos en el estudio	
4.4.13 Análisis clínicos	
4.4.14 Reacciones adversas	
4.4.15 Análisis de los datos del estudio de biodisponibilidad relativa	

V. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
5.1 Control de calidad de los productos	55
5.1.1 Identificación	
5.1.2 Tiempo de desintegración	
5.1.3 Uniformidad de contenido	
5.1.4 Valoración del principio activo	
5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de clomipramina y desmetilelomipramina en plasma	57
5.2.1 Especificidad	
5.2.2 Límite de detección y límite de cuantificación	
5.2.3 Linealidad	
5.2.4 Exactitud y precisión	
5.2.5 Estabilidad	
5.2.6 Sumario de la validación del método analítico	
5.3 Estudio de biodisponibilidad relativa	67
5.4 ETAPA I. Estudio de biodisponibilidad en voluntarios sanos, dosis única	68
5.4.1 Análisis farmacocinético y biodisponibilidad	
5.4.2 Consideraciones previas al análisis de varianza	
5.4.3 Diseño estadístico	
5.4.4 Análisis estadístico para demostrar la biodisponibilidad relativa de la formulación de liberación sostenida	
5.4.5 Reacciones adversas	
5.5 ETAPA II. Estudio en pacientes con cuadro de depresión, dosis múltiple	87
VI. CONCLUSIONES	99
VII. APÉNDICE	
Carta de consentimiento	103
VIII. BIBLIOGRAFÍA	107
AGRADECIMIENTOS	

I. Introducción



La cantidad y velocidad con que la fracción activa (fármaco o metabolito) alcanza la circulación general, y con lo cual tiene acceso al sitio de acción, se denomina biodisponibilidad.

A principios de los años 60's los problemas relacionados con la disponibilidad biológica de los fármacos empezaron a recibir una mayor atención por parte de la industria y agencias regulatorias. Las pruebas de disponibilidad biológica demostraron una marcada diferencia en el desempeño de dos productos farmacéuticos conteniendo el mismo principio activo, los cuales eran farmacéuticamente idénticos de acuerdo a las pruebas que evaluaban las propiedades físicas.

Un estudio de bioequivalencia en general, se refiere a un estudio en donde se determine si dos formulaciones distintas de una misma forma farmacéutica oral que contiene la misma dosificación del principio activo, logran presentar la misma biodisponibilidad. Este estudio se debe referir al primer producto que salió al mercado, denominado innovador, el cual ha probado ser altamente biodisponible. La bioequivalencia es un requisito regulatorio muy importante para el registro de productos farmacéuticos en países como los Estados Unidos, Canadá, la Comunidad Europea y Japón. Esta se considera de suma importancia desde el punto de vista de calidad de un producto y también en el aspecto ético y legal. Los organismos regulatorios internacionales realizan constantemente esfuerzos para que los productos farmacéuticos de cualquier país del mundo, cumplan con ciertas características de calidad, eficacia terapéutica y seguridad.

En México, no existe un marco normativo adecuado que obligue a las empresas productoras de medicamentos, a cumplir con una evaluación completa de sus productos antes de ofrecerlos al mercado. Dado a que no se requiere este tipo de estudios para su registro en el país, no es posible asegurar la equivalencia terapéutica de los mismos. Tal es el caso de la forma farmacéutica de liberación sostenida que contiene clomipramina y que se distribuye libremente en el mercado nacional, de la cual no se ha comprobado su eficacia y seguridad terapéutica.



La clomipramina es un fármaco antidepresivo de amplio uso en nuestro país y del cual existe poca información acerca de su metabolismo y farmacocinética en humanos. Como otros antidepresivos tricíclicos, las concentraciones de clomipramina y desmetilclomipramina (metabolito activo) al estado estacionario muestran variaciones interindividuales durante el tratamiento con dosis fijas de clomipramina.³⁰ Esto hace de fundamental importancia la caracterización de su comportamiento farmacocinético en la población mexicana y requiere así mismo de asegurar la biodisponibilidad de las diferentes formulaciones que se encuentran en el mercado.

Dado que la incidencia de los efectos adversos que ocasiona la clomipramina es una función de su concentración plasmática, se han desarrollado formas farmacéuticas de liberación sostenida para controlar estos niveles. El empleo rutinario de esta forma farmacéutica teóricamente podría disminuir la incidencia y magnitud de los efectos adversos.

Las formas farmacéuticas de liberación sostenida presentan otras ventajas terapéuticas adicionales: mantienen la acción del fármaco durante un periodo más prolongado de tiempo, mejoran la eficacia terapéutica, aseguran el cumplimiento del régimen terapéutico por el paciente o simplemente le otorgan mayor comodidad y/o economía.¹ Considerando que existen diferentes matrices para la fabricación de estas formas farmacéuticas, las cuales regulan de manera distinta la liberación del fármaco, es muy importante realizar estudios *in vivo* que garanticen la biodisponibilidad y seguridad de este producto en relación a la forma farmacéutica de liberación rápida.

En la actualidad no existe ninguna información reportada, nacional o internacional, relacionada con la biodisponibilidad o niveles terapéuticos que presenta la clomipramina en la forma farmacéutica de liberación sostenida, solamente existen dos reportes relacionados con la biodisponibilidad de la forma farmacéutica oral de liberación rápida y otra de un inyectable.²⁻³



II. Generalidades



2.1. Estudios de biodisponibilidad relativa

En los últimos veinte años los estudios de bioequivalencia han sido objeto de gran interés en la industria farmacéutica, desarrollándose paralelamente con el avance científico y tecnológico y apoyándose en disciplinas tales como la farmacocinética, estadística, farmacología, computación y otras. De esta forma se ha logrado una reglamentación internacional más eficiente y acorde a las necesidades del mercado actual. En diferentes países se ha tratado de encontrar una armonización de términos y lineamientos^{4,5} considerando siempre que el desarrollo, fabricación, prescripción y administración de un medicamento debe tener como objetivo común la obtención de una eficacia terapéutica. En los Estados Unidos de Norteamérica, con el fin de garantizar esta eficacia y con la aparición en el mercado de diferentes marcas de formas farmacéuticas iguales conteniendo el mismo principio activo, se ha requerido el comparar a los productos genéricos con respecto al producto innovador a través de estudios de este tipo.

Sin embargo, ya que no es posible ni deseable efectuar estudios de biodisponibilidad a todos los fármacos, es necesario seleccionar aquéllos para los cuales esta es crítica, tomando en consideración su importancia clínica, índice terapéutico, así como sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas. Es importante hacer notar que aunque la prueba de disolución ha adquirido una gran importancia en la última década como herramienta para predecir problemas de biodisponibilidad, todavía no se considera como sustituta, de este tipo de estudios.

A partir del 1 de julio de 1977, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA), reglamentó los estudios de biodisponibilidad/ bioequivalencia,⁶ estableciendo también, las siguientes definiciones: La *biodisponibilidad* se define como la velocidad y la cantidad de una sustancia activa que se absorbe de un producto farmacéutico y se convierte en disponible para el sitio o sitios de acción. La definición también implica que la *biodisponibilidad* de un producto farmacéutico es una medida comparativa con respecto a una referencia: intravascular (absoluta) o extravascular



(relativa). Es decir, un estudio de *biodisponibilidad relativa* se refiere a la comparación de biodisponibilidades de diferentes formulaciones del mismo fármaco o de diferentes productos del fármaco. Cuando se dice que dos formulaciones del mismo fármaco o dos productos con el mismo principio activo son *bioequivalentes* es porque ellos tienen el mismo efecto terapéutico o son terapéuticamente equivalentes. Dos productos farmacéuticos son *equivalentes farmacéuticos*, cuando contienen cantidades idénticas del mismo principio activo y son *alternativas farmacéuticas* aquellos productos que contienen el mismo principio activo o su precursor, pero no necesariamente en la misma cantidad o forma de dosificación o como la misma sal o éster.

Por lo tanto un estudio de *bioequivalencia* se basa en la consideración de que el efecto terapéutico de un medicamento está en función de la concentración del principio activo en la circulación sistémica y por lo tanto está relacionada a su biodisponibilidad.⁷ Así, si dos formas farmacéuticas iguales contienen cantidades equivalentes del mismo fármaco y producen concentraciones similares del fármaco en la sangre, ellas son bioequivalentes y por lo tanto, son equivalentes terapéuticamente.

En general en la práctica se cuantifica la concentración del fármaco y/o metabolitos en el plasma con respecto al tiempo, con esto se pueden determinar los principales parámetros farmacocinéticos con los que se evalúa la biodisponibilidad en un estudio de bioequivalencia: *ABC* (área bajo la curva), $C_{p_{max}}$ (concentración plasmática máxima) y t_{max} (tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima).

Clonipramina

2.2. Ubicación mundial

La clonipramina ha estado en el mercado por muchos años y en muchos países para el tratamiento de la depresión, este fármaco es uno de los antidepresivos tricíclicos más ampliamente usados en Europa Occidental.

Los síndromes obsesivo compulsivos (SOC) son una condición clínica crónica que tradicionalmente ha sido vista como resistente a todo tratamiento.¹⁴ En los últimos 10



años, sin embargo, se ha investigado la eficacia de varios antidepresivos en la terapia de pacientes con estos síndromes, fomentado por la estrecha asociación entre los síntomas depresivos y los obsesivo-compulsivos en los SOC. Hasta la fecha, todos los agentes efectivos contra los SOC son también clasificados como antidepresivos, pero no todos los antidepresivos son agentes antiobsesivo-compulsivos. Por ejemplo, la clomipramina, un antidepresivo, es efectiva en el tratamiento de los SOC; sin embargo, la desipramina, un antidepresivo también, es totalmente ineficiente.¹⁰

A pesar de la importancia que conlleva el tratamiento de los síndromes obsesivo compulsivos, no fue sino hasta 1990 que en los Estados Unidos (Tabla 2.1) se aprobó a la clomipramina para el tratamiento de esta enfermedad,⁸ siendo hasta la fecha el fármaco más eficiente.¹⁰

Tabla 2.1 Ubicación de los fármacos empleados en el tratamiento de padecimientos depresivos y obsesivo-compulsivos.⁹

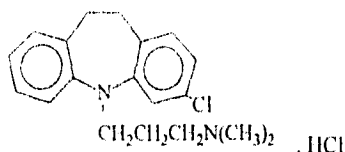
		Situación actual en EUA	
Nombre genérico	Nombre comercial	SOC	Depresión
Clomipramina	<i>Anafranil</i>	Aprobado	Aprobado
Fluvoxamina	<i>Luvox</i> <i>Faverin</i> <i>Floxyfral</i>	Bajo revisión de la FDA	En estudio fase III
Fluoxetina	<i>Prozac</i>	En estudio fase III	Aprobado
Sertralina	<i>Zoloft</i>	En estudio fase III	Aprobado
Paroxetina	<i>Serovat</i> <i>Paxil</i> <i>Aropax</i>	En estudio fase III	Bajo revisión de la FDA
Zimelidina	<i>Zelmid</i>	Retirado del mercado mundial en 1983	
Citalopram	<i>Seropram</i>	En espera de ser probado	

Su reciente aprobación en los Estados Unidos como tratamiento en la terapia de los SOC, es quizá la razón por la que su farmacocinética ha sido documentada en menor medida que la de otros antidepresivos tricíclicos como la imipramina o la desipramina.¹⁰



2.3 Propiedades fisicoquímicas

Todos los antidepresivos tricíclicos tienen una estructura química básica similar. Desde el punto de vista farmacocinético, la principal diferencia se encuentra en la cadena lateral: algunos compuestos poseen una cadena N-dimetilada (i.e. imipramina) mientras otros tienen una cadena N-monometilada (i.e. desipramina). Esta diferencia es, sin embargo, meramente arbitraria debido a que los fármacos dimetilados son metabolizados a sus derivados monometilados.



La clomipramina tiene un peso molecular de 351.3. Su nombre químico es clorhidrato de 3-cloro-5-[3-(dimetilamino)propil]-10,11-dihidro-5H-dibenz[b,f]azepina.

El clorhidrato de clomipramina es un polvo blanco cristalino. Muy soluble en agua, metanol y en cloruro de metileno; insoluble en éter etílico y en hexano.¹¹ Tiene una constante de acidez (pKa) de 9.5.¹²

Su fórmula condensada es: $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_2$ y está registrada en el Chemical Abstracts (CAS) con la clave 303-49-1 (clomipramine) y como clorhidrato como 17321-77-6 (hydrochloride).

2.4 Farmacodinamia

La clomipramina es un antidepresivo que ha estado a la venta por más de una década en Europa y Canadá y fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) el 29 de diciembre de 1990 para su uso en el tratamiento de síndromes obsesivo-compulsivos (SOC).¹³ Este nuevo agente para el tratamiento de los SOC ha producido mucho interés debido a que el tratamiento médico hasta la fecha -confirmado por neurolépticos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la monoamino oxidasa y benzodiazepinas- ha sido ineficaz.¹⁴

2.4.1 Acción farmacológica y mecanismo de acción

El mecanismo preciso de acción de la clomipramina, como el de todos los antidepresivos, no es claro. El efecto antidepresivo posiblemente se relaciona a la habilidad que tiene el fármaco de incrementar la disponibilidad sináptica de las monoaminas neurotransmisoras en el cerebro mediante un bloqueo en su recaptura en las membranas presinápticas.¹⁵ Estudios recientes sugieren que la administración prolongada de estos compuestos pueden alterar la sensibilidad de los neuroreceptores adrenérgicos y serotoninérgicos, un factor que puede contribuir a la actividad de los antidepresivos.¹⁶ Los efectos farmacológicos primarios de la clomipramina, están en relación a la recaptura del neurotransmisor serotonina, y su principal metabolito, la desmetilclomipramina, es un potente inhibidor de la captura de la norepinefrina.¹⁷

El mecanismo por el cual la clomipramina actúa en los síndromes obsesivo-compulsivos es aún menos claro. Debido a su elevada potencia en el bloqueo de la recaptura sináptosomal de la serotonina, acoplado con su inigualable actividad en el tratamiento de los SOC, se ha desarrollado una hipótesis para explicar la patogénesis de esta condición. La hipótesis postula que la carencia de regulación de la serotonina es la responsable de la enfermedad y que la clomipramina ejerce su actividad corrigiendo este desbalance.¹⁸

Es posible establecer una clasificación de los agentes antidepresivos acorde a su potencial de inhibición en la recaptura de neurotransmisores. La clomipramina es un fármaco antiobsesivo, agrupado en la clase (dibenzazepina) de fármacos conocidos como antidepresivos tricíclicos.¹⁹ La **Tabla 2.2** muestra una clasificación de los antidepresivos basada en la potencia de inhibición de la recaptura de noradrenalina (norepinefrina) y serotonina.

Acorde con esta clasificación, la clomipramina es considerada el más potente serotoninérgico entre los fármacos listados; sin embargo, las concentraciones en el estado estacionario de la desmetilclomipramina son usualmente 2.5 veces mas grandes que



aquellas del compuesto padre, de aquí que no sea evidente que esta clasificación tenga alguna relevancia clínica importante.⁸

Un parámetro útil para la elección de un antidepresivo, es su potencial sedativo. El orden ascendente de este potencial para los antidepresivos tricíclicos más comunes es: desipramina < nortriptilina < imipramina < clomipramina < amitriptilina.

Es difícil ordenar a los diferentes antidepresivos tricíclicos en términos de su eficacia clínica debido a que en todos los estudios cruzados bien diseñados, con períodos clínicos comparables, estos muestran la misma eficacia. La clomipramina no es la excepción, tiene un perfil de eficacia (y de efectos adversos) parecidos a otros antidepresivos tricíclicos. Su uso amplio en algunos países y no en otros, se debe únicamente a razones locales, y frecuentemente históricas, que determinan la elección de un compuesto sobre otro. Es importante hacer notar que en muchos estudios clínicos donde evalúan la potencialidad de nuevos antidepresivos, se ha usado a la clomipramina como compuesto de referencia, al menos esto se observa en Europa.

Tabla 2.2 Potencia de los antidepresivos tricíclicos en la inhibición de la recaptura de noradrenalina (norepinefrina, NA) y serotonina (5-HT)

Compuesto	Metabolito	NA	5-HT
Lofeprantina ^a	Desipramina	++	+
Desipramina		+++	+
Imipramina	Desipramina	+++	++
Amitriptilina	Nortriptilina	++	++
Nortriptilina		+	+
Clomipramina	Desmetil-clomipramina ^b	++	+++

^a Considerado un pro-fármaco inactivo de la desipramina, sin embargo puede llegar a presentar un papel importante en el desarrollo de los efectos adversos del fármaco.

^b No es producido comercialmente. La desmetilelomipramina ha mostrado ser más fuerte como inhibidor de la recaptura de la NA y más débil como inhibidor de la recaptura de la 5-HT, que el compuesto padre.

+ = potencia baja, ++ = potencia media, +++ = potencia alta



La desmetilclomipramina es farmacológicamente activa, aunque se desconocen sus efectos en la terapia de conductas antiobsesivas.^{8, 20-21}

2.5 Farmacocinética

Para comparar la farmacocinética de un fármaco en diferentes subpoblaciones (i.e. sanos y enfermos), es necesario comparar los parámetros farmacocinéticos básicos con aquellos obtenidos bajo condiciones estandarizadas (i.e. en estudios formales con voluntarios sanos).

Los datos farmacocinéticos de la clomipramina son derivados de estudios en dosis múltiple y en dosis única, tanto en voluntarios como en pacientes con SOC y con depresión. Estos datos indican que el perfil farmacocinético de la clomipramina es similar a aquel que presentan otros antidepresivos tricíclicos.

2.5.1 Absorción

La clomipramina se absorbe muy bien en el tracto gastrointestinal, pero como muchos fármacos lipofílicos, su cociente de extracción hepático es importante. Acorde con esto, el metabolismo del primer paso en el hígado a desmetilclomipramina alcanza hasta un 50%. Esto representa una fuente importante de variabilidad interindividual en las concentraciones plasmáticas del fármaco y su metabolito.^{2, 8, 22}

2.5.2 Distribución y unión a proteínas

La unión a proteínas de la clomipramina y la desmetilclomipramina es elevada. La fracción libre a concentraciones terapéuticas es 2.2% (en un intervalo de 1.4 a 3.5%) y 3.6% (en un intervalo de 2.3 a 6.3) respectivamente, esto como una determinación en el estado estacionario en un grupo de pacientes.²³⁻²⁶ De los datos reportados se puede deducir que ambos compuestos tienen el mismo sitio de enlace en las proteínas plasmáticas y que la glucoproteína α_1 -ácida juega un papel importante en el enlace de estas dos sustancias. El volumen de distribución elevado (Vd) de la clomipramina (i.e. más de 1000L, en un intervalo de 7-20 L/kg; **Tabla 2.3**) concuerda con sus propiedades fisicoquímicas.²⁷



Las similitudes en la unión de la desmetilclomipramina y de la clomipramina, así como la lipofilia de los dos compuestos, permite predecir que la desmetilclomipramina tendrá un Vd del mismo orden de magnitud. Este factor es importante en situaciones de sobredosis. La lipofilia de la clomipramina también es responsable de su presencia en la leche materna a concentraciones similares a las observadas en el plasma.²⁸ La clomipramina también se distribuye hacia el fluido cefalorraquídeo y el cerebro.^{8, 29}

Tabla 2.3 Promedio (\pm d.e.) de los parámetros farmacocinéticos de la clomipramina en voluntarios sanos y pacientes^a.

# de Sujetos	Dosis/ Ruta	Análisis	t _{1/2} (h) CMI	t _{1/2} (h) DDMI	Cl. (l/h kg) CMI	Vd (L/kg) CMI	F CMI	Ref.
10	150 mg/ FO	CG	22-84 ^c	No calculada				30
9	50 mg/ FO	CG-MS	20.4 \pm 6.1	36.5 \pm 13.2			0.48	2
	50 mg/ 2h inf		17.7 \pm 2.6		0.65 \pm 0.15	16.6 \pm 4.9	(0.36-0.68)	
15	1 mg/kg 3h inf	CG-N	26 \pm 8.9	No detectado ^b				31
40	50 mg/ FO ₁	HPLC	23.5 \pm 1.9	No calculada	1.04 \pm 0.11		1.01	3
	50 mg/ FO ₂		24.1 \pm 2.2		1.27 \pm 0.12		0.962	

^a Pacientes con depresión con edades de 21-78 años, lo cual puede explicar la variabilidad en los valores de t_{1/2}
^b Límite de detección muy bajo FO = Formulación oral

2.5.3 Metabolismo y eliminación

La principal ruta de biotransformación de la clomipramina es la desmetilación del nitrógeno del grupo N-dimetilamino (Fig. 2.1). Otros metabolitos están presentes en el plasma y/o la orina y comprenden los derivados hidroxilados y los conjugados glucurónicos. El recobro urinario y fecal después de una administración oral de (¹⁴C) clomipramina es más del 90%,¹² esencialmente como metabolitos. La mayor proporción consiste en una mezcla de metabolitos hidrofílicos y polares, y no del fármaco en su forma inalterada o de la desmetilclomipramina.¹² Estos compuestos polares son esencialmente derivados hidroxilados de la clomipramina y de la desmetilclomipramina y de sus conjugados glucuro y sulfatados.



Entre los metabolitos descritos en plasma, además de la desmetilclomipramina, se han estudiado la 8-hidroxi-clomipramina y la 8-hidroxi-desmetil-clomipramina. Su concentración en el estado estacionario es de alrededor de 40 a 50% en relación con los otros metabolitos no hidroxilados.¹²⁻³³

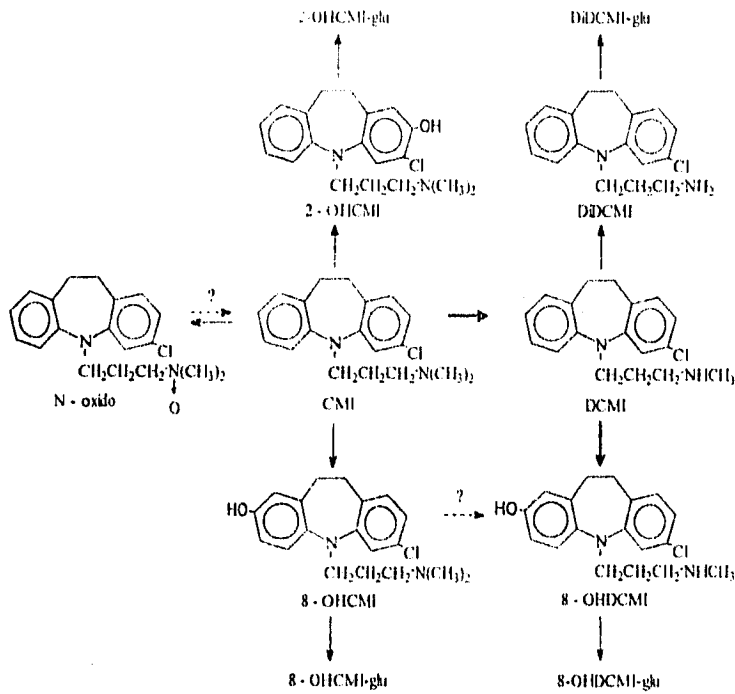


Fig. 1.1. Bioactivación de la clomipramina después de una dosificación oral de clorhidrato de clomipramina. CMI, clomipramina; DCMI, desmetilclomipramina; DiDCMI, di-desmetilclomipramina; N-oxido, N-oxido-clomipramina; 8-OH-CMI, 8-hidroxiclomipramina; 2-OH-CMI, 2-hidroxiclomipramina; 8-OH-DCMI, 8-hidroxi-desmetilclomipramina; glu, glucuronido.

Los cuatro compuestos muestran efectividad *in vitro* en la inhibición de la recaptura de serotonina en plaquetas. El papel de los metabolitos hidroxilados, sin embargo, no ha sido definido debido a que se desconoce su distribución hacia el tejido cerebral, por lo



tanto, el monitoreo de las concentraciones plasmáticas se limita usualmente a la clomipramina y a la desmetilclomipramina.

El tiempo de vida media promedio de este fármaco es de 20 a 26 h en voluntarios sanos y de 34 a 36 h en pacientes con depresión. La desmetilclomipramina tiene un tiempo de vida media de 50 h en pacientes con depresión.^{8,29}

2.5.4 Polimorfismo genético de la hidroxilación

La hidroxilación de la clomipramina y sus metabolitos esta bajo un control genético similar al que se observa en la debrisoquina y la esparteina.^{32, 34-36} Esto puede producir, en metabolizadores pobres de debrisoquina, altas concentraciones de desmetilclomipramina mientras que la concentración de clomipramina se ve menos influenciada.^{21, 37} En algunos pacientes, las concentraciones llegan a alcanzar niveles subterapéuticos a pesar de que la dosis administrada se considera normal en otros pacientes (i.e. 100 a 150 mg/día). De hecho, los antidepresivos tricíclicos están entre los fármacos para los cuales el polimorfismo genético ha mostrado ser de importancia relevante en situaciones clínicas.³⁸

2.5.5 Farmacocinética en condiciones normales después de la administración de una dosis única

Los perfiles farmacocinéticos de la clomipramina y la desmetilclomipramina han sido estudiados después de su administración oral e intravenosa, tanto en voluntarios sanos como en pacientes con depresión (**Tabla 2.3**).

Sin embargo, el único estudio completo publicado,² permite realizar algunos comentarios adicionales (**Tabla 2.4**). Después de la administración intravenosa, la concentración plasmática máxima de la desmetilclomipramina es únicamente del 4% en relación a aquella observada para la clomipramina, esto representa un 18% de la dosis oral administrada debido al efecto metabólico del primer paso. La misma observación es válida en relación al área bajo la curva después de la administración oral e intravenosa: si la biodisponibilidad absoluta del fármaco fuera calculada en base a la concentración de la

desmetilclomipramina, podríamos obtener un valor de 1.3 en lugar del valor de 0.5 cuando se considera la concentración de la clomipramina. Este es un buen ejemplo de las dificultades que se pueden encontrar en la interpretación de los datos de metabolitos durante los estudios de biodisponibilidad. En el caso de la clomipramina, ambos compuestos contribuyen a la actividad terapéutica y, ciertamente, ninguna indica de manera inequívoca la cantidad de principio activo que alcanza la circulación general y finalmente, el sitio de acción.

Tabla 2.4 Comparación del comportamiento farmacocinético de la clomipramina y desmetil-clomipramina después de una administración oral o una infusión de 2 h de clomipramina 50 mg²

Ruta	C _{pmax} µg/L CMI	C _{pmax} µg/L DCMI	t _{max} h CMI	t _{max} h DCMI	ABC _{PO} /ABC _{IV} CMI	ABC _{PO} /ABC _{IV} DCMI
Oral	27.6 ± 9.3	5.0 ± 1.4	5 (3-5)	8 (5-12)	0.48	1.3
IV	77.8 ± 22.7	3.1 ± 1.1	2	2	(0.36-0.62)	(1.05-2.13)

Los resultados obtenidos en el estudio más reciente³ sobre la biodisponibilidad de la clomipramina se muestran en la **Tabla 2.5**. A diferencia del estudio anterior en éste no se cuantifica la desmetilclomipramina, pero se estudia la biodisponibilidad relativa de cuatro productos de clomipramina conteniendo diferente cantidad de principio activo y administrados en dosis única. En éste estudio se reportan los datos farmacocinéticos de la clomipramina en dos estudios controlados con 20 voluntarios sanos cada uno.

Tabla 2.5 Comparación del comportamiento farmacocinético de la clomipramina después de una administración oral única (dosis 2 x 25 mg, estudio I y 5 x 10 mg, estudio II).³

Estudio	C _{pmax} µg/L (Anafranil, ref.)	C _{pmax} µg/L (CMI, prueba)	t _{max} h (Anafranil, ref.)	t _{max} h (CMI, prueba)	ABC _P /ABC _R
I	31.3 ± 1.5	31.6 ± 1.4	4	4.0	1.02
II	25.8 ± 1.5	23.9 ± 1.5	4	4.5	0.96

Los datos obtenidos concuerdan entre sí y con aquellos reportados por Evans y colaboradores.² En cuanto a la biodisponibilidad relativa de los productos de prueba y de referencia respectivamente, los intervalos de confianza al 90% para las relaciones



promedio de las variables farmacocinéticas transformadas de $C_{p_{max}}$ y ABC, se encuentran dentro del intervalo de bioequivalencia convencional de 80-125%.

2.5.6. Farmacocinética bajo condiciones de estado estacionario

El resultado común de todos los estudios realizados en el estado estacionario es la gran variabilidad interindividual, tanto en las concentraciones plasmáticas determinadas para la clomipramina, como para aquellas de la desmetilclomipramina. La Tabla 2.6 resume algunos de los estudios que se han realizado en el estado estacionario.

Tabla 2.6 Concentraciones en el estado estacionario (C^{ss}) de clomipramina y desmetilclomipramina después de una administración oral.

# de sujetos	Dosis (mg/día)	Edad (años)	C^{ss} ($\mu\text{g/L}$)		Comentarios	Ref.
			CMI	DCMI		
7	3 x 25	29-54	20-70	38-185	No hay relación directa entre la CMI y la dosis, sin embargo, DCMI sí correlaciona	39
5	1 x 75	36-60	17-50	30-104		
8	3 x 10	23-67	10-51	42 ± 9		
8	1 x 30	45 ± 7	26 ± 6	22 ± 5		
27	3 x 50	19-68	24-185	36-289	Incrementa la concentración con la edad; relación DCMI/ CMI variable entre 1.1 y 5.2	40
28	1 x 25	18-75	10-35	15-40	Efecto de fumar y edad	41
10	200	23-50	75-296	41-540	CMI fue también administrada hasta el estado estacionario por vía IM; en algunos pacientes las concentraciones de DCMI fueron muy bajas, en otros no detectable	22
14	150	21-64	88-351	71-283	Muestras de sangre tomadas alrededor de 12 h después de la última dosis son probablemente más adecuadas para monitoreo de concentraciones. Concentraciones de DCMI aumentando todavía en el día 15	42

Es importante hacer notar que no es posible establecer comparaciones estrictas entre los diferentes estudios, ya que cada uno de estos se basó en un protocolo experimental diferente. La interpretación de los datos en el estado estacionario es complicada adicionalmente por el hecho de que ha sido observada una variabilidad intraindividual en algunos pacientes, incluyendo fluctuaciones diurnas que no pueden ser explicadas por el esquema de dosificación individual.⁴³ Las mismas observaciones han sido hechas después de la administración única de una dosis oral o intravenosa de clomipramina a voluntarios sanos y pacientes con depresión.⁴⁴ No se ha encontrado ninguna explicación satisfactoria para estos resultados inusuales.

Factores ambientales y de edad

El fumar induce la desmetilación⁴⁵ y largos periodos de ingestión de alcohol aparentemente reducen la capacidad de su ruta metabólica.⁴⁶ Finalmente, la edad usualmente disminuye tanto la desmetilación como la hidroxilación de la clomipramina, permitiendo una disminución en la dosificación diaria de los pacientes más ancianos.⁴⁷

2.5.7. Interacciones farmacocinéticas fármaco-fármaco

Las interacciones farmacocinéticas entre la imipramina o desipramina y los fármacos neurolépticos (i.e. fenotiazida o butirofenonas) han sido reportadas desde hace más de 15 años.⁴⁸⁻⁴⁹ Recientemente, los mismos hallazgos han sido confirmados para la clomipramina.³² Estudios *in vivo* con desipramina y nortriptilina han mostrado resultados similares, indicando que el principal efecto de los neurolépticos en el metabolismo de los antidepresivos tricíclicos se encuentra en la inhibición de su hidroxilación, conduciendo a un importante incremento en sus concentraciones plasmáticas en el estado estacionario. El mismo mecanismo está probablemente involucrado en los compuestos dimetilados. Para la clomipramina la interacción provoca un mareado y clínicamente significativo, incremento de las concentraciones de desmetilclomipramina, sin embargo, ésta es mucho menos influenciada debido a su ruta de desmetilación hacia el metabolito.³⁷ Otras interacciones, no tan comunes, han sido descritas con el alopurinol.³¹



2.6 Concentración plasmática terapéutica

Los estudios relacionados con la concentración plasmática de clomipramina y desmetilclomipramina son muy controvertidos. Sin embargo, el análisis de la información disponible indica que una concentración sanguínea menor a 150 ng/mL se asocia usualmente con ineficiencia terapéutica, mientras que aquella arriba de 450 ng/mL es frecuentemente asociada a una elevada frecuencia de efectos adversos y además, no respuesta.³⁷ La concentración plasmática terapéutica (clomipramina + desmetilclomipramina) asociada a padecimientos depresivos es de 150 a 350 ng/mL, mientras que para síndromes obsesivos compulsivos es de 100 a 250 ng/mL.⁵⁰

2.7 Efectos secundarios relacionados a la concentración plasmática^{49,51}

La **Tabla 2.7** enumera los efectos adversos que presentan una incidencia del 1% o mayor en pacientes con SOC, los cuales reciben *Anafranil* o placebo en dosis múltiples durante el estudio clínico. Las frecuencias fueron obtenidas de un grupo de datos involucrando tanto a adultos que recibieron *Anafranil* (N=322), como a aquellos que recibieron placebo (N=319).⁵²

Se debe ser cuidadoso en la predicción de efectos indeseables en base a los datos que se muestran en la tabla. Esta no puede ser empleada para la predicción de efectos indeseables durante el curso de una práctica médica usual, en la cual las características del paciente y otros factores difieren de aquellos que prevalecían en el estudio clínico efectuado. De igual modo, las frecuencias citadas no pueden ser comparadas con aquellas obtenidas por otros investigadores clínicos que involucran diferentes tratamientos, usos y pacientes. Los datos mostrados, sin embargo, proveen una base para estimar la contribución relativa de factores fármaco y no-fármaco en la incidencia de los efectos adversos en la población estudiada.

Contraindicaciones: Hipersensibilidad conocida a los antidepresivos tricíclicos del grupo de las dibenzodiazepinas. Esta contraindicado el tratamiento paralelo con

Anafranil y un inhibidor de la MAO. El *Anafranil* no debe administrarse en el estado agudo del infarto al miocardio.

Precauciones o restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia: No se recomienda la ingestión de *Anafranil* durante el embarazo, ni durante el periodo de lactancia.

Precauciones: Los antidepresivos tricíclicos deberán administrarse con cautela a los enfermos con trastornos cardiovasculares, particularmente en los que tengan antecedentes de trastornos de la conducción y las personas de edad. Se tendrá cuidado en los enfermos con hipertiroidismo o en caso de tratamiento simultáneo con preparados tiroideos, puesto que puede producirse una agravación de los efectos cardiacos no deseados. El tratamiento prolongado con antidepresivos tricíclicos puede dar lugar a una mayor incidencia de caries dental.

El tratamiento con este fármaco causa en ocasiones somnolencia y raras veces otros síntomas nerviosos centrales que pueden disminuir las reacciones del paciente. Por esta razón se advertirá a los enfermos que no realicen actividades que requieran reacciones rápidas, como conducir vehículos o manejar máquinas.

Según los datos experimentales disponibles, este fármaco no tiene efectos mutagénicos, carcinogénicos o teratógenos. Tampoco se ha comprobado que influya sobre la fertilidad o cause efectos embriotóxicos/ fetotóxicos.



Tabla 2.7 Incidencia (%) de Efectos Indeseables Durante el Tratamiento con Clomipramina en Estudios Clínicos⁵²

	Anafranil (N=322)	Placebo (N=319)
<i>Sistema Nervioso</i>		
Somnolencia	5.4	16
Temblores	5.4	2
Vértigo	5.4	1.4
Dolor de cabeza	5.2	4.1
Insomnio	2.5	1.5
Cambio de la libido	2.1	3
Nerviosismo	1.8	2
Incremento del apetito	1.1	2
Parestesia	9	3
Perdida de memoria	9	1
Ansiedad	9	4
Perdida de concentración	5	2
Depresión	5	1
Hipertonía	4	1
Desórdenes del sueño	4	-
Desórdenes psicósomáticos	3	-
Bostezos	3	-
Confusión	3	-
Dolor abdominal	3	-
Agitación	3	-
Migraña	3	-
Depersonalización	2	-
Irritabilidad	2	2
Pánico	1	-
<i>Piel</i>		
Incremento en la sudoración	2.9	3
Salpullido	8	1
Pruritis	6	-
Dermatitis	2	-
Acné	2	2
Piel seca	2	-
Urticaria	1	-
<i>Sistema Digestivo</i>		
Boca seca	8.4	1.7
Constipación	4.7	1.1
Nausea	3.3	1.4
Dispepsia	2.2	1.0
Diarrea	1.3	9
Anorexia	1.2	-
Dolor abdominal	1.1	9
Vómito	7	2
Flatulencia	6	3
Desórdenes dentales	5	-
Desórdenes gastrointestinales	2	-

Tabla 2.7 Incidencia (%) de Efectos Indeseables Durante el Tratamiento con Clomipramina en Estudios Clínicos

	Anafranil (N=322)	Placebo (N=319)
<i>Cuerpo como un todo</i>		
Fatiga	3.9	1.8
Incremento de peso	1.8	1
Rubor	8	-
Rubor caliente	5	-
Dolor de pecho	4	4
Fiebre	4	-
Alergia	3	3
Dolor	3	2
Edema local	2	4
<i>Sistema Cardiovascular</i>		
Hipotensión postural	6	-
Palpitaciones	4	2
Taquicardia	4	-
<i>Sistema Respiratorio</i>		
Faringitis	1.4	9
Rinitis	1.2	10
Sinusitis	6	4
<i>Sistema Urogenital</i>		
Pacientes de ambos sexos		
Desórdenes en la micción	1.4	2
Infección en el tracto urinario	6	1
Frecuencia en la micción	5	3
Retención urinaria	2	-
Únicamente mujeres	(N=182)	(N=167)
Dismenorrea	1.2	1.4
Lactación	4	-
Desórdenes menstruales	4	2
Vaginitis	2	-
Leucorrea	2	-
Amenorrea	1	-
Únicamente hombres	(N=140)	(N=152)
Perdida de la eyaculación	4.2	2
Impotencia	2.0	3
<i>Sensaciones Especiales</i>		
Visión anormal	1.8	4
Miđriasis	2	-
Conjuntivitis	1	-
<i>Musculoesqueleto</i>		
Mialgia	1.3	9
Dolor de espalda	6	6
Artralgia	3	5
Debilidad muscular	1	-
<i>Metabólico y nutricional</i>		
Sed	2	2



2.8 Usos terapéuticos⁵¹⁻⁵²

Su uso se indica en estados depresivos de etiología y sintomatología diversa:

- ⇒ Formas endógenas, reactivas, neuróticas, orgánicas, enmascaradas e involutivas de depresión.
- ⇒ Depresión asociada con esquizofrenia y trastornos de la personalidad.
- ⇒ Síndromes depresivos debidos a la senectud o presenectud, estados dolorosos crónicos y afecciones somáticas crónicas.
- ⇒ Distimias depresivas de naturaleza reactiva, neurótica o psicósomática, inclusive sus equivalentes somáticos, también en la infancia.

Síndromes obsesivo-compulsivos.

2.9 Dosificación y vías de administración

Los regímenes de dosificación recomendados para la vía oral en el tratamiento de pacientes con síndromes obsesivo-compulsivos son: una gragea de 25 mg tres veces al día o una gragea diaria de *Anafranil retard*. La dosis diaria se podrá aumentar hasta 4 o 6 grageas de 25 mg o 2 grageas de *Anafranil retard* durante la primera semana de tratamiento. Esta dosificación podrá elevarse en los casos graves hasta un máximo de 250 mg al día.⁵¹

La clomipramina está también disponible para la administración intramuscular o intravenosa, lo cual es particularmente útil en pacientes con una depresión severa quienes presentan un alto riesgo de suicidio, o en pacientes que se niegan a una medicación oral. Una dosis inicial de 25 a 50 mg/día puede ser administrada por vía intramuscular e irse incrementando gradualmente hasta una dosis de 100 a 150 mg/día. Una vez que se observe una mejoría clínica, la dosis puede reducirse gradualmente mientras se va transfiriendo simultáneamente a una dosis de mantenimiento oral. Infusiones intravenosas diarias de 50 a 75 mg pueden ser administradas durante 1,5 a 3 horas durante aproximadamente una semana y al igual que con la administración intramuscular, ir sustituyendo con una dosis de mantenimiento oral.⁵²



2.10 Formas farmacéuticas de liberación controlada

En los sistemas de liberación controlada existen diferentes ventajas terapéuticas, así como razones comerciales que justifican el reciente énfasis en los méritos de estos preparados farmacéuticos, el dramático incremento en su uso y su surgimiento como la posible forma de dosificación ideal en el futuro.

Las formas farmacéuticas de liberación controlada cubren un amplio intervalo de formulaciones de acción prolongada, las cuales proveen una liberación continua de sus ingredientes activos a una velocidad predeterminada y por un periodo de tiempo específico. Las principales ventajas que proporcionan estas preparaciones son: mantienen la acción del fármaco durante un amplio periodo de tiempo, mejoran la eficacia terapéutica, minimizan los efectos tóxicos, aseguran el seguimiento del régimen terapéutico por el paciente o simplemente le otorgan mayor comodidad y/o economía (Fig. 2.2).⁵³⁻⁵⁴

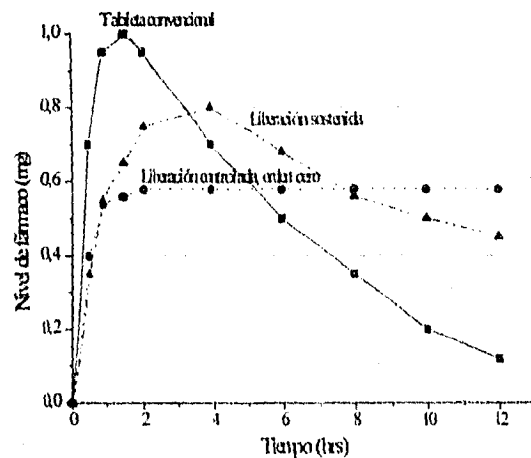


Fig. 2.2 Diferencias en los niveles plasmáticos de un fármaco dado administrado en diferentes formas farmacéuticas.

La FDA emplea el término de liberación prolongada para aquellos preparados orales formulados con el propósito de mantener las concentraciones del fármaco y/o metabolito en el sitio de acción por intervalos más largos de tiempo, en comparación con los que permite la forma farmacéutica de liberación convencional.

El uso de estos sistemas son una excelente herramienta para alcanzar un control preciso de los mecanismos de liberación del fármaco, no únicamente a una velocidad predeterminada sino también a un sitio en particular. La optimización de la eficacia y seguridad terapéutica se tiene como resultado de proveer una respuesta farmacológica constante, esto es, la liberación del fármaco a una velocidad controlada puede optimizar la terapia evitando variaciones en los niveles plasmáticos y conservándolos en un nivel terapéutico adecuado.¹

Desafortunadamente estas formas farmacéuticas todavía son irreales, es decir, aún no se ha podido encontrar un mecanismo de producción invariable que asegure su confiabilidad. En general, los reportes en la literatura señalan que muchas de estos preparados no proveen una biodisponibilidad adecuada para una respuesta terapéutica dada: no presentan una liberación realmente sostenida del fármaco durante el régimen de dosificación, el fármaco se libera pobremente o a una velocidad no adecuada, etc. Esto es consecuencia principalmente de problemas en su diseño y manufactura.⁵⁵⁻⁵⁶

Los estudios de biodisponibilidad de los sistemas de liberación controlada se han diseñado para dirigirlos a crear un criterio único en el estudio de estos preparados farmacéuticos. Así, las referencias estándares usadas para estudios comparativos usualmente incluyen una disolución o suspensiones del fármaco, una forma de dosificación que se encuentre actualmente en el mercado y que contenga el mismo ingrediente activo y, si estuviese disponible, una forma farmacéutica de liberación controlada de manufactura actual y que contenga el mismo fármaco.

Algunos autores recomiendan incluir en los estudios de biodisponibilidad, una dosis única del fármaco a una concentración equivalente a la presente en el sistema de



liberación controlada, esto principalmente para demostrar los efectos tóxicos potenciales en caso de una liberación accidental del total de la dosis. Gibaldi y Perrier⁵⁷ reportan que el criterio más importante para la evaluación de los productos de liberación controlada son tanto la biodisponibilidad como la relación $C_{p_{max}}$ y $C_{p_{min}}$ al estado estacionario. Se ha recomendado una biodisponibilidad del 80%, en relación a la forma de dosificación convencional, como un límite adecuado para una forma de dosificación bien diseñada de liberación controlada. Se sugiere que la relación $C_{p_{max}}$ y $C_{p_{min}}$ al estado estacionario no exceda el índice terapéutico del fármaco o aquel observado después de una dosificación múltiple del producto convencional del fármaco.

2.11 Métodos analíticos empleados para la determinación de clomipramina y desmetilclomipramina en fluidos biológicos

El interés en la medición de las concentraciones plasmáticas de los antidepresivos creció como consecuencia de las investigaciones relativas a determinar las diferencias que se observan en la respuesta terapéutica de los pacientes. Se ha encontrado que ésta se encuentra relacionada con la variación en la concentración del fármaco en diferentes fluidos biológicos. Dicha observación ha promovido un aumento en el desarrollo analítico de técnicas que provean la sensibilidad y la selectividad necesarias. El problema de la selectividad permanece todavía como el principal reto, los antidepresivos presentan un gran número de metabolitos activos que deben ser cuantificados en el mismo método.

Se ha desarrollado un gran número de métodos analíticos para la medición de la clomipramina y la desmetilclomipramina en fluidos biológicos.⁵⁸⁻⁵⁹ Entre los métodos no clásicos se encuentra el desarrollado por Camis⁶⁰, un ensayo de doble derivatización de un radioisótopo, este método es específico para ambos compuestos. Read⁶¹ describió un método de radioinmunoanálisis el cual, no obstante su sensibilidad y especificidad para monitorear las concentraciones plasmáticas de clomipramina, no permite determinar a la desmetilclomipramina simultáneamente.

Las técnicas espectrofotométricas y fluorométricas carecen de la adecuada sensibilidad y/o de la selectividad para una aplicación rutinaria. De todos los métodos que se pudieran discutir, sin lugar a duda los más usados en situaciones de relevancia clínica son los métodos cromatográficos. Algunos de estos métodos son específicos para uno o dos fármacos, otros son capaces de determinar simultáneamente a varios antidepresivos y son útiles para su monitoreo en concentraciones terapéuticas.⁶² Existe una gran cantidad de reportes acerca del uso de la cromatografía gas-líquido (CGL, **Tabla 2.6**) para la cuantificación de este fármaco y más recientemente, el número de métodos basados en la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, **Tabla 2.7**) a ido en aumento.

Tabla 2.6 Resumen de los métodos de CGL para la determinación de clomipramina y sus metabolitos.

Sustancia (s) monitorizada (s)	Fluido biológico	Detección*	Condiciones especiales	Comentarios	Referencia
CMI	Plasma	N			63
CMI, DCMI	Sangre completa	MS	Marceje con deuterio, estándar interno		64
CMI, DCMI	Plasma	MS			65
CMI, DCMI	Plasma	FI			66
CMI, DCMI	Plasma o suero	FI		Mide también imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, trimipramina y protriptilina	67
CMI, DCMI	Plasma	N		Mide también imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina y maprotilina	68
CMI, DCMI	Plasma	N	Derivatización con anhídrido heptifluorobutírico	Mide también imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, maprotilina y cicloberzaprina	69
CMI, DCMI	Plasma	N		Mide también imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, doxepina, demetil-doxepina, trimipramina, demetil-trimipramina y dibenzepina	70
CMI, DCMI	Plasma	TI	Columna capilar	Mide alrededor de 10 fármacos antidepresivos y sus metabolitos demetilados	71
CMI, DCMI	Plasma	N	Derivatización con anhídrido trifluoroacético	Mide también clorpromazina y sus 2 metabolitos demetilados	72
CMI, DCMI	Sangre completa o plasma	MS	Columna capilar y derivatización con anhídrido pentafluoropropiónico		73
CMI, DCMI	Sangre completa o plasma	N		Mide también imipramina, desipramina, amitriptilina y nortriptilina	74

* Abreviaturas: N, Nitrogeno; MS, Espectrofotometría de masas; FI, Ionización a la flama; TI, térmica.

Tabla 2.7 Resumen de los métodos de CLAR para la determinación de clomipramina y desmethylclomipramina.

Estándar interno	Pasos de extracción; disolvente	Tipo de CLAR (columna)	Long. de onda del detector* (nm)	Tiempo total de análisis para CMI y DCMII (min.)	Límite de cuantificación (ng/ml.)	Precisión (C.V. %)	Comentarios**	Referencia
TRI	3; éter	Par iónico (Diachrom 37-44 µm) Fase normal (Micropak S110)	255	10	7	4.3 (CMI) 6.3 (DCMII)	Sangre completa. Determina también AT, NT y PT	74
PT	2; ciclohexano	Fase normal (Micropak S110)	220	8	5-10	5		75
IMI	1; n-hexano	Fase normal (Lichrosphere S100) Par iónico (Partisil 10)	250	10	2 (CMI) 5 (DCMII)	2.5	Determina también IMI, DMI, AT y NT	76
TRI	3; éter	Adsorción (LiChrosorb Si 60)	254	7	2 (CMI) 10 (DCMII)	7.3 (CMI)		77
IMI	1; n-hexano	Adsorción (LiChrosorb Si 60)	250	24	2 (CMI) 10 (DCMII)	-	Suero. Determina también IMI, DMI, AT, NT, DOX, MAP, PT y TRI	78
IMI, DMI	1; Extralut-1 (columna)*	Fase normal (LiChrosorb Si 60)	254	16	5 (CMI) 10 (DCMII)	2.8 (CMI) 5.2 (DCMII)	Determina también IMI, DMI y NT	79
PT	3; éter:H ₂ SO ₄	Fase inversa (µBondapak-CN)	254	15	2-5	3 (CMI) 2.6 (DCMII)	Sangre completa. Determina IMI, DMI e OH-IMI	80
IMI, DMI	1; hexano/acetoniitrilo (columna)*	Fase normal (LiChrosorb Si 60)	254	15	2-5	3 (CMI) 2.6 (DCMII)	Determina 10 antidepresivos y sus principales metabolitos	81
PT	3; éter:H ₂ SO ₄	Fase inversa (µBondapak-CN)	254	15	5	4	Determina NT, CT y AT	82
IMI, DMI	1; hexano/acetoniitrilo	Fase inversa (µBondapak-C18) Adsorción (Columna de sílice)	254	15	5	5	Determina 8 antidepresivos y sus principales metabolitos	83
DMI	1; hexano/ alcohol isoamílico	Fase inversa (µBondapak-C18) Adsorción (Columna de sílice)	214 o 254	15	<5	5	Determina 8 antidepresivos y sus principales metabolitos	84
DMI	1; hexano/ alcohol isoamílico	Fase inversa (µBondapak-C18) Adsorción (Columna de sílice)	214 o 254	15	<5	5	Determina 8 antidepresivos y sus principales metabolitos	85

Tabla 2.7 Resumen de los métodos de CLAR... continuación.

Estándar interno	Pasos de extracción; disolvente	Tipo de CLAR (columna)	Long. de onda del detector* (nm)	Tiempo total de análisis para CMI y DCMi (min.)	Límite de cuantificación (ng/mL)	Precisión (C.V. %)	Comentarios**	Referencia
			EC				Sangre completa u orina. Determina también los metabolitos hidroxilados de la CMI	32
DMI	2: acetato de etilo/ n-heptano	Par iónico (Ultrasphere-IP)	EC	14 (plasma) 18 (orina)	0.2	3.7 (CMI) 5.4 (DCMi)	Orina. Determina también 4 metabolitos hidroxilados de la CMI y de la DCMi	85
	1: buffer fosfato/ TSK precolumn PV	TSK gel ODS-80TM	254	30	10	3	Suero. Determina también 8 antidepresivos más y sus metabolitos	87
IMI	1: n-hexano/ isopropanol	Fase normal (Columna de sílica)	214 y 254	-	-	3.5 (CMI) 5 (DCMi)	No reporta mayores datos de la técnica	88
EMI	1: n-hexano	Fase normal (Columna de sílica)	254	6	0.5 (CMI) 2 (DCMi)	6	Orina. Determina otros 6 metabolitos de la CMI	89
PMI	2: heptano/ terbutilmetiléter/ puzanol	RP-Pheny/ (Nucleosil)	220	30	5 (plasma) 10 (orina)			90

* Solo si es detección UV, en caso de no serlo, se señala en el espacio correspondiente: EC, electroquímico
 ** Además de su determinación plasmática se cuantifica en las matrices biológicas señaladas. Abreviaturas: IMI, Imipramina; DMI, Desipramina; OI-IMI, hidroximipramina; AT, amitriptilina; DOX, Doxepina; MAP, Maprotilina; NT, Nortriptilina; PT, Proriptilina; TRI, Trimipramina; CT, Citalopram.

III. Objetivos



Establecer si la *formulación de prueba* de liberación sostenida es igualmente biodisponible que la formulación de liberación rápida (*Anufranil*) y determinar si los niveles al estado estacionario de esta forma farmacéutica se encuentran dentro del intervalo terapéutico.

Metas:

- a) Calcular los parámetros farmacocinéticos de la clomipramina en sujetos mexicanos

- b) Establecer si realmente la *formulación de prueba* (B) presenta un patrón de liberación sostenida



IV. Parte Experimental



4.1 Reactivos y materiales empleados en el estudio

4.1.1 Reactivos

- ⇒ Acetonitrilo grado cromatográfico, Mallinckrodt
- ⇒ Hexano, grado R.A., Beckman
- ⇒ Fosfato monobásico de potasio R.A., J.T. Baker
- ⇒ Carbonato de Sodio R.A., J.T. Baker
- ⇒ Hidróxido de Sodio R.A., J.T. Baker
- ⇒ Ác. clorhídrico R. A., J. T. Baker
- ⇒ Metanol R.A., J.T. Baker
- ⇒ Plasma Humano, libre de pirógenos y certificado de pruebas de VDRL, VIII, factor Rh y grupo sanguíneo, procedente del banco de plasma del INNN

4.1.2 Estándares (Donados por los laboratorios Ciba - Geigy)

- ⇒ Desipramina, Sigma
- ⇒ Clorhidrato de Clomipramina, estándar secundario de referencia
- ⇒ Clorhidrato de Desmetilclomipramina, estándar secundario de referencia

4.1.3 Productos empleados en el estudio. Adquisición

Se estudiaron dos formas farmacéuticas conteniendo clomipramina como único principio activo. La primera de ellas fue la *formulación A* (grageas 25 mg, producto innovador *Anafranil*) y que es la forma farmacéutica de liberación rápida y la segunda fue la *formulación B* (grageas 75 mg, formulación de prueba) la cual es la forma farmacéutica de liberación sostenida.

Todos los individuos (voluntarios sanos y pacientes) fueron medicados en los respectivos estudios y periodos clínicos con grageas de un mismo lote.

Los lotes de la *formulación A* y la *formulación B* empleados en el estudio clínico con voluntarios, fueron donados por la empresa Ciba-Geigy (Lotes 40871 y 41032). Las demás grageas fueron dispensadas en la farmacia del INNN (Lotes empleados en el estudio con pacientes: 50213 y 50156).



4.1.4 Equipo

- ⇒ Cromatógrafo de líquidos *System Gold*, equipado con bomba modelo Beckman 116, inyector automático modelo Beckman 507 y detector de UV de longitud de onda variable, modelo Beckman 166
- ⇒ Columna μ Bondapak C - 18, 10 micras, de 300 x 3.9 mm Waters
- ⇒ Baño de agua Lab - Line Modelo *Imperial IV*
- ⇒ Baño de ultrasonido modelo 5210, Branson
- ⇒ Balanza analítica Modelo A210p, Sartorius
- ⇒ Centrifuga Damon, Modelo HEC HN-S11
- ⇒ Espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett-Packard 8452A

4.1.5 Lavado de material

El material empleado fue lavado con detergente, enjuagado con abundante agua destilada y sumergido durante 12 horas en una disolución de ácido nítrico diluido (10 %). Finalmente se enjuagaba con agua grado HPLC y se secaba antes de su uso.

4.2 Control de calidad de los productos⁹¹

Las pruebas de control de calidad que se realizaron a cada lote fueron las especificadas en la FEUM 6a edición y son las siguientes:

- ⇒ Identificación (MGA 0361)
- ⇒ Tiempo de desintegración (MGA 0261)
- ⇒ Uniformidad de dosis (MGA 0299)
- ⇒ Valoración del principio activo (MGA 0361)

El método experimental implementado para la realización de cada análisis puede consultarse en la monografía señalada.

4.2.1 Identificación

Los picos de máxima absorbancia de la disolución de prueba deberán corresponder a aquellos obtenidos en la disolución estándar.



4.2.2 Tiempo de desintegración

El medio de prueba fue agua destilada a una temperatura de 37 ± 2 °C. El tiempo de desintegración máximo que especifica la FEUM debe ser de 60 minutos.

4.2.3 Uniformidad de contenido

La cantidad de principio activo contenida en cada una de las grageas deberá estar en el intervalo de 85-115% de la cantidad especificada en el marbete, y la desviación estándar relativa deberá ser menor o igual al 6.0 %.

4.2.4 Valoración del principio activo

Debido a la cantidad con que se contaba de estándares y reactivos empleados para la realización de esta prueba, se decidió modificar la recomendada en la FEUM y adecuarla a las condiciones de trabajo prevalecientes. A continuación se detalla la técnica empleada.

Preparación de la disolución de referencia

Pesar con exactitud una cantidad del patrón de referencia equivalente a 1 mg de clomipramina, transferir a un matraz aforado de 50 mL. Disolver y llevar al aforo con una disolución de HCl 0.1 N. Esta disolución contiene aproximadamente 20 µg/mL de clomipramina.

Preparación de la disolución muestra

Para la *formulación A* (25 mg). Determinar el peso promedio de 20 grageas, pulverizarlas finamente y transferirlas a un matraz volumétrico de 500 mL. Adicionar 200 mL de HCl 0.1 N y agitar durante 30 min. Aforar con HCl 0.1 N y filtrar. Transferir una alícuota de 5 mL de la disolución filtrada a un matraz aforado de 25 mL y aforar con la disolución de HCl. De esta disolución hacer una dilución 1:10, también en HCl 0.1 N. La concentración de esta última disolución será de 20 µg/mL.

Para la *formulación B* (75 mg). Determinar el peso promedio de 20 grageas, pulverizarlas finamente y transferirlas a un matraz volumétrico de 500 mL. Adicionar 200 mL de HCl 0.1 N y agitar durante 30 min. Aforar con HCl 0.1 N y filtrar. Transferir una alícuota de



5 mL de la disolución filtrada a un matraz aforado de 25 mL y aforar con la disolución de HCl. De esta disolución transferir 0.34 mL (tomados con una micropipeta) a un matraz aforado de 10 mL y aforar con HCl 0.1 N. La concentración de esta disolución será de aproximadamente 20 µg/mL.

Procedimiento

Obtener la absorbancia de la disolución de referencia y de la disolución muestra a una longitud de onda de 252 nm y con la disolución de HCl 0.1 N como blanco de ajuste.

Calcular, como se indica en la farmacopea, la cantidad de clomipramina en la disolución de muestra tomada para el análisis y determinar la cantidad en miligramos de clorhidrato de clomipramina por gragea. Esta deberá estar entre el 93 y 107 % de la cantidad especificada en el marbete.

4.3 Método analítico para la cuantificación de clomipramina y desmetilclomipramina en plasma (CLAR)

El método analítico empleado se reprodujo de aquel reportado por Pok Phak y colaboradores, 1985.⁸⁴

4.3.1 Preparación de las disoluciones

4.3.1.1 Disoluciones de los estándares de referencia

Pesar con exactitud una cantidad del patrón de referencia equivalente a 1 mg de clomipramina, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver en metanol grado HPLC y llevar a volumen con el mismo disolvente. Se obtiene una concentración final de 10 µg/mL (*disolución stock*). De esta disolución realizar en metanol una dilución 1:10 (*disolución de trabajo*), esta tendrá una concentración de 1 µg/mL.

El mismo procedimiento se aplica para la preparación de las disoluciones del estándar interno (desipramina: *disolución stock*, 10 µg/mL y *disolución de trabajo*, 1 µg/mL) y del metabolito (desmetilclomipramina: *disolución stock*, 10 µg/mL y *disolución de trabajo*, 1 µg/mL).



4.3.1.2 Fase móvil

Preparar una disolución de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0.025 M. Mezclar el acetonitrilo, la disolución de fosfatos y el agua en la siguiente proporción:

$\text{CH}_3\text{CN} : \text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{H}_2\text{O}$
(45 : 50 : 5)

Degasificar con ultrasonido durante 10 min.

4.3.2 Procedimiento para el análisis de las muestras plasmáticas

En un tubo de ensayo de 15 mL con tapón de rosca, colocar 1 mL de muestra plasmática, adicionar 100 μL de la *disolución de trabajo* de estándar interno (desipramina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Agregar 500 μL de la disolución de carbonato de sodio 2 M y 10 mL de n-hexano. Agitar durante 5 minutos en un agitador mecánico *Vortex*, centrifugar a 3000 r.p.m. por 15 min. Separar con pipeta pasteur la fase orgánica (capa superior) y transferirla a un tubo de ensayo de 10 mL. Evaporar la fase orgánica con ayuda de una corriente de nitrógeno ($T = 30^\circ\text{C}$) y reconstituir con 200 μL de la fase móvil. Someter los tubos a ultrasonido por espacio de 30 segundos e inyectar 100 μL al sistema cromatográfico bajo las siguientes condiciones:

- ⇒ Columna $\mu\text{Bondapak C}_{18}$, 10 micras, con una longitud de 300 x 39 mm., Waters
- ⇒ Velocidad de flujo 1 mL/min
- ⇒ Presión aproximadamente de 0.980 PSI
- ⇒ Temperatura ambiente
- ⇒ Tiempo de corrida 18 min.
- ⇒ Longitud de onda 254 nm

La secuencia del método empleado se presenta en la Fig. 4.1.



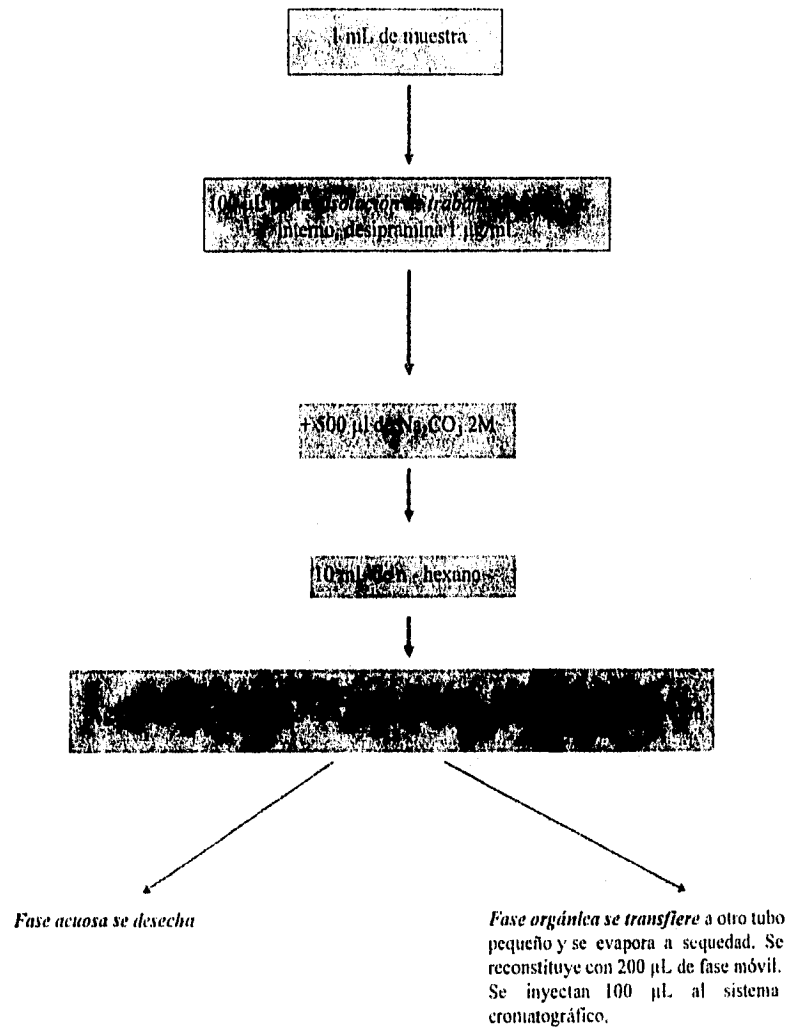


Fig. 4.1 Secuencia empleada para la extracción de clomipramina y desmetileclomipramina de muestras plasmáticas

4.3.2.1 Preparación de la curva patrón en plasma

La curva patrón se realizó como se propone en la Tabla 4.1. Se aplica el procedimiento 4.3.2 y se inyecta al sistema cromatográfico bajo las condiciones enlistadas. Se determina la relación de áreas de las muestras plasmáticas, dividiendo la respuesta cromatográfica de la clomipramina o desmetilclomipramina entre la respuesta del estándar interno.

Tabla 4.1 Preparación de curva patrón de clomipramina y desmetilclomipramina en plasma

Compuesto	Alicuota de disolución stock μL	Alicuota de disolución de trabajo μL	Concentración final en plasma (ng/mL)
Clomipramina	-	5	5
	-	20	20
	-	50	50
	10	-	100
	20	-	200
	40	-	400
Desmetil-clomipramina	-	5	5
	-	20	20
	-	50	50
	10	-	100
	20	-	200
	40	-	400

4.3.3 Validación del método analítico

4.3.3.1 Especificidad

La especificidad del método se determinó probando la no interferencia de la matriz biológica (plasma) y de algunos fármacos asociados a la medicación: cafeína, triazolam, imipramina, levopromazina, trimipramina. Así mismo se probó la no interferencia de otros reactivos empleados en la extracción del principio activo, carbonato de sodio y hexano, y del metabolito principal de la clomipramina.

Para llevarlo a cabo se trabajaron en forma independiente y por duplicado, muestras de 1 mL de plasma adicionadas con el metabolito y con varios fármacos.



4.3.3.2 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fue estimado con 3 curvas de calibración, en el intervalo de concentración de 1.0 a 50 ng/mL por medio del siguiente método:^{92, 95}

1. Determinar la altura de las respuestas del fármaco en mm
2. Graficar las respuestas contra las concentraciones
3. Calcular la pendiente de la curva de calibración
4. Realizar 3 determinaciones de la "señal de ruido del sistema cromatográfico" (medidas en mm)
5. Obtener la desviación estándar
6. Determinar el límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) aplicando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = 3 S_b / S$$

$$LOQ = k S_b / S$$

Donde:

S_b = Desviación estándar de la "señal de ruido del sistema cromatográfico"

S = Pendiente de la curva

k = 10 para 10% de RSD (desviación estándar relativa)

4.3.3.2.1 Verificación del límite de cuantificación.

Una vez obtenida la cantidad correspondiente al límite de cuantificación, se verificó el valor preparando 5 muestras independientes adicionadas con la cantidad de clomipramina y desmetilclomipramina determinada para tal límite. Las muestras se procesaron y se inyectaron conforme a lo indicado en 4.3.2, calculando su coeficiente de variación.

4.3.3.3 Linealidad

La linealidad del método se determinó preparando tres curvas patrón siguiendo los lineamientos indicados en 4.3.2.1, graficando la relación de áreas (clomipramina/ estándar interno y desmetilclomipramina/ estándar interno) contra la concentración del

fármaco en un intervalo de 5 a 400 ng/mL. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (B) y la ordenada al origen (A).

4.3.3.4 Exactitud y precisión

La exactitud y la precisión del método se evaluaron con seis concentraciones de calibración (5 a 400 ng/mL) en tres días diferentes y con 3 réplicas para cada concentración.

El porcentaje de recobro se determinó preparando tanto muestras de plasma como de disolución acuosa, adicionadas con clomipramina y desmetilclomipramina a los seis niveles de concentración establecidos, realizando el proceso de extracción señalado en 4.3.2 y comparando la respuesta obtenida con aquella que se presentó en el sistema sin realizar el paso de extracción.

4.3.3.5 Estabilidad

La estabilidad de la clomipramina y desmetilclomipramina en plasma se verificó en dos sentidos:

a) Estabilidad a largo plazo

Se preparó una disolución de plasma adicionada con clomipramina y desmetilclomipramina (100 ng/mL), se repartió un volumen de 1 mL en tubos de ensayo con una capacidad de 15 mL. Se efectuó el análisis inicial para cuatro tubos de acuerdo al procedimiento 4.3.2 y los tubos restantes se mantuvieron en congelación a una temperatura de -5 °C. Se analizaron cuatro tubos cada semana durante un período de mes y medio siguiendo el mismo procedimiento.

b) Estabilidad en el residuo evaporado

Se preparó una muestra de plasma adicionada de 100 ng/mL de clomipramina y desmetilclomipramina. Se transfirió, individualmente, 1 mL a doce tubos de ensayo con capacidad de 15 mL. Se analizaron tres de estas muestras de acuerdo a 4.3.2 y las restantes se procesaron hasta el último paso de evaporación de la fase orgánica. Estas muestras se guardaron a -5 °C. Se analizaron tres diferentes muestras a las 24, 48 y 72



horas de haber sido almacenadas. Las muestras se resuspendieron en fase móvil al momento de su análisis.

4.4 Estudio de Biodisponibilidad Relativa

Consideraciones éticas

Los voluntarios y pacientes que participaron en el estudio fueron tratados de acuerdo a los protocolos de la declaración de Helsinki y las regulaciones locales del INNN y del país con el objeto de salvaguardar sus derechos y bienestar. A los participantes se les hizo llegar una hoja *explicativa* que contenía los objetivos del proyecto, la técnica general del estudio, las características del fármaco en consideración y los posibles efectos adversos. Todo de manera clara y entendible. Los participantes firmaron una hoja de consentimiento en donde expresaban que por voluntad propia se sometían al estudio (Apéndice VII) y que se ajustarían a lo estipulado por el protocolo.

El protocolo diseñado para la realización del estudio clínico fue aprobado por el comité ético del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), lugar donde se llevaron a cabo las dos etapas del estudio.

El estudio consistió de dos etapas clínicas que se detallarán por separado.

ETAPA I. Estudio en dosis única, voluntarios sanos

4.4.1 Diseño experimental del estudio

El diseño experimental propuesto para el estudio clínico fue el cruzado de dos periodos, con niveles de dosificación preestablecidos y con un intervalo de lavado entre periodos de 2 semanas. Los sujetos fueron divididos al azar en dos grupos, A y B.

El grupo A recibió tres grageas de liberación rápida (*formulación A*), en el periodo clínico I y una gragea de la *formulación B* en el periodo clínico II.

El grupo B recibió la formulación alternada en los respectivos periodos clínicos (periodo clínico I, *formulación B* y periodo clínico II, *formulación A*).



Se mantuvo estricto control de los alimentos el primer día de cada periodo clínico, los alimentos permitidos en los demás días estuvieron sujetos a las restricciones establecidas en el protocolo (sección 4.4.5). Los alimentos proporcionados consistieron de un desayuno estándar servido dos horas después de la administración del fármaco y de una comida la cual se sirvió seis horas después. El desayuno consistió en un cóctel de frutas, un sandwich de jamón de pavo, gelatina y agua; mientras que en la comida se sirvió una ensalada de lechuga, una sopa de zanahoria, pechuga empanizada con puré de papa, arroz con leche y agua de guayaba. El mismo menú se sirvió en los dos periodos clínicos.

4.4.2 Número de voluntarios

En el estudio participaron 12 voluntarios sanos con edades comprendidas entre 20 y 40 años y un peso aproximado de 65 a 85 kg. Los sujetos se encontraban en buen estado de salud lo cual se estableció en base a los resultados de su historia médica.

4.4.3 Secuencia y dosis administrada de los medicamentos

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a cada una de las dos secuencias. La aleatorización fue balanceada en bloques de 6 sujetos cada uno. El producto innovador fue designado como *formulación A* (gragea de 25 mg) y el producto de prueba como *formulación B* (gragea de 75 mg).

De la *formulación A* se administró una dosis de tres grageas de 25 mg y de la *formulación B* se administró una dosis única de 75 mg de clomipramina.

4.4.4 Horario de toma de muestras y su conservación

Se colectaron muestras de 6-10 mL de sangre en tubos heparinizados (*Vacutainer*, 143 unidades de heparina sódica/ tubo). Las muestras sanguíneas se tomaron a los siguientes tiempos: justo antes de la administración de la forma farmacéutica y a las 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. por 15 min. El plasma se transfirió a tubos de vidrio, limpios y etiquetados. Todas las muestra se congelaron sin conservadores y se guardaron a -5 °C.



Se dejó un período de lavado de 2 semanas para asegurar la completa eliminación del fármaco y su metabolito (desmetilclomipramina).

4.4.5 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- ⇒ Buena salud avalada por los resultados de su historial clínico
- ⇒ Sujetos sin antecedentes de hipersensibilidad a cualquier fármaco (en particular a un agente antidepresivo)
- ⇒ Sujetos que no requirieran de la administración de cualquier otro tipo de fármaco durante el estudio
- ⇒ Sujetos que no hubiesen sido hospitalizados durante las 8 semanas previas al estudio o que tuviesen enfermedades clínicamente importantes en las cuatro semanas anteriores.

4.4.6 Restricciones para los voluntarios admitidos en el estudio

Las restricciones establecidas a los voluntarios fueron las siguientes:

- ⇒ No tomar ningún otro medicamento
- ⇒ No ingerir comidas o bebidas que contengan alcohol los tres días anteriores y durante el estudio clínico.

ETAPA II. Estudio en el estado estacionario en pacientes con depresión

4.4.7 Diseño experimental del estudio

Participaron 6 pacientes con diagnóstico de depresión y que se encontraban bajo terapia con la clomipramina. Se empleó el mismo diseño experimental anteriormente propuesto, con los niveles de dosificación preestablecidos por el médico. A los sujetos se les asignó aleatoriamente la secuencia de administración del medicamento. Tres de ellos (grupo A) recibieron las grageas de liberación rápida (*formulación A*) en el periodo clínico I (10 días) y con la dosificación individual señalada por el médico. En el periodo clínico II (días 11-15) recibieron la dosificación equivalente a la del periodo clínico I administrando en este caso la *formulación B*.



Los otros tres pacientes (grupo B) recibieron la formulación alternada en los respectivos periodos clínicos y bajo las mismas condiciones.

Los pacientes recibieron un desayuno estandarizado inmediatamente después de la administración del fármaco. Este, como los demás alimentos, fue proporcionado por el hospital (INNN). Todos los alimentos ingeridos fueron controlados y administrados bajo un programa previamente establecido y que se mantuvo durante la realización del estudio.

4.4.8 Secuencia y dosis de administración de los medicamentos

Los pacientes fueron asignados aleatoriamente a cada una de las dos secuencias. La aleatorización fue balanceada en bloques de tres sujetos cada uno. El producto innovador fue designado como *formulación A* (gragea de 25 mg) y el producto de prueba como *formulación B* (gragea de 75 mg). Las dosis utilizadas fueron previamente establecidas por el médico. La dosificación fue escalonada según se muestra en la **Tabla 4.2**.

Durante el estudio, los pacientes desconocían cual de las dos formulaciones se le había administrado en cada período.

Tabla 4.2 Escalamiento de la dosificación en pacientes.

Grupo	Medicamento	Día	Periodo	# de grageas x # de tomas al día
A (3 pacientes)	<i>Formulación A</i>	1-2	1	1 x 3
		3-10		2 x 3
B (3 pacientes)	<i>Formulación B</i>	11-15	2	2 x 1
	<i>Formulación B</i>	1-2	1	1 x 1
		3-10		2 x 1
	<i>Formulación A</i>	11-15	2	2 x 3

4.4.9 Horario de toma de muestras y su conservación

Los intervalos de tiempo programados para la toma de las muestras sanguíneas fueron los siguiente: para la forma farmacéutica de liberación rápida, antes de la administración de la dosis correspondiente en el último día del periodo clínico y a las 1, 2, 4, 6, 8 h; y para



la forma farmacéutica de liberación sostenida, antes de la última dosificación del periodo clínico correspondiente y a las 2, 4, 8, 12 y 24 h.

Se colectaron muestras de 6-10 mL de sangre en tubos heparinizados (*Vacutainer*, 143 unidades de heparina sódica/ tubo). Las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. por 15 min. El plasma se transfirió a tubos de vidrio, limpios y etiquetados. Todas las muestra se congelaron sin conservadores y se guardaron a -5 °C.

4.4.10 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- ⇒ Pacientes con depresión mayor sin síntomas psicóticos
- ⇒ Pacientes que requieran tratamiento con clonipramina
- ⇒ Pacientes con edades comprendidas entre los 20 y 50 años

4.4.11 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- ⇒ Pacientes que padecían cualquier tipo de epilepsia
- ⇒ Pacientes que presentaron insuficiencia hepática y/o renal
- ⇒ Pacientes con historial de alcoholismo y/o dependencia a drogas
- ⇒ Pacientes que requieran la administración de cualquier otro tipo de fármaco durante el estudio (además de la clonipramina y la levopromazina)

4.4.12 Control de los pacientes incluidos en el estudio

La fase del estudio en que participaron los pacientes se llevó a cabo en el INNN. Estos permanecieron hospitalizados y bajo vigilancia médica al menos por el tiempo que duró el estudio. Los pacientes estuvieron controlados en cuanto a la administración de medicamentos, dosis y alimentos. No se les permitió la ingestión de bebidas alcohólicas ni de ninguna droga. Ninguno fumaba.

4.4.13 Análisis clínicos

Los análisis realizados a los pacientes fueron:



Biometría hemática: hemoglobina, hematocrito, conteo de células rojas, conteo total de células blancas, conteo estimado de plaquetas.

Química sanguínea: sodio, potasio, urea sanguínea, ácido úrico, creatinina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, gama GT, bilirrubina total, glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, albúmina y virus del hepatitis.

HIV, prueba para enfermedades venéreas, coproparasitarias y entéricas.

Orina: gravedad específica, pH, proteína, cetonas, urobilinógeno, glucosa y un examen microscópico. Electrocardiograma.

Se realizó también un análisis psiquiátrico con el fin de determinar la gravedad de la enfermedad y poder establecer una clasificación de los pacientes (escala Hamilton).

4.4.14 Reacciones adversas

Todos los signos o síntomas de reacciones adversas que ocurrieron durante el estudio (en ambas etapas) se reportaron en el informe de cada voluntario y paciente, la descripción incluyó la naturaleza de los signos y/o síntomas, la fecha en que se detectó, el tiempo al cual se presentó, la duración del efecto, la severidad de la reacción, si se requirió otra terapia o no y si los signos o síntomas que fueron detectados se relacionaron a la administración del fármaco o no.

Cualquier síntoma anormal o reacción severa fue informada al responsable médico y se reportó por escrito.

4.4.15 Análisis de los datos del estudio de biodisponibilidad relativa

Los cálculos se realizaron utilizando los programas de computación:

⇒ Origin 4.0

⇒ BIOPAK™

Las fórmulas (cuando se requirieron) para realizar los cálculos, se expresan en **Resultados y Análisis** en las secciones donde se emplearon.



V. Resultados y Análisis



5.1 Control de calidad de los productos

Los diferentes lotes estudiados de la *formulación A* (innovador, formulación de liberación rápida) y *formulación B* (prueba, formulación de liberación sostenida), cumplieron con el control de calidad requerido por las normas mexicanas oficiales vigentes⁹¹ y mencionadas en la parte experimental. Dado que el clorhidrato de clomipramina no se encuentra indicado en la USP y la forma farmacéutica en estudio (grageas) no está contenida en la farmacopea Británica, el criterio de aceptación se basó en la FEUM, 6a. edición.

Los resultados de las pruebas realizadas a los productos empleados en el estudio se muestran a continuación.

5.1.1 Identificación

El análisis de barrido de las disoluciones de las muestras de los diferentes lotes de clomipramina empleados, mostró que los picos de longitud de onda de máxima absorbancia corresponden a los de la disolución estándar (254 nm, Fig. 5.1).

5.1.2 Tiempo de desintegración

Los tiempos de desintegración determinados para las grageas provenientes de los diferentes lotes se muestran en la **Tabla 5.1**. En los resultados se observa que se cumple con los requerimientos de la FEUM: todos los lotes de grageas presentaron un tiempo de desintegración menor a 60 minutos.

5.1.3 Uniformidad de contenido

Los resultados de uniformidad de contenido de los lotes estudiados se reparten en la **Tabla 5.2**. Estos cumplen con la norma establecida: 85 - 115 % del contenido especificado en el marbete con una desviación estándar relativa menor al 6%.

5.1.4 Valoración del principio activo

En la **Tabla 5.3** se muestran los datos referentes a la prueba de la valoración del principio activo en los productos estudiados. La prueba demostró que los productos



cumplen con el contenido de clorhidrato de clomipramina especificado (93 a 107 % del contenido señalado en el marbete).

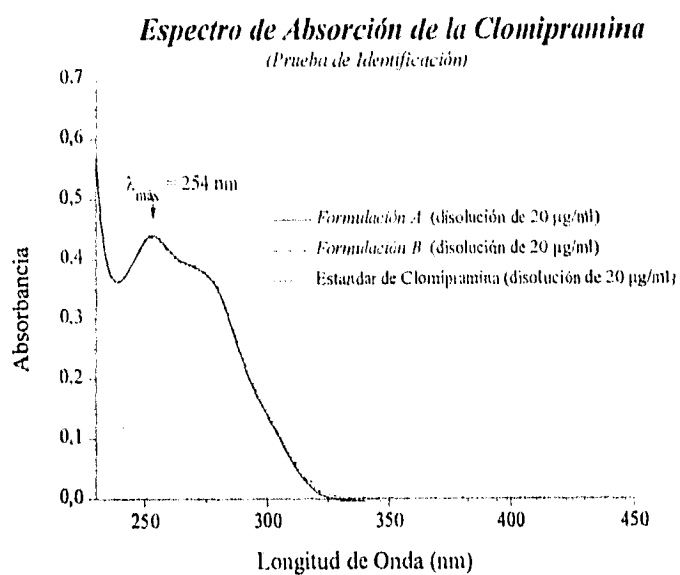


Fig. 5.1 Espectro de absorción de las disoluciones de clomipramina procedentes de las diferentes formas farmacéuticas empleadas. *Formulación A* (innovador), *formulación B* (prueba)

Tabla 5.1 Resultados de la prueba de desintegración para los lotes de trabajo

Lote	Tiempo de desintegración (min.)
40871*	6 min.
50213*	6 min.
41032**	16.32 min.
50156**	16.50 min.

* Lotes de la *formulación A, innovadora*
** Lotes de la *formulación B, prueba*

Tabla 5.2 Resultados de la prueba de uniformidad de contenido (n = 10)

Prueba	Lote	Mediu	D.E.R. (%)	min.	max.
Uniformidad de contenido	40871*	99.00	1.64	97.37	100.63
	50213*	98.88	1.50	98.40	100.10
	41032**	98.91	1.89	97.04	100.78
	50156**	99.01	1.95	98.23	100.96

* Lote de la formulación A, innovadora. ** Lote de la formulación B, prueba

Tabla 5.3 Resultados de la prueba de valoración del principio activo (n = 20)

Prueba	Lote	Determinación
Valoración	40871*	24.90 mg/gragea, 99.60 % de contenido
	50213*	24.93 mg/ gragea, 99.72% de contenido
	41032**	74.55 mg/ gragea, 99.40 % de contenido
	50156**	74.62 mg/ gragea, 99.50 % de contenido

* Lote de la formulación A, innovadora. ** Lote de la formulación B, prueba

5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de clomipramina y desmetilclomipramina en plasma

Como ya se mencionó, existen numerosos métodos analíticos reportados para la cuantificación de la clomipramina y sus metabolitos en plasma y en otros fluidos biológicos. En este aspecto destacan los métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) que utilizan la detección por UV. *Tabla 2.7*. La técnica que se decidió emplear⁸⁴ se eligió porque tiene las características de sensibilidad, especificidad, linealidad, y demás características analíticas requeridas para el estudio clínico.

La validación del método analítico es fundamental para el desarrollo de cualquier estudio clínico, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis en donde se evalúa si el método cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado. Los criterios para la validación del método analítico se basaron en las recomendaciones y lineamientos especificados por diferentes organismos internacionales.⁹²⁻⁹³



5.2.1 Especificidad

Se debe demostrar la especificidad del método con el fin de establecer si existen interferencias debidas a: i) sustancias endógenas en la muestra biológica, ii) metabolitos conocidos del analito y iii) fármacos co-administrados y sus metabolitos.⁹¹

En la Fig. 5.2 y en los datos mostrados en la Tabla 5.4, se observa que no hay interferencias en las respuestas cromatográficas de la clomipramina y desmetilclomipramina por ninguno de los reactivos, fármacos asociados a la medicación (levopromazina), estándar interno y por supuesto de la matriz biológica (plasma). De aquí que consideremos que en este aspecto el método es adecuado para ser empleado en la cuantificación del fármaco sin que exista interferencia de otros componentes presentes.

Tabla 5.4 Tiempo de retención para diferentes fármacos empleados en el análisis de especificidad del método.

Fármaco	Tiempo de retención (min.)
Cafeína	4.02
Desipramina	8.55
Triazolam	8.71
Imipramina	9.23
Levopromazina	9.95
Trimipramina	11.06
Desmetilclomipramina	12.18
Clomipramina	14.80

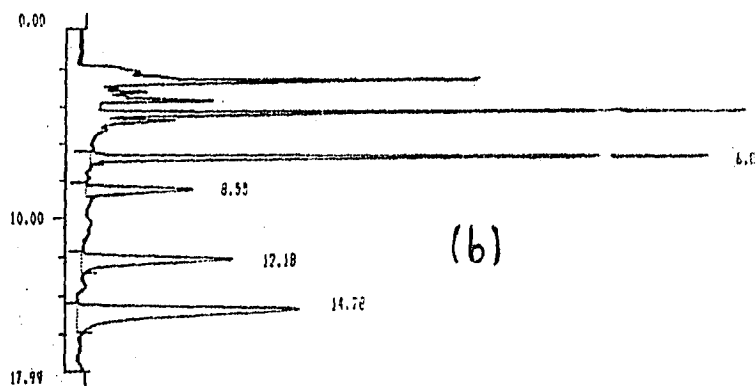
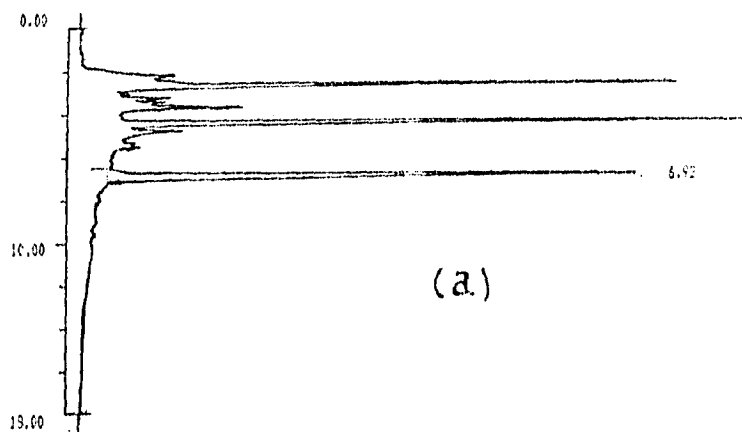


Fig. 5.2 Cromatogramas representativos para a) blanco de plasma, b) muestra estándar en plasma c) muestra de un voluntario sano después de la administración de 75 mg de clomipramina d) muestra de un paciente medicado con clomipramina, niveles en el estado estacionario.



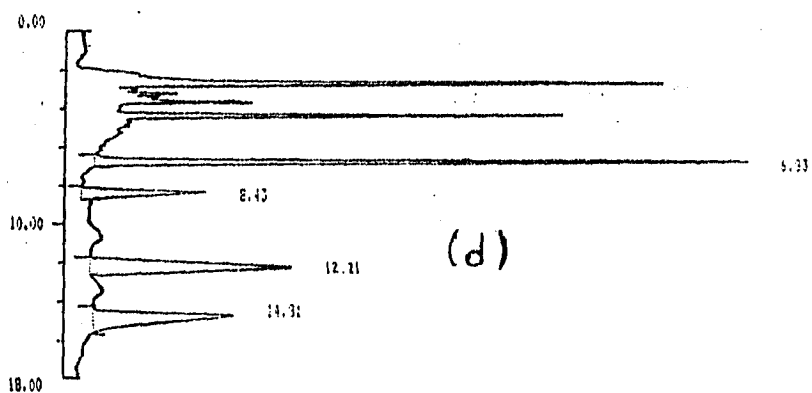
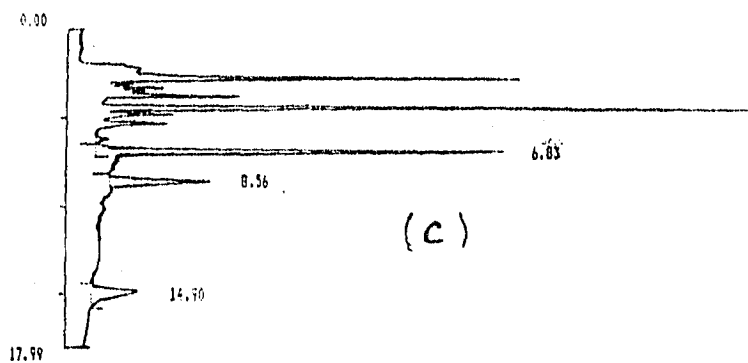


Fig. 5.2 Cromatogramas representativos para a) blanco de plasma, b) muestra estándar en plasma c) muestra de un voluntario sano después de la administración de 75 mg de clomipramina d) muestra de un paciente medicado con clomipramina, niveles en el estado estacionario, continuación...



5.2.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) obtenidos se reportan en la **Tabla 5.5**. El coeficiente de variación de las muestras adicionadas con la concentración mínima cuantificable (5 ng/mL) fue de 11.46 y 9.94% para la clomipramina y desmetilclomipramina, respectivamente.

Tabla 5.5 Límite de detección y de cuantificación para la clomipramina y la desmetilclomipramina⁹²

	LOD ng/mL	LOQ ng/mL
CMI	1.4	4.6
DCMI	1.5	5.0

El límite de detección, considerado como la cantidad más pequeña de fármaco que el método puede detectar, se evaluó por el método especificado en la sección 4.3.3.2. Este fue de 1.4 y 1.5 ng/mL mientras que el límite de cuantificación fue de 4.6 y 5 ng/mL, para la clomipramina y desmetilclomipramina, respectivamente.

Puesto que las concentraciones plasmáticas mínimas reportadas para el fármaco²⁹ son de aproximadamente 5 ng/mL, el método es adecuado para su aplicación clínica.

5.2.3 Linealidad

En la **Fig. 5.3** se muestra la gráfica obtenida en el intervalo de concentración de 5 a 400 ng/mL de clomipramina. La ecuación de la recta promedio fue: $y = 0.0201 + 0.0062x$, presentando un coeficiente de correlación de 0.9997.

En la **Fig. 5.4** se muestra el resultado obtenido para la linealidad del método en la cuantificación de desmetilclomipramina en el intervalo de concentración de 5 a 400 ng/mL. La ecuación de la recta promedio fue: $y = 0.0132 + 0.0040x$ con un coeficiente de correlación de 0.9988.

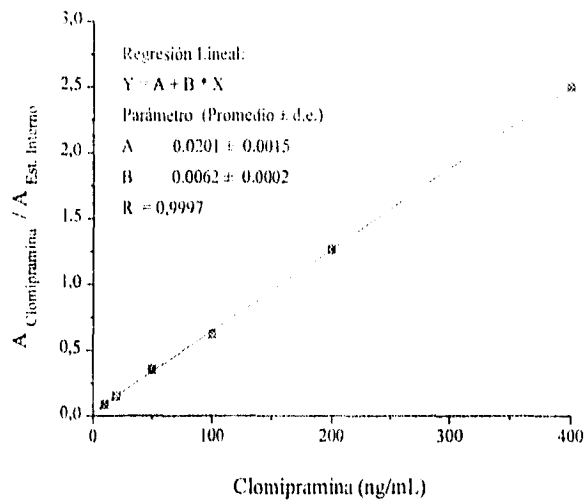


Fig. 5.3 Linealidad para la clomipramina en plasma

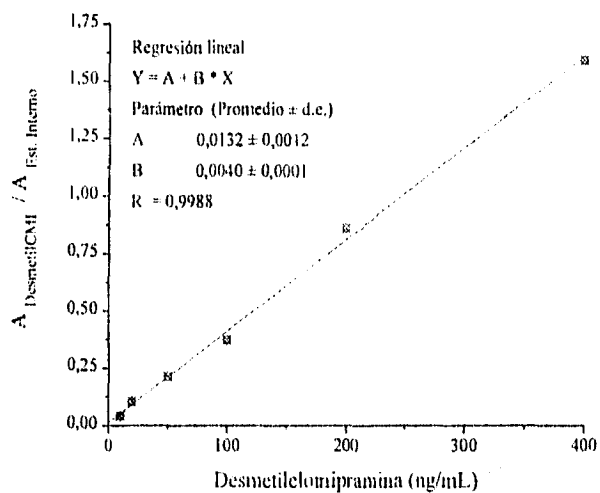


Fig. 5.4 Linealidad para la desmetilelomipramina en plasma

En la linealidad del método se evaluó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (B) y la ordenada al origen (A) de la curva de regresión, estos datos se presentan en la **Tabla 5.6**. A partir de los resultados obtenidos se consideró que el método de cuantificación para la clomipramina y la desmetilclomipramina en plasma cumplía con los requerimientos de linealidad en el intervalo de concentración de 5 a 400 ng/mL y dadas las concentraciones mínimas plasmáticas esperadas²⁹ se consideró adecuado para ser empleado en el estudio de biodisponibilidad.

Tabla 5.6 Parámetros obtenidos en la evaluación de la linealidad del método.

Parámetro	CMI	DCMI
A	0.0201	0.0132
B	0.0062	0.0040
r	0.9997	0.9988
r^2	0.9994	0.9976

5.2.4 Exactitud y precisión

La **Tabla 5.7** resume los resultados obtenidos para 6 concentraciones de calibración analizadas en tres días diferentes con tres replicas para cada concentración. Se puede observar que todos los coeficientes de variación fueron menores al 10 % a excepción de aquellos pertenecientes al límite de cuantificación para la clomipramina que fueron de 11.46 y 10.40 %. Considerando que el límite de variación permitido para establecer como preciso un método analítico aplicado a fluidos biológicos es de 15% y que en el límite mínimo de cuantificación (LOQ) es de 20%,⁹⁴ se puede concluir que el método analítico es preciso.



Tabla 5.7 Variabilidad intra e inter día de muestras adicionadas con clomipramina y desmetilclomipramina en plasma para seis niveles de concentración con tres replicas por nivel

Concentración (ng/mL)	CMI		DCMI	
	Intradía % CV	Interdía %CV	Intradía % CV	Interdía %CV
5	11.46	10.40	9.94	8.42
20	9.31	8.56	7.76	7.47
50	4.01	4.30	4.92	4.80
100	5.86	4.91	3.53	2.96
200	2.16	1.46	1.92	1.52
400	1.28	1.94	1.74	1.00

La exactitud del método se evaluó con el porcentaje de recobro, determinando la cantidad de fármaco recobrado después del proceso de extracción en disolución acuosa y en plasma y comparándolo con la respuesta obtenida en el sistema (disolución acuosa) sin haber realizado el proceso de extracción. En la **Tabla 5.8** se observa que el porcentaje fue de 95.08 y 95.68 % para la clomipramina y desmetilclomipramina respectivamente, lo cual es adecuado para las necesidades analíticas establecidas.

Con base en los resultados obtenidos, el método se estableció como preciso y exacto.

Tabla 5.8 Porcentaje de recobro en medio acuoso adicionado de clomipramina y desmetilclomipramina

Concentración adicionada ng/ml.	CMI		DCMI	
	Concentración recuperada ng/mL	% Recobro (Exactitud)	Concentración recuperada ng/mL	% Recobro (Exactitud)
Medio acuoso				
5	3.68	73.60	3.74	74.80
20	19.85	99.25	20.03	100.15
50	51.23	102.46	49.86	99.72
100	99.12	99.12	100.13	100.13
200	200.12	100.06	199.95	99.98
400	400.25	100.06	400.42	100.10
		<i>Media 95.75</i>		<i>Media 95.81</i>



Tabla 5.8 Porcentaje de recobro en muestras plasmáticas adicionadas con clomipramina y desmetilclomipramina

Concentración adicionada ng/mL	CMI		DCMI	
	Concentración recuperada ng/mL	% Recobro (Exactitud)	Concentración recuperada ng/mL	% Recobro (Exactitud)
Plasma				
5	3.54	70.80	3.86	77.20
20	20.10	100.50	19.84	99.20
50	50.25	100.50	48.57	97.14
100	98.89	98.89	100.56	100.56
200	200.23	100.12	200.04	100.02
400	398.79	99.70	399.87	99.97
		<i>Media 95.08</i>		<i>Media 95.68</i>

5.2.5 Estabilidad

En la Tablas 5.9 se presentan los datos para la estabilidad de las muestras plasmáticas a largo plazo y en la Tabla 5.10 se encuentran los resultados de estabilidad del residuo evaporado.

Tabla 5.9 Estabilidad de la clomipramina y desmetilclomipramina en muestras de plasma mantenidas en congelación durante 6 semanas (Condiciones de almacenamiento -5 °C)

Análisis Inicial ng/mL		Semana 1 ng / mL		Semana 2 ng / mL		Semana 3 ng / mL		Semana 4 ng / mL		Semana 6 ng / mL	
CMI	DCMI	CMI	DCMI	CMI	DCMI	CMI	DCMI	CMI	DCMI	CMI	DCMI
98.58	98.87	101.23	98.26	99.48	100.43	99.87	99.13	96.04	98.26	99.03	98.56
104.06	96.54	97.56	101.98	104.28	98.17	95.43	101.44	99.13	101.98	98.46	95.13
97.89	102.47	105.05	105.59	96.18	107.88	96.76	96.31	100.08	96.98	95.66	93.07
100.25	99.78	98.54	97.42	99.06	99.40	103.88	104.64	94.46	99.20	92.47	90.37
Promedio		Promedio		Promedio		Promedio		Promedio		Promedio	
100.20	91.41	100.59	100.81	99.75	101.47	98.98	100.38	97.43	99.11	94.16	91.28
% C.V.		% C.V.		% C.V.		% C.V.		% C.V.		% C.V.	
2.76	2.47	3.30	3.72	3.36	4.30	3.79	3.52	3.69	3.14	3.90	3.66



Tabla 5.10 Resultados de estabilidad de las muestras evaporadas y conservadas en congelación (-5 °C). Las muestras fueron resuspendidas en fase móvil al momento de su análisis (n=3)

Sustancia	Promedio (ng/mL) ± d.e.			
	Inicial	24 horas	48 horas	72 horas
CMI	101.52 ± 5.80	100.48 ± 6.36	101.44 ± 8.49	99.46 ± 7.29
DCMI	100.86 ± 4.46	99.73 ± 5.95	99.57 ± 6.71	98.64 ± 8.23

Se observa que la variación de las muestras plasmáticas después de 6 semanas de congelación no es mayor al 10 %, de aquí que las muestras son estables hasta un mes y medio conservándolas a -5 °C. Las muestras evaporadas se mantienen estables hasta 72 horas una vez que han sido extraídas de la matriz y conservadas bajo las mismas condiciones que las muestras plasmáticas (-5 °C).

5.2.6 *Sumario de la validación del método analítico*

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer que el método analítico es específico, lineal en un intervalo de concentración de 5 - 400 ng/mL, exacto, preciso y estable bajo las condiciones de experimentación, por lo que se considera aplicable para efectuar estudios de farmacocinética y biodisponibilidad.

5.3 Estudio de Biodisponibilidad Relativa

El estudio se realizó en dos etapas: i) dosis única, voluntarios sanos, ii) dosis múltiples, pacientes con depresión. El estudio en dosis única se realizó en voluntarios sanos ya que, debido al grado de enfermedad que presentaban los pacientes, su tratamiento no podía limitarse a las necesidades del estudio.

Aún cuando lo ideal es realizar un estudio en condiciones homogéneas, la segunda etapa del estudio se realizó en pacientes con depresión, esto con el fin de que los voluntarios no estuviesen expuestos innecesariamente a una dosis y frecuencia de dosificación del fármaco, la cual podía causar importantes e innecesarios efectos adversos.

Se eligieron pacientes con depresión ya que su clasificación (escalamiento de enfermedad) es menos complicada y su terapia menos variable (dosis, tiempo, etc.) que en aquellos que sufren trastornos obsesivo-compulsivos.

Los requerimientos de la FDA para asegurar la confiabilidad y uso de una forma farmacéutica de liberación sostenida son los siguientes:⁵³

1. El producto de prueba debe controlar la liberación del fármaco, lo cual deberá observarse en su perfil plasmático
2. El perfil de C_p vs tiempo para el producto farmacéutico elimina la posibilidad de la liberación inmediata del fármaco
3. El comportamiento del producto farmacéutico en el estado estacionario deberá ser equivalente al observado en la forma farmacéutica de liberación convencional o a algún otro estándar de referencia establecido. La dosificación diaria deberá ser comparable

La FDA acepta como patrones de referencia en este tipo de estudios a:⁵³

- i) cualquier solución intravenosa, solución oral o suspensión del mismo principio activo



ii) una forma farmacéutica de liberación convencional conteniendo el mismo principio activo que se encuentre en el mercado y que presente una biodisponibilidad y reproducibilidad definida

iii) una forma farmacéutica de liberación controlada conteniendo el mismo principio activo que se encuentre en el mercado y que presente una biodisponibilidad y reproducibilidad definida

En este estudio se empleó como patrón de referencia al especificado en el punto ii). Esta forma farmacéutica (*Anafanil*) se encuentra actualmente en el mercado mexicano y es de fácil acceso.

Los parámetros a evaluar en una formulación de liberación sostenida son los siguientes:⁵³

1. Perfil farmacocinético
2. Datos de biodisponibilidad, demostrando la compatibilidad con la forma farmacéutica de referencia así como con las indicaciones y efectos adversos
3. El porcentaje de tiempo que el nivel plasmático del fármaco se mantiene dentro del intervalo terapéutico
4. Porcentaje de fluctuación
5. Reproducibilidad de los perfiles *in vivo*
6. Ausencia de liberación inmediata del fármaco

Los requerimientos específicos para cada punto serán tratados más adelante.

5.4 ETAPA I. Estudio de biodisponibilidad en voluntarios sanos, dosis única

5.4.1 Análisis farmacocinético y biodisponibilidad

La primera parte del trabajo se enfocó al estudio de la biodisponibilidad relativa de las formas farmacéuticas en dosis única ya que de él se obtiene información valiosa para determinar la fracción de dosis absorbida y la ausencia de liberación inmediata de la dosis.



Los voluntarios que participaron en el estudio gozaban de buena salud y cumplían con los criterios de inclusión fijados en el protocolo de trabajo. Algunas de las características físicas de los voluntarios se muestran en la **Tabla 5.11**. Como se puede observar en esta tabla, no existen diferencias importantes entre las edades, estaturas y pesos de los voluntarios participantes. La edad promedio de los voluntarios fue de 28 ± 5 años, la estatura de 1.69 ± 0.05 m y sus pesos oscilaban entre 66 y 85 kg. Esta homogeneidad en sus características físicas permitió controlar estos factores como fuentes de variabilidad durante el estudio.

Tabla 5.11 Características físicas de los voluntarios participantes.

Voluntario no.	Sexo	Edad (años)	Estatura (m)	Peso (kg.)
1	M	26	1.67	66
2	M	28	1.73	75
3	M	37	1.62	66
4	M	26	1.62	85
5	M	20	1.72	82
6	M	25	1.68	67
7	M	36	1.64	75
8	M	31	1.70	82
9	M	26	1.70	68
10	M	32	1.72	74
11	M	25	1.65	71
12	M	26	1.79	72

Los valores promedio de concentración plasmática para las dos formulaciones se resumen en la **Tabla 5.12** y se muestran en la **Fig. 5.5**. Es importante mencionar que en esta etapa del estudio no se cuantificó la desmetilomipramina ya que, por haberse administrado una dosis única, sus concentraciones se encontraban por abajo de la concentración mínima cuantificable.

En general, los niveles de clomipramina en los voluntarios después de la administración de ambas formas farmacéuticas, muestra una variabilidad importante. El coeficiente de variación promedio de todos los niveles de concentración a los diferentes tiempos de



muestreo fue de 29.07 ± 10.3 para la forma farmacéutica de liberación convencional y de 29.57 ± 5.66 para la de liberación sostenida. Como se puede observar, no existe una diferencia evidente entre las variabilidades que presentan los niveles plasmáticos en ambas formulaciones.

Tabla 5.12 Concentraciones promedio obtenidas en el horario de muestreo programado para los 12 voluntarios sanos en los dos periodos clínicos (Concentración promedio \pm d.e.)

Tiempo (h)	Concentración ng/mL	
	Tratamiento A (<i>Innovador</i>)	Tratamiento B (<i>Prueba</i>)
0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
1	14.84 \pm 4.20	9.00 \pm 1.98 ^b
2	30.86 \pm 7.60	13.48 \pm 3.70
3	43.46 \pm 12.18	18.63 \pm 5.57
4	54.33 \pm 13.95	23.45 \pm 7.46
5	61.28 \pm 9.35	28.52 \pm 8.45
8	40.95 \pm 8.29	31.83 \pm 8.26
12	27.43 \pm 6.22	30.69 \pm 8.11
24	14.25 \pm 5.11	21.99 \pm 5.94
48	7.57 \pm 4.08	10.60 \pm 4.62
72	6.50 \pm 2.33	8.85 \pm 3.02
96	5.03 \pm 1.83 ^a	6.25 \pm 1.60 ^c

Promedio de: ^a 5 voluntarios, ^b 8 voluntarios, ^c 6 voluntarios.

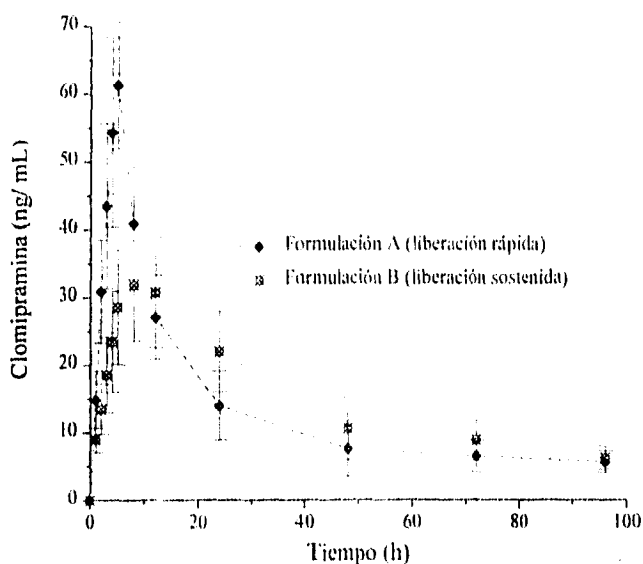


Fig. 5.5 Gráfica promedio (\pm d.e.) de los niveles plasmáticos de la clomipramina en los doce voluntarios sanos. *Formulación A* (innovador) y *formulación B* (prueba)

Si se comparan los perfiles de concentración plasmática de la clomipramina obtenidos después de la administración de ambas formulaciones (Fig. 5.5), se podrá observar que el obtenido a partir de la *formulación B*, aparentemente presenta un patrón de liberación sostenida. En este caso, la liberación del fármaco es más lenta y prolongada que la que se observa en la formulación de liberación rápida.

Una de los objetivos de una forma farmacéutica de liberación sostenida, es prolongar la acción farmacológica del fármaco y con ello permitir la simplificación del régimen terapéutico por la reducción del número de dosis diarias que se requieren. Así, para evaluar una formulación de liberación sostenida, es necesario contar con algunas herramientas indicativas de la duración de la acción del fármaco.



Diferentes investigadores han propuestos parámetros que pueden ser usados para caracterizar a las formas farmacéuticas de liberación sostenida. Meier⁹⁶ ha definido un criterio numérico (*cociente de retardo*, R_{Δ}) para la evaluación *in vivo* de una formulación de liberación sostenida y sugiere el uso de esta relación para establecer el patrón de liberación del fármaco (si es de liberación sostenida o no).

El criterio farmacocinético que plantea Meier, se basa en la experiencia general de que muchos fármacos muestran una acción terapéutica cuya duración concuerda con la amplitud de la curva de concentración plasmática vs tiempo. Se sabe que en la vecindad de la $C_{p_{max}}$, frecuentemente se observa el efecto terapéutico y que la duración de este efecto concuerda con la "amplitud" de este máximo. La amplitud de la $C_{p_{max}}$ se puede definir como la mitad de la concentración plasmática máxima ($1/2 C_{p_{max}}$). El intervalo de tiempo durante el cual la concentración plasmática excede este nivel, se llama *valor medio de duración* (half-value duration, HVD, Fig. 5.6).

El *cociente de retardo* calculado como,

$$R_{\Delta} = \frac{HVD_{(retard)}}{HVD_{(fast)}}$$

donde

R_{Δ} = cociente de retardo

$HVD_{(retard)}$ = *valor medio de duración* en la forma farmacéutica de liberación sostenida

$HVD_{(fast)}$ = *valor medio de duración* en la forma farmacéutica de liberación rápida

permite obtener el factor por el cual el *valor medio de duración* de la formulación de liberación sostenida, se extiende en relación a la formulación de liberación normal. Si este es igual a uno, la forma farmacéutica no es de liberación sostenida; si es de 1.5, la forma farmacéutica retarda débilmente la liberación del fármaco y si es de 3 o mayor la liberación del fármaco se retarda fuertemente y existe un *mantenimiento* importante de la dosis. Este cociente es *independiente de la dosis* y se aplica si el producto de liberación controlada presenta una constante de liberación del fármaco de cero o primer orden.

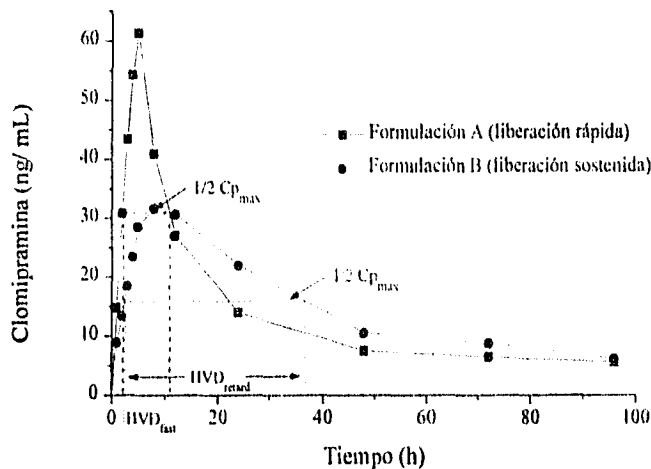


Fig. 5.6 Determinación del *cociente de retardo* a partir de la gráfica promedio de los niveles plasmáticos de la clomipramina en los doce voluntarios sanos. *Formulación A* (innovador) y *formulación B* (prueba)

Se calculó el *cociente de retardo* para la formulación bajo estudio y se obtuvo un valor de 4.0 (Fig. 5.6), con lo cual se establece que la *formulación B* (prueba) permite una liberación de la dosis mucho más lenta que la que se observa en la formulación de liberación rápida. Tomando en consideración las demás observaciones en cuanto al perfil plasmático de esta formulación, se puede establecer que esta forma farmacéutica presenta un patrón de liberación sostenida.

Los resultados promedio de los parámetros farmacocinéticos obtenidos se enlistan en la **Tabla 5.13**. Estos permitieron analizar la farmacocinética de la clomipramina en sujetos mexicanos.

Para la forma farmacéutica convencional, el tiempo de vida media del fármaco fue de 22.4 ± 6.8 h, lo cual no representa una diferencia significativa en relación a los valores



reportados por Evans y cols.² (20.4 ± 6.1 h) y Müller y cols.³ (23.5 ± 1.9 h), cuyos estudios para obtener los parámetros farmacocinéticos de la clomipramina son los más completos y reportados en base a una determinación sistemática y controlada, como ya se refirió en la sección 2.5.5.

El $C_{p_{max}}$ obtenido fue aproximadamente un 25% más grande que aquellos reportados por Evans y Müller (31.3 ± 1.5 y 27.6 ± 9.3 , respectivamente, **Tabla 2.5**). Esta misma tendencia se observa en los valores de ABC, los cuales también aumentaron en igual proporción.^{2,3} Cabe señalar que aún cuando estos autores reporten los resultados más completos, existen otros trabajos que coinciden con los obtenidos en el presente estudio.⁹⁷⁻⁹⁸

Tabla 5.13 Parámetros farmacocinéticos de la clomipramina en voluntarios sanos.

Parámetro farmacocinético	Formulación A (Innovador)	Formulación B (Prueba)
ABC_0^1 (ng·h/mL)	1151.19 ± 156.46	1059.10 ± 223.19
ABC_0^2 (ng·h/mL)	1375.38 ± 171.78	1285.26 ± 202.77
$C_{p_{max}}$ (ng/mL)	63.37 ± 12.71	32.55 ± 8.10
t_{max} (h)	4.83 ± 0.39	9.00 ± 1.81
β (h ⁻¹)	0.0306 ± 0.0084	0.0260 ± 0.0073
TMR (h)	47.21 ± 5.94	55.63 ± 7.33

El t_{max} se puede considerar como igual al determinado en otras poblaciones.⁹⁸ Evans y Müller reportan valores muy parecidos (4 y 5 h), los cuales corresponden con el calculado en el estudio.



Los parámetros farmacocinéticos calculados para la clomipramina después de la administración de la forma farmacéutica de liberación sostenida, son los *primeros* reportados en la literatura, siendo algunos de estos distintos a aquellos reportados para la forma farmacéutica de liberación convencional. En este caso el tiempo de vida media fue de 26.8 ± 6.3 h, el $C_{p_{max}}$ fue menor casi en un 50% en relación al observado cuando se administró la formulación de liberación rápida y el t_{max} aumento en aproximadamente 4 h. El valor de ABC no se vio modificado significativamente.

Es importante mencionar que no se estudió el efecto de los alimentos en la biodisponibilidad de la clomipramina debido a que en la literatura se reporta que estos no influyen significativamente en la biodisponibilidad.^{19,52}

Las constantes de velocidad de eliminación obtenidas después de la administración de la forma farmacéutica convencional y de la administración de la formulación de liberación sostenida, son muy semejantes. Esto se corroboró con el análisis estadístico y como se observa en la **Tabla 5.14**, no existen diferencia estadísticamente significativa entre los valores de β calculados.

Tabla 5.14 Análisis estadístico aplicado a la constante de eliminación (β). Datos sin transformar.

Fuente de variación	SS	g.l.	F _{cal}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	4×10^{-7}	1	0.0167	0.8997
sujeto (secuencia)	2.1×10^{-1}	10	0.9250	0.5479
Intra-sujeto				
tratamiento	0	1	0.1189	0.7374
periodo	2.7×10^{-6}	1	0.0000	0.9963

$$F_{\text{tablas}}(0.05, 10, 10) = 2.9782$$

$$F_{\text{tablas}}(0.05, 1, 10) = 4.9646$$



El tiempo medio de residencia (TMR), un parámetro obtenido por análisis de momentos, es una función de la biodisponibilidad. Este presenta el mismo grado de potencia (es decir, baja variabilidad in-trasfeto) como el $C_{p_{max}}$ y el AIBC, sin tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y las formas farmacéuticas.

Como se puede observar en la Tabla 5.15, existen diferencias estadísticamente significativas entre el valor promedio obtenido para el TMR en la forma farmacéutica de liberación normal y aquel obtenido para la forma farmacéutica de liberación sostenida. El TMR de este último producto es mayor, lo cual indica que el fármaco se mantiene más tiempo en el organismo con respecto al tiempo que permanece cuando se administra con la otra forma farmacéutica. El TMR puede ser empleado en una forma comparativa para evaluar el comportamiento *in vivo* de la forma farmacéutica de liberación sostenida. Entre mayor sea el TMR, más sostenida o prolongada es la absorción del fármaco asumiendo que la constante de eliminación no se ve alterada.⁹⁹

Tabla 5.15 Análisis estadístico aplicado al Tiempo Medio de Residencia (TMR). Datos sin transformar.

Fuente de variación	SS	g.l.	F _{cal}	Prob
Inter-sujeto				
acarreamientos	10.4429	1	1.8967	0.6430
residuales	78.0575	10	3.0406	0.0046
Intra-sujeto				
tratamiento	61.5754	1	23.9854	0.0026
período	2.0761	1	1.3247	0.1843

$$F_{0.05, 1, 23}(0.01, 10, 10) = 2.9782$$

$$F_{0.05, 1, 23}(0.05, 1, 10) = 4.9646$$

Finalmente, se observa que la forma farmacéutica de liberación sostenida es confiable ya que asegura una liberación gradual de la dosis del fármaco.



5.4.2 Consideraciones previas al análisis de varianza

Previo al análisis de varianza se tomaron en cuenta algunas consideraciones: i) que los efectos del tratamiento eran aditivos y ii) que los errores experimentales se distribuían normal e independientemente con una varianza con error homogéneo. Nunca se puede estar seguro de que estas consideraciones se cumplen, y a veces se sospecha que algunas son falsas. Estos errores afectan tanto al nivel de significancia como a la potencia de las pruebas estadísticas.

Considerando que el determinar si los datos primarios (ABC) siguen una distribución normal es un paso muy importante para una estimación correcta de la biodisponibilidad en los productos, se evaluó la normalidad de los datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk.¹⁰⁰

Para que los resultados obtenidos del análisis de varianza sean confiables, no sólo se tiene que evaluar la normalidad; la independencia y homocedasticidad de los datos también son importantes. La primera se evaluó con la prueba de Durbin-Watson¹⁰¹ y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett.¹⁰² En la Tabla 5.16 se muestran algunos de los resultados obtenidos.

Tabla 5.16 Resultados de la evaluación de la normalidad, independencia y homocedasticidad a partir de los valores de ABC_0^1 para las formulaciones A y B.

Prueba	Valor estimado	Valor de contraste	Se comprueba:
Durbin-Watson	2.246	1.130	Independencia
Shapiro-Wilk	0.982	0.963	Normalidad
Bartlett	9.532	12.590	Homocedasticidad

5.4.3 Diseño estadístico

El diseño experimental empleado para la realización del estudio fue el cruzado de 2 X 2, el cual es generalmente recomendado por la FDA por su precisión y simplicidad en el desarrollo de estudios clínicos.¹⁰³ El modelo estadístico utilizado¹⁰⁴ es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(i,k)} + C_{(j,l,k)} + e_{ijk}$$



donde:

- Y_{ijk} = respuesta (i.e. ABC) del i -ésimo sujeto en la k -ésima secuencia del j -ésimo periodo
 μ = media poblacional
 S_{ik} = efecto aleatorio del i -ésimo sujeto en la k -ésima secuencia, donde $i = 1, 2, \dots, n_j$ y $k = 1, 2$
 P_j = efecto fijo del j -ésimo periodo, donde $j = 1, 2$
 $F_{(j,k)}$ = es el efecto fijo para la formulación en la secuencia k -ésima administrada en el periodo j -ésimo
 $C_{(j-1,k)}$ = efecto residual de acarreamiento en la k -ésima secuencia administrada en el $(j - 1)$ ésimo periodo
 e_{ijk} = error aleatorio (dentro del sujeto) en la observación Y_{ijk}

5.4.4 Análisis estadístico para demostrar la biodisponibilidad relativa de la formulación de liberación sostenida (*Biopak*TM)

Para la comparación de la biodisponibilidad entre formulaciones es deseable estimar y separar los efectos debidos a la secuencia o al periodo, de los de la formulación. En la práctica, para un estudio de biodisponibilidad / bioequivalencia, es usual asumir que no hay efecto de periodo y que no existe efecto por acarreamiento. Esto debido a que un estudio bien conducido puede eliminar los posibles efectos debidos al periodo y a que el periodo de lavado fue lo suficientemente largo para asegurar que no existen efectos residuales del periodo de dosificación anterior.

En muchos casos, sin embargo, los efectos por periodo o acarreamiento pueden todavía estar presentes. La presencia de efectos por acarreamiento puede incrementar la complejidad del análisis estadístico para el aseguramiento de la biodisponibilidad relativa entre las formulaciones. Así, es fundamental realizar una prueba estadística (*t-student* para dos muestras) con el fin de determinar su presencia o no, antes de efectuar la comparación de la biodisponibilidad entre las formulaciones. Este análisis se muestra en la Tabla 5.17 en la que se observa que los valores obtenidos para la t_{ca} son menores que



los de la t_{tabla} , lo que indica que en el estudio no hay efecto de: i) acarreamiento y ii) período.

Tabla 5.17 Inferencia estadística para efectos fijos

Efecto	Intervalo	t_{cal}	p
Acarreamiento	(-458.11, 550.38)	0.2038	NS
Fármaco (directo)	(-422.12, 37.48)	-1.8647	NS
Período	(-94.26, 365.34)	1.3141	NS

$$t_{\text{tabla}}(0.025, 10) = 2.2281$$

En los estudios de biodisponibilidad se analiza si existen diferencias en las características de absorción de los diferentes productos, pero también es conveniente o necesario evidenciar otras fuentes de variación, en especial la de los períodos y las variaciones intra e inter-sujeto. En estos casos, el análisis de varianza (ANOVA) permite identificar la variación y estimar la varianza de todos los datos sin atención a la causa.

Para comprobar la biodisponibilidad relativa entre los productos evaluados se compararon algunos de los parámetros farmacocinéticos obtenidos. El tratamiento estadístico de estos parámetros se realizó utilizando el paquete BIOPAK™, tanto para datos crudos, como para su transformación logarítmica. Los resultados se muestran de la **Tabla 5.18** a la **5.23**.

Tabla 5.18 Análisis estadístico aplicado al parámetro farmacocinético de ABC_0 , para evaluar la biodisponibilidad relativa. Datos sin transformar.

Fuente de variación	SS	g.l.	F_{cal}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	19199	1	0.4166	0.5331
sujeto (secuencia)	2239384	10	4.8596	0.0099
Intra-sujeto				
tratamiento	45540	1	0.9883	0.3436
período	5426	1	0.1178	0.7386



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
I.C. 80%	(86.9560, 102.0851)	(89.5035, 110.4965)
I.C. 90%	(84.5279, 104.5132)	(86.8280, 113.1720)
I.C. 95%	(82.2360, 106.8051)	(84.4149, 115.5851)

Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	0.0120
Potencia	0.9042

Tahla 5.19 Análisis estadístico aplicado al parámetro farmacocinético de ABC_0^{σ} para evaluar la biodisponibilidad relativa. Datos sin transformar.

Fuente de variación	SS	g.l.	F _{cal}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	29044	1	0.3982	0.5422
sujeto (secuencia)	3106135	10	4.2589	0.0158
Intra-sujeto				
tratamiento	17578	1	0.2410	0.6341
periodo	9538	1	0.1308	0.7251

$$F_{\text{tablas}}(0.05, 10, 10) = 2.9782$$

$$F_{\text{tablas}}(0.05, 1, 10) = 4.9646$$

Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
I.C. 80%	(88.9640, 105.2206)	(90.9999, 109.0001)
I.C. 90%	(86.3549, 107.8297)	(88.2660, 111.7340)
I.C. 95%	(83.8921, 110.2925)	(85.7352, 114.2648)

Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	0.0066
Potencia	0.8613



Como se puede observar en las Tablas 5.18 y 5.19, la F_{tablas} es menor que la F_{cat} en el efecto estimado para los sujetos (secuencia). Esta estimación indica que existe variabilidad inter-individual que se refleja en los datos analizados. Un factor que puede explicar este grado de variabilidad, es el metabolismo del primer paso.

Tabla 5.20 Análisis estadístico aplicado al parámetro farmacocinético de $C_{p_{max}}$ para evaluar la biodisponibilidad relativa. Datos sin transformar.

Fuente de variación	SS	g.l.	F_{cat}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	0.0699	1	0.0028	0.9589
sujeto (secuencia)	1653	10	6.6196	0.0031
Intra-sujeto				
tratamiento	5699	1	228.122	0.0001
periodo	12.7487	1	0.5102	0.4914

Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
I.C. 80%	(46.9420, 55.7810)	(48.5307, 151.4693)
I.C. 90%	(45.5234, 57.1996)	(46.9427, 153.0573)
I.C. 95%	(44.1843, 58.5387)	(45.5248, 154.4752)

Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	1.0000
Potencia	0.9987

Como se sabe, frecuentemente los parámetros tales como el ABC, son transformados a sus derivados logarítmicos. La razón usualmente dada es la aparente asimetría de los datos. Raramente el grupo de datos de biodisponibilidad es lo suficientemente grande como para aplicar confiablemente un análisis estadístico que determine su distribución. En este caso se recomienda la transformación de los parámetros farmacocinéticos y se asume que la distribución normal de los datos transformados da un intervalo de confianza



más exacto para la determinación de μ_p / μ_r . Este modelo de transformación de los datos (modelo aditivo) es aceptado ampliamente por la FDA.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶

Tabla 5.21 Análisis estadístico aplicado al parámetro farmacocinético de $\log E \cdot ABC_0^L$ para evaluar la biodisponibilidad relativa.

Fuente de variación	SS	g.l.	F _{crit}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	0.0090	1	0.5126	0.4904
sujeto (secuencia)	1.0560	10	6.0154	0.0045
Intra-sujeto				
tratamiento	0.0316	1	1.7993	0.2095
periodo	0.0003	1	0.0181	0.8957

Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
I.C. 80%	(86.3480, 100.1678)	(88.6125, 111.3875)
I.C. 90%	(84.3149, 102.5832)	(86.2865, 113.7135)
I.C. 95%	(82.4397, 104.9166)	(84.2508, 115.7492)

Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	0.0092
Potencia	0.9565

Tabla 5.22 Análisis estadístico aplicado al parámetro farmacocinético de $\log E \cdot ABC_0^Z$ para evaluar la biodisponibilidad relativa.

Fuente de variación	SS	g.l.	F _{crit}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	0.0094	1	0.5001	0.4956
sujeto (secuencia)	0.9936	10	5.2653	0.0074
Intra-sujeto				
tratamiento	0.0155	1	0.8240	0.3854
periodo	0.0005	1	0.0285	0.8693



Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
I.C. 80%	(87.9967, 102.9401)	(90.1882, 109.8118)
I.C. 90%	(85.8494, 105.2074)	(87.7595, 112.2405)
I.C. 95%	(83.8706, 107.6895)	(85.6085, 114.3915)

Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	0.0049
Potencia	0.9447

Tabla 5.23 Análisis estadístico aplicado al parámetro farmacocinético de $\log E C_{p_{max}}$ para evaluar la biodisponibilidad relativa.

Fuente de variación	SS	g.l.	F _{cal}	Prob
Inter-sujeto				
secuencia	2.7×10^{-5}	1	0.0017	0.9675
sujeto (secuencia)	0.9086	10	5.8161	0.0051
Intra-sujeto				
tratamiento	2.8031	1	179.4340	0.0001
periodo	0.0054	1	0.3467	0.5690

Intervalos de Confianza

	Clásico	Westlake
I.C. 80%	(47.0698, 54.1462)	(48.2697, 151.7303)
I.C. 90%	(46.0236, 55.3771)	(47.0703, 152.9297)
I.C. 95%	(45.0574, 56.5646)	(46.0246, 153.9754)

Prueba de Anderson Hauck

A.H. p-value	1.0000
Potencia	0.9712



En la **Tabla 5.24** se presentan los criterios internacionales para la estimación de la biodisponibilidad relativa de dos productos. Dado que era de esperarse que los valores de $C_{p_{max}}$ y t_{max} fueran diferentes entre ambas formulaciones, se utilizó solamente el ABC como criterio.

Tabla 5.24 Requisitos estadísticos de la Comunidad Europea (C.E.), de los Estados Unidos de Norteamérica (U.S) y de Canadá (CAN) para la aceptación de la biodisponibilidad relativa.¹⁰⁵

Variable	C.E.	U.S.	CAN
ABC	Log 90% I.C. 80-125	Datos crudos I.C. 80-120%	Log 90% I.C. 80-125%
$C_{p_{max}}$	Log 90% I.C. 70-143%	Como ABC	Media geométrica * 80-125%
t_{max}	De acuerdo al fármaco **	Como ABC	No se aplica

* Con un intervalo de confianza de 90% bajo la consideración de armonizar con la Comunidad Europea.

** El criterio para t_{max} no es aplicado rigidamente.

El $C_{p_{max}}$ y t_{max} fueron significativamente diferentes ($p < 0.1$), pero los efectos por secuencia y periodo no fueron significativos. Esta disminución en el $C_{p_{max}}$ permite obtener concentraciones dentro del intervalo terapéutico por un periodo de tiempo más prolongado (ver la sección 5.5 para la confirmación de esta observación), y por abajo de los niveles tóxicos que podría presentar una forma farmacéutica de liberación inmediata (ver comentarios sobre reacciones adversas, 5.4.4.1). En cuanto al retraso en el t_{max} éste es consecuencia de la propia liberación sostenida o más prolongada del fármaco.

Los resultados obtenidos apoyarían la recomendación del uso de la forma farmacéutica de liberación sostenida, considerando que se maximiza la relación beneficio/ riesgo con la simplificación en el régimen terapéutico, el incremento en la eficacia terapéutica, reduciendo los efectos adversos y proporcionando mayor comodidad al paciente.



La fracción biodisponible de 92 y 93.45 % del fármaco (considerando ABC_0^1 y ABC_0^2 , respectivamente) cumple con la normatividad. De los resultados mostrados en las Tablas 5.18 y 5.19 correspondientes a los datos sin transformar de ABC_0^1 y ABC_0^2 respectivamente, los intervalos clásicos y de Westlake se encuentran en ambos casos dentro de los límites marcados de 80 a 120. Para la prueba de Anderson-Hauck donde se establece una $p < 0.05$ para la aceptación de la biodisponibilidad relativa, los valores también se encuentran dentro de especificaciones. Según estos resultados se puede establecer una decisión de igualdad en las biodisponibilidades de las formas farmacéuticas probadas con base en los criterios mostrados en la Tabla 5.25.

Tabla 5.25 Estimación puntual y límites de confianza de 90% para el cociente de promedios de ABC.¹⁰⁷

Parámetro	Estimación puntual (ejemplo)	I.C. de 90 %	Decisión
ABC	0.92	0.80 - 1.25	Productos igualmente biodisponibles
ABC	0.64	$\leq 0.60 - 0.79$	Productos con biodisponibilidad diferente
ABC	1.30	$\geq 1.25 - 1.40$	Productos con biodisponibilidad diferente
ABC	0.98	0.60 - 1.25	No se puede tomar una decisión (Falta suficiente # de participantes y/o falta precisión experimental)

Los valores obtenidos con transformación logarítmica se presentan en las Tablas 5.21 y 5.22 donde se observa que para el intervalo de confianza al 90% los dos parámetros farmacocinéticos se encuentran dentro de límites y cumplen con la prueba de Anderson-Hauck.

5.4.4 Reacciones adversas

En la Tabla 5.26 se puede observar la incidencia de los efectos adversos presentada en los voluntarios. La tabla muestra el número de voluntarios que presentaron el efecto señalado con la respectiva medicación.



Tabla 5.26 Incidencia de efectos indeseables (%) durante el tratamiento con clomipramina en el estudio clínico en voluntarios sanos.

	<i>Formulación A</i>	<i>Formulación B</i>
<i>Sistema Nervioso</i>		
Somnolencia	100	100
Bostezos	67	33
<i>Sistema Digestivo</i>		
Boca seca	25	0
Diarrea	17	0
Nausea	42	8
<i>Cuerpo como un todo</i>		
Fatiga	33	0

La mayoría de los efectos adversos se presentaron después de la administración de la clomipramina en su forma farmacéutica de liberación rápida. Cuando se administró la forma farmacéutica de liberación sostenida estos disminuyeron. Sólo la somnolencia permaneció, siendo evidente y molesta para los voluntarios.

La mayoría de los efectos se presentaron a partir de la primera hora de haberse administrado el fármaco. Las náuseas, diarrea y boca seca duraron las 4 primeras horas. Una vez que los voluntarios tomaron el desayuno, estas reacciones adversas desaparecieron por completo. La somnolencia y fatiga se mantuvieron durante el primer día de observación y finalmente, los bostezos desaparecieron hasta el tercer día de iniciado el estudio.

5.5 ETAPA II. Estudio en pacientes con cuadro de depresión, dosis múltiple

La evaluación apropiada de una forma farmacéutica de liberación controlada no es posible con la administración de una dosis única ya que estas formas farmacéuticas se administran en dosis múltiples.⁵³

En este tipo de formulaciones es recomendable efectuar estudios en el estado estacionario para demostrar su equivalencia en relación a un estándar de referencia de liberación inmediata. Este tipo de estudio también es útil para establecer si los niveles se encuentran dentro del intervalo terapéutico durante el periodo de administración, así como para evaluar el porcentaje de fluctuación de estos.

Los pacientes que participaron en el estudio cumplieron con los criterios de inclusión fijados en el protocolo de trabajo (4.4.9). Algunas de las características físicas de estos se muestran en la **Tabla 5.27** en la que se observa que la edad promedio de los pacientes fue de 35 ± 9 años y que sus pesos oscilaban de 62 a 75 kg. Esta homogeneidad en sus características físicas nos permitió controlar a estos factores durante el estudio. El grado de depresión que presentaron (escalamiento basado en sus síntomas y la severidad con que se presentaron estos), tampoco presentó una diferencia significativa entre los pacientes.

Tabla 5.27 Características de los pacientes participantes en el estudio.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Peso (kg.)	Grado de depresión (Escala Hamilton)
1	F	25	75	40
2	M	47	63	39
3	F	26	62	41
4	M	32	66	35
5	F	43	74	41
6	M	38	59	36



Los valores promedio de concentración plasmática de la clomipramina después de la administración de las dos formulaciones se resumen en la **Tabla 5.28** y se muestran en las **Fig. 5.7** y **5.8**.

Los niveles plasmáticos de clomipramina y desmetilclomipramina obtenidos al estado estacionario (C^{ec}) después de la administración de la forma farmacéutica convencional, son semejantes a aquellos obtenidos por otros autores^{32, 36, 42} y que para mayor detalle pueden consultarse en la sección 2.5.6. Estos parámetros son los primeros que se reportan a partir de un estudio clínico para la forma farmacéutica de liberación sostenida. La relación de DCMI/ CMI en promedio fue de 2.06, lo cual es congruente con otros valores reportados en la literatura (**Tabla 2.6**). La formulación de liberación sostenida presentó una relación promedio de 2.41, lo cual estadísticamente no muestra una diferencia significativa entre estos valores ($p > 0.1$).

Tabla 5.28 Valores promedio de concentraciones plasmáticas obtenidas de clomipramina a los diferentes tiempos de muestreo para los 6 pacientes con cuadro de depresión en los dos periodos clínicos (Concentración promedio \pm d.e.)

Tiempo (h)	Formulación A (Innovador)	Tiempo (h)	Formulación B (Prueba)
0	132.04 \pm 52.82	0	78.42 \pm 26.50
1	143.06 \pm 58.67	2	83.73 \pm 27.60
2	151.49 \pm 59.15	4	91.60 \pm 29.58
4	159.78 \pm 59.85	8	95.16 \pm 30.58
6	158.62 \pm 62.95	12	95.57 \pm 32.21
8	139.22 \pm 56.58	24	77.62 \pm 26.59

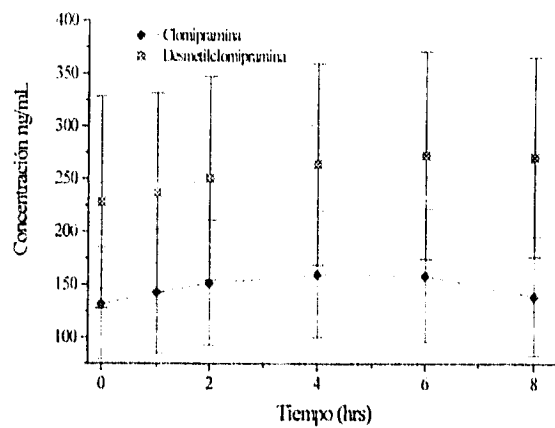


Fig. 5.7 Valores plasmáticos promedio (\pm d.e.) de clomipramina y desmetileclomipramina en seis pacientes con cuadro de depresión. *Formulación A* (liberación rápida, innovador).

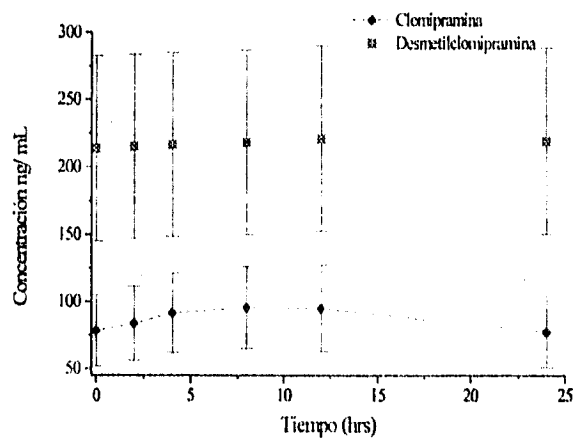


Fig. 5.8 Valores plasmáticos promedio (\pm d.e.) de clomipramina y desmetileclomipramina en seis pacientes con cuadro de depresión. *Formulación B* (liberación sostenida, prueba).



De los resultados de la Tabla 5.28, en general se observa que la forma farmacéutica de liberación controlada genera menos variabilidad en los niveles plasmáticos en relación a la formulación de liberación convencional.

Cuando se administra la *formulación A*, la dosis se repite a intervalos que son menores que la vida media de eliminación de la clomipramina y esta tiende a acumularse en el organismo. La situación que representa la administración de la *formulación B* es distinta: el fármaco se administra en dosis repetidas y a intervalos aproximadamente iguales a la vida media de eliminación de este, por lo que la concentración plasmática de la clomipramina fluctúa pero no presenta la misma acumulación.

El índice de acumulación (R_a) se define como,

$$R_a = \frac{1.44 t_{1/2}}{\tau}$$

Este índice permite conocer la extensión de la acumulación de un fármaco conforme a un régimen propuesto. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el estudio en dosis única, tenemos que la *formulación A* origina un índice de acumulación para la clomipramina de 4.12, mientras que la *formulación B* solo de 1.49, con lo que se esperaría una mayor acumulación de clomipramina cuando se administra la forma farmacéutica de liberación rápida.

Debido a que el metabolito también presenta actividad farmacológica, en estudios recientes se analizan los resultados obtenidos sumando los niveles plasmáticos de clomipramina y desmetilclomipramina,^{36, 50, 108}. En base a ello se decidió realizar el análisis de los resultados considerando la concentración de fármaco *total* (clomipramina + desmetilclomipramina), cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.29 y se muestran en la Fig. 5.9.



Tabla 5.29 Niveles promedio de fármaco *total* obtenidos a los diferentes tiempos de muestreo en estado estacionario para los 6 pacientes con cuadro de depresión en los dos periodos clínicos (Concentración promedio \pm d.e.)

Tiempo (h)	Formulación A (Innovador)	Tiempo (h)	Formulación B (Prueba)
0	360.15 \pm 148.30	0	304.93 \pm 71.41
1	380.19 \pm 154.87	2	312.08 \pm 72.47
2	402.10 \pm 159.58	4	321.89 \pm 74.76
4	423.92 \pm 164.69	8	327.26 \pm 75.62
6	431.36 \pm 165.90	12	330.18 \pm 77.73
8	410.37 \pm 156.30	24	310.63 \pm 71.71

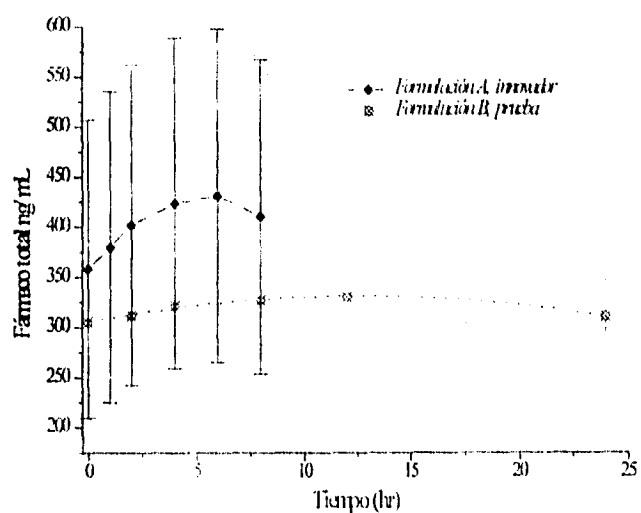


Fig. 5.9 Valores plasmáticos promedio (\pm d.e.) de fármaco *total* en seis pacientes con cuadro de depresión.



En la Tabla 5.30 se observa que en promedio la forma farmacéutica de liberación sostenida permitió mantener la concentración del fármaco por abajo del nivel al cual se observan reacciones adversas severas (450 ng/mL) y arriba del nivel terapéutico para el tratamiento de la depresión (150 ng/mL) y de los síndromes obsesivo compulsivos (100 ng/mL).

El tiempo promedio de permanencia del fármaco cuando se administra esta forma farmacéutica, se encuentra dentro de los tiempos de administración marcados por el régimen de dosificación (24 h).

Tabla 5.30 Resumen de los principales parámetros farmacocinéticos de la clomipramina y del fármaco total calculados durante el estudio clínico en pacientes con cuadro de depresión.

Parámetro farmacocinético	Formulación A (Innovador)		Formulación B (Prueba)	
	CMI	Fármaco total	CMI	Fármaco total
ABC_0^I (ng.h/mL)	1212.3 ± 474.9	3250.0 ± 1252.3	2399.6 ± 797.7	7887.6 ± 2109.6
Cp_{in}^{ce} (ng/mL)	151.5 ± 59.4	406.2 ± 156.5	100.0 ± 33.2	328.6 ± 87.9
Cp_{max}^{ce} (ng/mL)	162.6 ± 61.1	433.3 ± 164.1	101.5 ± 26.9	330.9 ± 77.2
Cp_{min}^{ce} (ng/mL)	135.6 ± 54.64	358.1 ± 148.3	82.6 ± 21.8	304.9 ± 71.4

$$Cp_{av}^{ce} = ABC_0^I / \tau$$

Los criterios más importante para la evaluación de una forma farmacéutica de liberación sostenida son: i) que la cantidad de fármaco que será absorbida lo haga de una forma reproducible y ii) que la relación Cp_{max} y Cp_{min} al estado estacionario no sea mayor, o idealmente, menor que aquella obtenida por la administración continua de la forma farmacéutica convencional.^{57, 109}

En base a estos criterios resulta muy importante que la formulación de liberación sostenida muestre menos fluctuaciones y que tenga una biodisponibilidad de al menos el 80% relativa a la formulación convencional.



En la Tabla 5.31 se presentan los parámetros empleados para la evaluación de la biodisponibilidad relativa del producto de prueba y de referencia.

Tabla 5.31 Parámetros aplicados para evaluar la biodisponibilidad relativa de las dos formulaciones en el estado estacionario, fármaco total.

Parámetro	Valor estimado		F	Nivel de significancia
	Formulación A	Formulación B		
$Cp_{max}^{ee} / Cp_{min}^{ee}$	1.23 ± 0.11	1.08 ± 0.02	9.72	S (p < 0.1)
% de Fluctuación	19.52 ± 7.82	7.97 ± 0.73	12.96	S (p < 0.1)
Fracción biodisponible:	0.8478 ± 0.1443		-	-
$\frac{ABC_0^{24}}{ABC_0^8} \times \frac{Dosis_{fast}}{Dosis_{retard}}$				

* % de fluctuación = $\{(Cp_{max}^{ee} - Cp_{min}^{ee}) / Cp_{av}^{ee}\} \times 100$

La relación de Cp_{max}^{ee} y Cp_{min}^{ee} , así como el % de fluctuación estimado para ambas formulaciones, presentó diferencias estadísticamente significativas. La diferencia mayor se observó en el % de fluctuación donde, conforme con las especificaciones, la forma farmacéutica de liberación sostenida presenta un porcentaje más reducido de variación en comparación con la forma farmacéutica de liberación rápida. Algunos investigadores han reportado fluctuaciones importantes en los niveles de clomipramina después de la administración oral de la *formulación A*,¹¹⁰ lo cual repercute en la duración del tratamiento y en el grado de mejoría del paciente.

Los anteriores señalamientos muestran que en general, la forma farmacéutica de liberación sostenida permitió mantener niveles plasmáticos más constantes y que en promedio se mantienen los niveles terapéuticos. La fracción biodisponible del fármaco (0.8478) también se encuentra dentro de las especificaciones establecidas.

Con los resultados obtenidos al estado estacionario se puede señalar que las formas farmacéuticas estudiadas son igualmente biodisponibles y por lo tanto, pueden ser intercambiables, sin embargo, es necesario hacer algunos comentarios adicionales.



Analizando los estudios que comparan las concentraciones plasmáticas de clomipramina y desmetilclomipramina con su eficacia terapéutica se puede establecer que la alta variabilidad interindividual es uno de los principales problemas relacionados con el empleo exitoso de este fármaco. Esto genera la búsqueda de métodos que minimicen esta variabilidad, siendo uno de estos el monitoreo de la concentración del fármaco.

El monitoreo de la concentración plasmática de los antidepresivos tricíclicos es un tema muy controvertido. Algunas de las críticas a este respecto van relacionadas con la carencia de una relación clara entre la respuesta clínica y las concentraciones al estado estacionario. Esta razón es insuficiente para descartar esta aproximación, sobre todo cuando ya se ha demostrado ampliamente que a concentraciones plasmáticas muy bajas de clomipramina y de desmetilclomipramina no hay respuesta y que las concentraciones muy elevadas están frecuentemente asociadas a efectos secundarios severos.

Al analizar los resultados obtenidos individualmente, saldría a relucir esta variabilidad. Cuando al paciente 2 se le administró la *formulación B*, este mostró niveles de fármaco total subterapéuticos (< 150 ng/mL), mientras que el paciente 6 presentó niveles por arriba de los 400 ng/mL cuando se le administró la misma forma farmacéutica en igual dosis. Si se observa la **Tabla 5.27**, ambos pacientes cuentan con una edad, peso y grado de depresión similar. Considerando el tamaño de nuestra población, esta variabilidad debida a factores quizá metabólicos, representa un porcentaje importante que debe ser considerada en la optimización de la terapia.

Y para finalizar, independientemente de las razones comerciales que se pudiesen existir para el desarrollo de una forma farmacéutica de liberación sostenida que contenga clomipramina, es importante establecer las razones clínicas para que se aumente su uso. Algunas de estas ya se mencionaron durante la discusión de resultados, sin embargo, falta mencionar una que podría ser de las más importantes.

Una de los principales objetivos de este tipo de formulaciones, es prolongar la acción del fármaco y con esto permitir la simplificación del régimen terapéutico mediante la

reducción del número de dosis diarias que se requirieron. Con base en los resultados obtenidos en el estudio, se puede establecer que este objetivo se cumple: la administración de la forma farmacéutica de liberación sostenida en periodos de 24 h, permite mantener niveles plasmáticos terapéuticos en los pacientes.

La clomipramina es un fármaco recomendado en el tratamiento de padecimientos de depresión y en síndromes obsesivo-compulsivos. Los pacientes que requieren este tipo de medicación frecuentemente presentan reticencia a la terapia y no siguen de manera constante el régimen terapéutico.

Con el desarrollo de esta forma farmacéutica se puede mejorar el cumplimiento del régimen de dosificación por el paciente y otorgarle mayor comodidad. Considerando la gravedad de estos padecimientos y la importancia que tiene el ajustarse al régimen de dosificación recomendado por el médico, una simplificación en el régimen podría ser una justificación clínica para el desarrollo de esta formulación.

Adicionalmente se esperaba que los efectos adversos observados fueran menores, sin embargo, con las observaciones realizadas durante el estudio no es posible obtener un resultado concluyente, ya que no se encontró una diferencia clara en cuanto a los efectos adversos de pacientes. Sería recomendable realizar un seguimiento más controlado y prolongado de estos para determinar si realmente existe una diferencia debida a la formulación.



VI. Conclusiones



- Las formas farmacéuticas empleadas en el estudio de biodisponibilidad cumplieron satisfactoriamente con las normas de calidad farmacéutica oficialmente establecidas.
- El método de cuantificación por CLAR en plasma fue específico, lineal en un intervalo de concentración de 5 - 400 ng/ml, exacto, preciso y las muestras fueron estables bajo las condiciones de experimentación; por lo que se considera aplicable para la determinación de la clomipramina y desmetilclomipramina en muestras plasmáticas.
- En base a los resultados obtenidos al estado estacionario y a aquellos obtenidos en dosis única, se puede establecer que los dos productos estudiados (*formulación A, innovadora y formulación B, prueba*) presentan la misma biodisponibilidad.
- Los parámetros farmacocinéticos calculados para la clomipramina en los sujetos mexicanos, no muestran diferencias significativas con aquellos reportados para poblaciones europeas y/o asiáticas.
- El perfil de concentración plasmática de la clomipramina, obtenido después de la administración en dosis única de la *formulación de prueba (B)*, presenta un patrón de liberación sostenida. El *coeficiente de retardo (R_A)* confirma esta observación.

De los resultados obtenidos es importante resaltar algunas *observaciones y comentarios*:

- ⇒ La disminución en el $C_{p_{max}}$ por parte de la formulación de liberación sostenida, permite generar concentraciones del fármaco terapéuticas, por abajo de los niveles donde se comienzan a observar efectos adversos severos.
- ⇒ La forma farmacéutica de liberación sostenida es confiable en el aspecto de que asegura una liberación gradual de la dosis del fármaco, es decir, evita una liberación inmediata de esta lo cual podría generar un nivel plasmático tóxico importante.



- ⇒ La formulación de liberación sostenida muestra menos fluctuaciones en el mantenimiento de los niveles plasmáticos del fármaco, lo cual podría ser importante en la optimización de la terapia.
- ⇒ El tiempo promedio de permanencia del fármaco cuando se administra la forma farmacéutica de liberación sostenida, se encuentra dentro de los tiempos de administración marcados por el régimen de dosificación (24 h).
- ⇒ La gran variabilidad interindividual en la farmacocinética de este principio activo, asociado con su estrecho margen terapéutico, hacen a la clomipramina un candidato ideal para el monitoreo de su concentración sanguínea. Bajo estas condiciones, este fármaco podría mejorar su eficacia en el tratamiento de padecimientos depresivos mayores y su seguridad en la mayoría de los pacientes.



VII. Apéndice



Hoja de consentimiento

"Estudio de bioequivalencia de una forma farmacéutica de liberación modificada de clomipramina".

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Edad: _____ Peso: _____

Estatura: _____ Sexo: _____

En forma voluntaria y en pleno uso de mis facultades mentales, por este medio hago constar y así consigno mi firma, que he sido informado sobre los peligros en que puedo incurrir al participar en esta investigación "Estudio de bioequivalencia de una forma farmacéutica de liberación modificada de clomipramina".

La información recibida y la cual he leído cuidadosamente, se anexa en este documento. Igualmente hago constar que seguiré fielmente todas las instrucciones recibidas con respecto a la toma del medicamento y recolección de muestras, según consta en el protocolo del cual esta hoja de consentimiento forma parte.

Fecha: _____

Responsable del estudio

Firma del voluntario



VIII. Bibliografía



1. Abdon, A. Dissolution, bioavailability and bioequivalence. Mack Publishing Co. U.S.A., 1989.
2. Evans E.F., Betz III, et al. The bioavailability of oral and parenteral chlorimipramine (Anafranil). *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* 4 (1980) 293-302.
3. Müller F.O., Schall R., et al. Relative bioavailability of four clomipramine hydrochloride tablet products. *Biopharm. Drug Disposition* 17 (1996) 81-90.
4. International Open Conference on Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence Studies. First Edition. Marcel Dekker, NY, 1992.
5. In Vivo Bioequivalence Guidelines. *Pharmacopoeial Forum* 19 (5) 6059-6077, 1993.
6. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. 21 CFR part 320 Ch. 1 (4-1-92 Ed.) 140-159.
7. Welling P.G., Tse Francis L.S. Pharmaceutical Bioequivalence. *Marcel Dekker*. Cap. 1, 1990.
8. McAvish D., Benfield P. Clomipramine: an overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in obsessive disorder and panic disorder. *Drugs* 39 (1990) 136-153.
9. Sallee F.R., Pollock B.G. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine. *Clin. Pharmacokinet.* 18 (1990) 346-364.
10. Goodman W.K., McDougle Ch.J., Price L.H. Pharmacotherapy of Obsessive Compulsive Disorder. *J.Clin. Psychiatry* 53 (Suppl. 4) 29-37, 1992.
11. Martindale: The extra pharmacopoeia. Reynolds JEF, ed. Denver: Micromedex (1988) p 110-116.
12. Faigle JW, Dieterle, W. The metabolism and pharmacokinetics of clomipramine (Anafranil). *J.Int.Med.Res.* 1 (1973) 281-290.
13. Anon. FDA approves new molecular entities in final weeks of year. *FDC Rep Drugs Cosmet.* 52 (i) 17, 1990.
14. Ananth J. Clomipramine in obsessive-compulsive disorder: a review. *Psychosomatics* 24 (1983) 723-727.
15. Schildkraut J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am.J.Psychiatry* 122 (1965) 509-522.
16. Goodman W.K., Charney D.S. Therapeutic applications and mechanisms of action of monoamine oxidase inhibitor and heterocyclic antidepressant drugs. *J.Clin. Psychiatry* 46 (1985) 6-22.
17. Bertilsson L., Asberg M., Thoren P. Differential effect of chlorimipramine and nortriptyline on cerebrospinal fluid amine metabolites of serotonin and noradrenalin in depression. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 7 (1974) 365-368.
18. Zohar J., Insel T.R. Obsessive-compulsive disorder, psychobiological approaches to diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Biol. Psychiatry* 22 (1987) 667-687.
19. CIBA report. New Anafranil. *J.Clin. Psychiatry*. 51 (Suppl. 4) 1990.
20. Corte LD, Valoti M, Palmi M, et al. Pharmacokinetics of clomipramine, chlorpromazine and their n-dealkylated metabolites in plasma of healthy volunteers after a single doses of the parent compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (1993) 825-829.
21. Gex-Fabry M., Balant-Gorgia A.E., Balant L.P., Garrone G. Clomipramine metabolism: model-based analysis of variability factors from drug monitoring data. *Clin. Pharmacokinet.* 19 (3) 241-255, 1990.
22. de Cuyper HJA, van Praag HM, Mulder-Hajonides WREM, et al. Pharmacokinetics of clomipramine in depressive patients. *Psychiatry Research* 4 (1981) 147-156.
23. Braithwaite RA. Plasma-protein binding of tricyclic antidepressants. *Postgrad.Med.J.* 56 (Suppl. 1) 107-111, 1980.
24. Bertilsson L, Braithwaite R, Tybring G, et al. Techniques for plasma protein binding of demethylchlorimipramine. *Clin.Pharmacol.Theor.* 26 (1979) 265-271.
25. Bertilsson L, Braithwaite R, Tybring G, et al. Techniques for plasma protein binding of demethylchlorimipramine. *Pharmacopsychiatry.* 14 (1981) 100-106.



26. Mårtensson E., Axelsson R., et al. Pharmacokinetics properties of the antidepressant drugs amitriptyline, clomipramine, and imipramine: a clinical study. *Current Therapeutic Research* 36 (1984) 228-238.
27. Nagy A., Johansson R. The demethylation of imipramine and clomipramine as apparent from their plasma kinetics. *Psychopharmacology*, 54 (1977) 125-131.
28. Takemura M., Yoshida S., Fuchino K. Excretion of clomipramine and desmethylclomipramine in human breast milk. *Seishin Igaku* 34 (1982) 749-753.
29. Balant-Gorgia A.E., Gex-Fabry M., Balant L.P. Clinical pharmacokinetics of doxapramine. *Clin. Pharmacokinetics* 20 (6) 447-462, 1991.
30. Dawling S., Braithwaite R.A., McAuley R., Montgomery S.A. Single oral dose pharmacokinetics of clomipramine in depressed patients. *Postgrad. Med. J.* 56 (Suppl.1) 115-116, 1980.
31. Ollagnier M., Poffet J., Gay J.P., Lang F., Ouvry M.C., et al. Pharmacocinétique d'une dose unique de clomipramine en intraveineuse, chez le volontaire sain. *Therapies* 39 (1984) 237-245.
32. Balant-Gorgia A.E., Balant L.P., Genet Ch., Dayer P., Aeschlimann J.M. Importance of oxidative polymorphism and levomepromazine treatment on the steady-state blood concentration of clomipramine and its major metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31 (1986) 449-455.
33. Linaola M., Insel T., Kils C., et al. Plasma steady state concentrations of hydroxylated metabolites of clomipramine. *Clin. Pharm. Ther.* 32 (1982) 208-211.
34. Balant-Gorgia A.E., Balant L., Zysser Th. High plasma concentrations of desmethylclomipramine after chronic administration of clomipramine to a poor metabolizer. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 32 (1987) 101-102.
35. Nielsen KK, Brosen K, et al. Single-dose kinetics of clomipramine: relationship to the sparteine and S-mephenytoin oxidation polymorphisms. *Clin. Pharm. Ther.* 55 (5) 518-527, 1994.
36. Nielsen KK, Brosen K, Gram LF. Steady-state plasma levels of clomipramine and its metabolites: impact of the sparteine/ debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43 (1992) 405-411.
37. Balant-Gorgia A.E., Balant L.P., Garrone G. High blood concentration of imipramine or clomipramine and therapeutic failure: a case report study using drug monitoring data. *Ther. Drug Monitoring* 11 (1989) 415-420.
38. Brosen K., Gram L.F. Clinical significance of the sparteine/ debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36 (1989) 537-547.
39. Jones R.B., Luscombe D.K. Plasma concentration of clomipramine and its N-desmethyl metabolite in depressive patients following treatment with various dosage regimes of clomipramine. *Postgrad. Med. J.* 52 (Suppl.4) 63-76, 1977.
40. Fraskman L., Asberg M., Bertilsson L., et al. Plasma levels of clomipramine and its demethyl metabolite during treatment of depression. *Clin. Pharmacol. Ther.* 26 (1979) 600-610.
41. John V.A., Luscombe D.K., Kenip H. Effects of age, cigarette smoking and the oral contraceptive on the pharmacokinetics of clomipramine and its demethyl metabolite during chronic dosing. *J. Int. Med. Res.* 8 (Suppl. 3) 88-95, 1980.
42. Burch J.E., Shaw D.M., et al. Time course of plasma drug levels during once-daily oral administration of clomipramine. *Psychopharmacology* 77 (1982) 344-347.
43. Huttlin R.P. Variations in plasma concentrations of clomipramine and desmethylclomipramine during clomipramine therapy. *Postgrad. Med. J.* 56 (Suppl.1) 117-119, 1980.
44. de Zeeuw R.A., Westenberg H.G.M., van Praag H.M., de Cuyper H. Unusual plasma level oscillations of clomipramine in man: a pharmacokinetic and pharmacodynamic dilemma. *Postgrad. Med. J.* 56 (Suppl.1) 120-126, 1980.
45. Luscombe DK, John V. Influence of age, cigarette smoking and the oral contraceptive on plasma concentrations of clomipramine. *Postgrad. Med. J.* 56 (Suppl.1) 99-102, 1980.



46. Balant-Gorgia AE, Gay M, Gex-Fabry M, Balant LP. Persistent impairment of clomipramine demethylation in recently detoxified alcoholic patients. *Ther Drug Monit*. 14 (1992) 119-124.
47. Plotkin DA, Gerson SC, Jarvik LF. Antidepressant drug treatment in the elderly. *Psychopharmacology*, edited by Herbert Y. Meltzer. Raven Press, New York (1987) 1149 - 1158.
48. Gram L.F., Overo K.F. Drug interaction inhibitory effect of neuroleptics on metabolism of tricyclic antidepressants in man. *Br.Med.J.* 1 (1972) 463-465.
49. Gram L.F. Effects of perphenazine on imipramine metabolism in man. *Psychopharmacology Comm.* 1 (1975) 165-175.
50. Schumacher Gerald E. *Therapeutic Drug Monitoring*. Appleton & Lange, Connecticut, USA (1995) p 425.
51. PLM, 39ª edición. (1993) 78-80.
52. Turich Danile B. *Physicians' Desk Reference (PDR)*. 47th Edition, 1993. p 671-675.
53. *Controlled Drug Delivery, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Vol. 29, Second Edition. Edited by Robinson J.R., Lee V.H.L. Marcel Dekker, Inc. NY, USA. 1987.
54. *Novel Drug Delivery Systems, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Vol. 50, Second Edition. Edited by Chien Yie W. Marcel Dekker, Inc. NY, USA. 1992.
55. Gonzalez M., Golub A. Theo-Dur[®] and Theo-Dur Sprinkle[™], controlled release delivery systems for theophyllin. *Drug Dev.Ind.Pharm.* 9 (1983) 1379.
56. D'Arcy P., Griffin J., et al. Sustained-release formulation of prednisone administered orally. *J.Pharm.Sci.* 60 (1981) 1028.
57. Gibaldi M., Perrier D. *Pharmacokinetics*, 2nd Edition. Marcel Dekker, NY, USA. p194, 1982.
58. Scoggins B.A., Maguire K.P., et al. Measurement of tricyclic antidepressants: Part I. A review of methodology. *Clin.Chem.* 26 (1980) 5-17.
59. Norman T.R., Maguire K.P. Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma and serum by chromatographic techniques. *J.Chromatogr.* 340 (1985) 173-197.
60. Curtis G., Godbillon J., Metayer J.P. Determination of clomipramine and desmethylclomipramine in plasma or urine by the double radioisotope derivative technique. *Clin.Chem.* 22 (1976) 817-823.
61. Read G.F., Riad-Fahmy D., Walker R.F. A specific radio-immunoassay procedure for plasma clomipramine. *Postgrad.Med.J.* 53 (Suppl.4) 110-115, 1977.
62. Volin P. Therapeutic monitoring of tricyclic antidepressant drugs in plasma or serum by gas chromatography. *Clin.Chem.* 27 (1981) 1785-1787.
63. Gifford L.A., Turner P., Pare C.M.B. Sensitive method for the routine determination of tricyclic antidepressants in plasma using a specific nitrogen detector. *J.Chromatogr.* 105 (1975) 107-113.
64. Dubois J.P., Kling W., Theobald W., Witz B. Measurement of clomipramine, N - desmethylclomipramine, imipramine, and dehydroimipramine in biological fluids by selective ion monitoring, and pharmacokinetics of clomipramine. *Clin.Chem.* 22 (1976) 892-897.
65. Alfredsson G., Wiesel F.A., Fyro B., Sedvall G. Mass fragmentographic analysis of clomipramine and its mono-demethylated metabolite in human plasma. *Psychopharmacology* 52 (1977) 25-30.
66. Broadhurst A.D., James H.D., Della Corte L., et al. Clomipramine plasma level and clinical response. *Grad.Med.J.* 53 (Suppl.4) 139-145, 1977.
67. Nyberg G., Martensson E. Quantitative analysis of tricyclic antidepressants in serum from psychiatric patients. *J.Chromatogr.* 143 (1977) 491-497.
68. Dawling S., Braithwaite R.A. Simplified method for monitoring tricyclic antidepressant therapy using gas-liquid chromatography with nitrogen detection. *J.Chromatogr.* 146 (1978) 449-456.



69. Rovei V., Sanjuan M., Hrdina P.D. Analysis of tricyclic antidepressant drugs by gas chromatography using nitrogen selective detection with packed and capillary columns. *J.Chromatogr.* 182 (1980) 349-357.
70. Bredesen J.K., Ellingsen O.F., Kaulsen J. Rapid isothermal gas-liquid chromatographic determination of tricyclic antidepressants in serum with use of a nitrogen-selective detector. *J.Chromatogr.* 204 (1981) 361-367.
71. Gupta R.N., Stefance M., Eng F. Determination of tricyclic antidepressant drugs with the use of a capillary column. *Clin Biochem.* 16 (1983) 94-98.
72. Ninci R., Sgaragli G. Isothermal gas chromatographic determination of nanogram amounts of chlorimipramine, chlorpromazine and their N-desmethyl metabolites in plasma using nitrogen selective detection. *J.Chromatogr.* 381 (1986) 315-322.
73. Sioufi A., Pommier F., Dubois J.P. Simultaneous determination of clomipramine and its N-desmethyl metabolite in human whole blood by capillary gas chromatography with mass-selective detection. *J.Chromatogr.* 428 (1988) 71-80.
74. Mellstrom B., Eksborg S. Determination of chlorimipramine and desmethylchlorimipramine in human plasma by ion-pair partition chromatography. *J.Chromatogr.* 116 (1976) 475-479.
75. Moyes R.B., Moyes I.C.A. Measurement of plasma antidepressant levels by high performance liquid chromatography. *Postgrad.Med.J.* 53 (Suppl.4) 117-123, 1977.
76. Westenberg H.G.M., de Zeeuw R.A., et al. Bioanalysis and pharmacokinetics of clomipramine and desmethylclomipramine in man by means of liquid chromatography. *Postgrad.Me.L.I.* 53 (Suppl.4) 124-130, 1977.
77. Mellstrom B., Tybring G. Ion-pair liquid chromatography of steady-state plasma levels of chlorimipramine and desmethylchlorimipramine. *J.Chromatogr.* 143 (1977) 597-605.
78. Westenberg H.G.M., Drenth B.F.H., de Zeeuw R.A., et al. Determination of clomipramine and desmethylclomipramine in plasma by means of liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 142 (1977) 725-733.
79. Uges D.R., Bouma P. Determination of tricyclic antidepressants and some of their metabolites in serum by straight phase HPLC. *Pharmaceutisch Weekblad - Scientific Edition.* 114 (1979) 417-424.
80. Moyes R.B., Moyes I.C.A. Some factors affecting the plasma levels of tricyclic antidepressants. *Postgrad.Med.J.* 56 (Suppl.1) 103-106, 1980.
81. Godbillon J., Gauron S. Determination of clomipramine or imipramine and their mono-demethylated metabolites in human blood or plasma by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 204 (1981) 303-311.
82. Altieri I., Pichini S., et al. Improved clean-up procedure for the high performance liquid chromatographic assay of clomipramine and its demethylated metabolites in human plasma. *J.Chromatogr.* 669 (1995) 416-417.
83. Visser T., Oostelbos C.J.M., Toll J.M.M. Reliable routine method for the determination of antidepressant drugs in plasma by high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 309 (1984) 81-93.
84. Pak Phak R., Viata A., Durand A. Determination of citalopram, amitriptyline and clomipramine in plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 338 (1985) 171-178.
85. Sutfin T.A., D'Ambrosio R., Jusko W.J. Liquid-chromatographic determination of eight tri- and tetracyclic antidepressants and their major active metabolites. *Clin.Chem.* 30 (1984) 471-474.
86. Spreux-Varoquaux O., Morin D., Advenier C., Pays M. Determination of clomipramine and its hydroxylated and demethylated metabolites in plasma and urine by liquid chromatography with electrochemical detection. *J.Chromatogr.* 416 (1987) 311-319.



87. Matsumoto K., Kanba S., Kubo H., et al. Automated determination of drugs in serum by column-switching high-performance liquid chromatography. IV. Separation of tricyclic and tetracyclic antidepressants and their metabolites. *Clin.Chem.* 35/3 (1989) 453-456.
88. Vazquez-Rodríguez AM., Arranz Peña M.I., et al. Clomipramine test: serum level determination in three groups of psychiatric patients. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 9 (1991) 949-952.
89. Diquet B., Thomaré P., Bocquentin M., Diviné C. Drug monitoring of clomipramine and desmethylclomipramine in depressed patients using a new liquid chromatographic assay. *Biomed.Chromatogr.* 7 (2) 59-63, 1993.
90. Kramer Nielsen K., Brosen K. High-performance liquid chromatography of clomipramine and metabolites in human plasma and urine. *Ther.Drug Monitoring* 15 (1993) 122-128.
91. FEUM, 6a. Edición. 1995.
92. Shah V.P., Midha K.K., Dighe S., et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *J.Pharm.Sci.* 81 (3) 309-312, 1992.
93. Brooks M.A., Weinfeld R.E. A validation process for data from the analysis of drugs in biological fluids. *Drug Develop.Ind.Pharm.* 11 (9&10) 1703-1728, 1985.
94. Shah V.P. Analytical methods used in bioavailability studies: a regulatory viewpoint. *Clin.Res.Practices & Drug Reg. Affairs* 5 (1) 51-61 (1987).
95. Karnes H.T., Shio G., Shah V. Validation of bioanalytical methods. *Pharm. Research* 8 (4) 421-426, 1991.
96. Meier J., Nuesch E., Schmidt R. Pharmacokinetics criteria for the evaluation of retard formulations. *Eurap.J.Clin.Pharmacol.* 7 (1974) 429-432.
97. Nagy A., Johansson R. The demethylation of imipramine and clomipramine as apparent from their plasma kinetics. *Psychopharmacology* 54 (1977) 125-131.
98. Allen J.J., Rack P.H. Differences in the effects of clomipramine on English and Asian volunteers: Preliminary report on a pilot study. *Postgrad.Med.J.* 53 (Suppl. 4) 79-86, 1977.
99. Robinson Joseph R., Lee Vincent H.L. Controlled Drug Delivery. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 22. *Marcel Dekker* NY, USA (1987) p 225.
100. Shapiro S.S., Wilk M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52 (3-4) 591-611.
101. Durbin J., Watson, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression II. *Biometrika* 38 (1951) 159-178.
102. Hines W.W., Montgomery D.C. Probabilidad y estadística para ingeniería y administración. *CECSA*, México (1988) p. 377-379.
103. *Pharmaceutical Statistics*. Edited by Sanford Bolton. 2d Edition. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. 1990. Ch. 11.
104. Chow Shein-Chung, Liu Jen-Pei. Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. Statistics: Textbooks and monographs. *Marcel Dekker, Inc.* New York, USA. 1991. p 31.
105. Welling P.G., Tse Francis L.S., Dighe Shrikant V. Pharmaceutical Bioequivalence. *Marcel Dekker, Inc.* N.Y., U.S.A. (1991).
106. In vivo bioequivalence guidances. *Pharmacopoeial Forum* 19 (5) 6069-6077, 1993.
107. *Memorias del Curso sobre Estudios de Bioequivalencia en la Industria Farmacéutica. Estadísticos Asociados*. Abril 1994, p 126 - 128.
108. Peters M.D., Sharon K.D., Austin L.S. Clomipramine: An antiobsessional tricyclic antidepressant. *Clin.Pharm.* 9 (1990) 165-178.
109. Robinson Joseph R., Lee Vincent H.L. Controlled Drug Delivery. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 22. *Marcel Dekker* NY, USA (1987) Ch. 5.
110. De Zeeuw R.A., Westenberg H.G.M., et al. Unusual plasma level oscillations of clomipramine in man: a pharmacokinetic and pharmacodynamic dilemma. *Postgrad.Med.J.* 56 (Suppl. 1) 120-126, 1980.



Agradecimientos



*He esperado a que durmieras
por primera vez
en esta tierra inmensa,
para verte llorar y ver tus manos
una y otra al lado de tu cara,
taciéndote la boca y los ojos.*

*He esperado a conocerte
cuando tu madre te levanta
en sus brazos y te abraza
como después sólo lo hará la vida,
el viento, el amor y la tierra.*

*Me asomo a la cuna
para mirar tus ojos o tu sueño
y dentro de mi alma
algo fresco y tierno
vuelve a crecer poderoso.*

*No me preocupo de tu nombre
ahora que no lo tienes.*

*Me preocupa el futuro
y el mundo de la mujer
en que te crezcas,
el mundo del hombre que tu mires;
pero por sobre todo me preocupa
tu risa de ahora
y si ésta podrá crecer
como una ventisca marina;
me preocupa tu alegría de lucha y
combate,
en medio de los hombres y las mujeres,
de los niños tras su madre
o del hombre.*

*Es por eso y tantas cosas más
que no te puedo decir,
pero que los brazos de tu madre recogen,
que me asomo a mirarte
con la mirada fresca que nunca he tenido.*

*Me preocupo de todo por ti,
desde los besos que te dan
tus hermanas.*

Gilberto Herrera Medina, Abril 1971.

A mis padres...

*A Homero, Meme, Toto, Pablo y Tania
por enriquecer mi vida con distintos matices.*

*Especialmente a ti, Toto. Por tu compañía de tantos
años, tus enseñanzas, tu paciencia
y lo de menos:
tus alcahueterías (dice papá que así se llaman... ¿?)
y demás cosas impronunciables.*

*Du är en saga alltför god för att vara sann
Det är en saga i sig att vi funnit varam
Vi kunde lika gärna aldrig nånsin mötts
Eller var vårt möte redan bestämt
Långt innan vi föts...*

För Hugo, trots allting kärlek.

Du räddar inte dig, varken nu eller aldrig!!

A la M. en C. Helgi Jung Cook por su ejemplo de ética, vocación y ¿por que no?, también de buena madre.

A todos los M's en C's del departamento de Farmacia. Especialmente a Juan Manuel, Margarita, Inés, Dinora y Lulú que además de su amistad y sencillez, debo agradecerles la valiosa revisión de este trabajo.

Solo para variar: a Manuel y Lalo, los eternos *auxiliares* del departamento y soporte importante de Biofarmacia y anexos. Un abrazo muy especial a los Lalos, los Lizes (nótese el matriarcado), Silvia, Elsa, Aída y a todos los integrantes de Biofarmacia.

Si Lalo ¡ya se!, mereces mención aparte... Es difícil conocer a gente con tal sencillez y nobleza. Sin lugar a dudas eres un amigo entrañable.

A mis "voluntarios". Gracias por la confianza ¿o deberé decir por el *arriesgue?*

A todos los que me han permitido *colarme* a inorgánica: Caro G., Sofia, David, Caro E., Chucho, Marijose, Alejandro... y a los demás compañeros de este *peculiar* departamento.

A Tere, Paola y Estrella, amigas de enorme riqueza.

Al Baldo y al Victor, colegas de la peculiaridad con especial distinción.

Al Dr. Anatoli Iatsimirski, por su ejemplo de responsabilidad en el trabajo y especial cariño a sus alumnos.

A Fernando Estrada

A la DGAPA - UNAM por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM) y al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, lugares en donde recibí apoyo invaluable para la realización de este trabajo.