



00550

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

MONITOREO TERAPÉUTICO DE CLOZAPINA

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ARACELI SALAZAR PEREYRA

TUTOR

DRA. HELGI JUNG COOK



2005

m. 341344



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Salazar Percyra Araceli

FECHA: 23 febrero - 2005

FIRMA: Araceli

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

Presidente	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Vocal	Dr. Enrique Ángeles Anguiano
Secretario	Dra. Adriana Miriam Domínguez Ramírez
Primer suplente	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Segundo suplente	Dr. Francisco Hernández Luis

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

“Manuel Velasco Suárez”

Dra. Helgi Jung Cook

Asesor de Tesis

Araceli Salazar Pereyra

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Helgi Jung
por la oportunidad y apoyo otorgado para realizar esta tesis.

A Dinora, Nelly, Francis, Cynthia, Sergio, Juan Carlos, y a todo el personal del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por su gran apoyo y amistad.

Al Dr. Rafael Castro Román y al Psic. Manuel Ruiz Briones
del Hospital Psiquiátrico Dr. Samuel Ramírez Moreno, por su participación en el estudio.

A CONACYT y DGEP
por el apoyo económico otorgado durante la realización de la tesis.

*A mis padres y hermanos
como una muestra de amor y agradecimiento.*

ABREVIATURAS

AVP	valproato
b	ordenada al origen
Cl	depuración
CLZ	clozapina
cm	centímetros
C _{max}	concentración plasmática máxima
CV	coeficiente de variación
F	fracción biodisponible
h	hora
ISRS	inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
kg	kilogramo
λ	longitud de onda
Log P	coeficiente de partición
m	pendiente
mg	miligramo
mL	mililitro
μ m	micrometro
n	tamaño de muestra
ng	nanogramo
nm	nanómetro
nmol	nanomol
°C	grados celsius
pf	punto de fusión
pK _a	constante de disociación
r	coeficiente de correlación
RA	reactivo analítico
rpm	revoluciones por minuto
t _{1/2}	tiempo de vida media
t _{max}	tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima
v	volumen
V _d	volumen de distribución

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Esquizofrenia	3
2.1.1 Subtipos de esquizofrenia	4
2.1.2 Causas de la esquizofrenia	5
2.1.3 Tratamiento	6
2.2 Clozapina	7
2.2.1 Propiedades fisicoquímicas	7
2.2.2 Propiedades farmacológicas	8
2.2.3 Mecanismo de acción	8
2.2.4 Aspectos farmacocinéticos de la clozapina	9
2.2.4.1 Absorción	10
2.2.4.2 Distribución	10
2.2.4.3 Metabolismo	10
2.2.4.4 Eliminación	11
2.2.5 Dosis y vía de administración	12
2.2.6 Tolerabilidad	12
2.2.7 Interacciones farmacocinéticas	13
2.2.8 Margen terapéutico	13
2.3 Métodos analíticos para la cuantificación de CLZ en fluidos biológicos	16
2.4 Monitoreo terapéutico de fármacos	17
2.4.1 Razones que justifican el monitoreo de fármacos	17
2.4.2 Indicaciones generales del monitoreo	18
2.4.3 Beneficios clínicos del monitoreo	19

3. PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 Método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma	20
3.1.1 Preparación de estándares y soluciones	21
3.1.2 Preparación de la curva de preparación de metanol y plasma	23
3.1.3 Preparación de puntos control en plasma	23
3.1.4 Optimización del método analítico para cuantificar CLZ en plasma	24
3.1.4.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción	24
3.1.4.2 Elección de la columna cromatográfica	24
3.1.4.3 Optimización de la fase móvil	25
3.1.4.4 Selección del estándar interno	25
3.1.4.5 Optimización del método de extracción	26
3.1.5 Validación del método analítico para cuantificar clozapina en plasma	28
3.1.5.1 Linealidad del sistema	28
3.1.5.2 Linealidad del método analítico	28
3.1.5.3 Precisión del método	29
3.1.5.4 Exactitud del método	29
3.1.5.5 Recobro absoluto	30
3.1.5.6 Límite de cuantificación	30
3.1.5.7 Límite de detección	30
3.1.5.8 Selectividad	31
3.1.5.9 Estabilidad de la muestra analítica	31
3.2 Monitoreo terapéutico de clozapina en pacientes con esquizofrenia	33
3.2.1 Criterios de selección	33
3.2.2 Régimen de dosificación	35
3.2.3 Muestra sanguínea	35
3.2.4 Determinación de clozapina en plasma	35
3.2.5 Análisis estadístico	36

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
4.1 Método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma	37
4.1.1 Optimización del método analítico para cuantificar CLZ en plasma	37
4.1.2 Linealidad del sistema	39
4.1.3 Linealidad del método	41
4.1.4 Precisión	43
4.1.5 Exactitud	44
4.1.6 Recobro absoluto	45
4.1.7 Límite de cuantificación	45
4.1.8 Límite de detección	46
4.1.9 Selectividad	46
4.1.10 Estabilidad de la muestra analítico	48
4.2 Monitoreo terapéutico de clozapina en pacientes con esquizofrenia	51
4.2.1 Determinación de los niveles de clozapina en plasma	51
4.2.2 Relación entre la dosis y los niveles de clozapina en plasma	53
4.2.3 Influencia de la edad y peso en los niveles de clozapina en plasma	55
4.2.4 Influencia del género en los niveles de clozapina en plasma	55
4.2.5 Influencia del tabaquismo en los niveles de clozapina en plasma	56
4.2.6 Influencia del tratamiento concomitante con valproato e ISRS.	57
4.2.7 Efectos adversos	58
4.2.8 Nomograma de Perry	59
5. CONCLUSIONES	61
6. PERSPECTIVAS	62
7. BIBLIOGRAFÍA	63
8. ANEXOS	69

INDICE DE CUADROS

Número de Cuadro		Página
1.	Parámetros farmacocinéticos de clozapina	9
2.	Interacciones farmacocinéticas con clozapina	14
3.	Estudios de la relación entre la concentración umbral de clozapina y la eficiencia clínica	15
4.	Métodos analíticos reportados para la cuantificación de clozapina	16
5.	Fármacos habitualmente monitorizados	18
6.	Características generales de los pacientes	34
7.	Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de CLZ	39
8.	Linealidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma	41
9.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma	43
10.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma	44
11.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma	44
12.	Recobro absoluto de CLZ en plasma	45
13.	Límite de cuantificación	46
14.	Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	48
15.	Estabilidad de la muestra procesada	49
16.	Estabilidad de la muestra en refrigeración	49
17.	Estabilidad de la muestra en congelación	50
18.	Características demográficas de los pacientes	52
19.	Influencia del género, hábitos de fumar y tratamientos concomitante sobre los niveles plasmáticos de clozapina	54
20.	Comparación de los niveles de clozapina en plasma obtenidos en el presente estudio con los predeterminados por Perry	56

INDICE DE FIGURAS

Número de Figura		Página
1.	Formula estructural de clozapina	7
2.	Metabolitos principales de clozapina	11
3.	Formulas estructurales de la carbamazepina, diazepam y haloperidol	25
4.	Diagrama de flujo para la preparación de las muestras	27
5.	Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de CLZ	40
6.	Linealidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma	42
7.	Cromatograma de un blanco de plasma	47
8.	Cromatograma de una muestra de clozapina en plasma adicionada con EI	47
9.	Cromatograma de un paciente bajo tratamiento con clozapina	47
10.	Dosis de clozapina administrada en el estudio	51
11.	Relación entre la concentración plasmática de clozapina en estado estacionario y la dosis diaria de clozapina de 36 pacientes bajo terapia incluidos en el estudio	53
12.	Dosis y niveles de clozapina en plasma en hombres y mujeres	56
13.	Dosis y niveles de clozapina en plasma en fumadores y no fumadores	56
14.	Relación entre los niveles plasmáticos de clozapina y el tratamiento concomitante con valproato e ISRS	57
15.	Efectos adversos debido al tratamiento con clozapina	58
16.	Nomograma de Perry	59

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales más debilitantes y desconcertantes, que afecta alrededor del 1% de la población en todos los países y sociedades del mundo, causando impedimentos devastadores, pérdidas emocionales y económicas, tanto en hombres como en mujeres. Este trastorno mental se relaciona con un desequilibrio bioquímico por el efecto excesivo de la dopamina, por lo que se requiere de la administración de medicamentos antipsicóticos, los cuales bloquean y restablecen el equilibrio cerebral.

Los antipsicóticos o neurolépticos en general reducen las alucinaciones, los delirios y los pensamientos revueltos, pero pocos actúan adecuadamente sobre el aislamiento social y la apatía característica de la esquizofrenia. Desde 1990, la clozapina, un antipsicótico atípico con bajo potencial para producir efectos extrapiramidales y discinesia tardía, provee una opción terapéutica en el tratamiento de los pacientes con esquizofrenia refractaria a antipsicóticos convencionales tales como clorpromazina y haloperidol, así como en el tratamiento de otros desordenes psicóticos, reduciendo los síntomas positivos, negativos y posiblemente también los cognitivos.¹ Aún cuando la clozapina es efectiva en un 50 - 60% de estos pacientes, su uso ha sido limitado por el riesgo de agranulocitosis en 1 - 2% de los pacientes, lo cual hace necesario, durante los primeros meses del tratamiento el monitoreo hematológico frecuente.^{2,3}

En la literatura científica internacional existen reportes indicando que la farmacocinética de clozapina es variable y que los niveles plasmáticos de clozapina se ven influenciados por los hábitos de vida, así como los factores fisiológicos y patológicos. Aún cuando, en nuestro país, este fármaco se utiliza en pacientes con esquizofrenia refractaria a la fecha no se tiene información acerca de los niveles de clozapina y, por consecuencia, no se ha determinado el margen terapéutico para esta población. Por ello existe la necesidad de realizar un estudio que permita evaluar el comportamiento de la clozapina para asegurar

que los pacientes bajo tratamiento con este fármaco se encuentren dentro de un margen de seguridad y efectividad y, en caso necesario, hacer un ajuste de dosis. Con base en lo anteriormente mencionado, los objetivos del presente estudio fueron:

- Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar clozapina en plasma.
- Determinar los niveles plasmáticos de clozapina de pacientes.
- Establecer la relación de los niveles plasmáticos de clozapina con los factores demográficos como la dosis, la edad, el peso, el género y el tabaquismo.
- Establecer la relación de los niveles plasmáticos de clozapina y el tratamiento concomitante con valproato e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina.
- Determinar la importancia del monitoreo terapéutico de este fármaco en la práctica clínica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno mental que deteriora la capacidad de la persona para pensar con claridad, controlar sus emociones, tomar decisiones y relacionarse; afecta aproximadamente a una de cada 100 personas. El término de esquizofrenia (del gr. σχίζω, disociar, y φρήν, inteligencia) fue introducido por el psiquiatra suizo Bleuler en 1911, pero este trastorno ya había sido identificado por el psiquiatra alemán Emil Kraepelin en 1896 bajo el nombre de "demencia precoz", queriendo significar que las personas afectadas sufren deterioros cognitivos graves y de conducta, similares a las demencias experimentadas por algunas personas ancianas, pero en este caso declarada a una edad juvenil. Sin embargo, Bleuler observó que no era así en todos los casos y consideró más apropiado dar el nombre de esquizofrenia como una escisión de los acontecimientos externos y los procesos mentales.⁴

La edad de aparición está comprendida entre los 15 y los 45 años, aunque suele comenzar al final de la adolescencia; también hay casos de aparición en la infancia, que suelen enmascararse con problemas escolares o mal comportamiento. La esquizofrenia afecta a la persona de una forma total, por lo que quien la padece comienza a sentir, pensar y hablar de forma diferente a como lo hacía antes. Dichas personas empiezan a ser extrañas, se aíslan, duermen poco o demasiado, hablan solos o se ríen sin motivo aparente.

Los síntomas de esta enfermedad se dividen en dos grandes grupos: los síntomas positivos que son manifestaciones que el paciente experimenta, como trastornos de pensamiento, delirios, alucinaciones auditivas y visuales que las personas sanas no suelen presentar; y los síntomas negativos, que son aquellas actividades que el paciente deja de hacer y que los individuos sanos realizan cotidianamente, como pensar con fluidez y con lógica, experimentar sentimientos hacia otras personas, tener voluntad para levantarse cada día, etc. Todos estos síntomas afectan los ámbitos social, laboral y familiar.⁵

2.1.1 Subtipos de esquizofrenia

De acuerdo al manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, la tercera y la cuarta edición (DSM-III y DSM-IV), los trastornos esquizofrénicos se dividen en cuatro subtipos activos y un tipo residual:^{4,5}

- **Esquizofrenia paranoide:** se caracteriza por el predominio de una o más ideas delirantes y alucinaciones, principalmente las auditivas. La esquizofrenia paranoide es la más frecuente y suele iniciar a una edad más tardía. Los pacientes tienden a presentar un cuadro clínico más estable, con menos deterioro y mejor pronóstico que aquéllos que presentan otro subtipo de esquizofrenia.

- **Esquizofrenia catatónica:** se caracteriza por un grado extremo de empobrecimiento psicomotor. Los expertos hablan de "estupor catatónico". A pesar de tener la conciencia despierta, el enfermo no reacciona a los intentos de entrar en contacto con él. Su rostro permanece inmóvil e inexpresivo, no se percibe ningún movimiento interior e incluso fuertes estímulos de dolor pueden no provocar reacción alguna. En los casos más graves pueden llegar a no hablar, ni comer, ni beber durante periodos suficientemente largos como para que peligre su vida. Esta forma de esquizofrenia es poco frecuente y su pronóstico suele ser malo.

- **Esquizofrenia desorganizada:** predomina un afecto absurdo e inapropiado. Se suelen reír cuando se les da una mala noticia, su conducta suelen ser infantil y a menudo muestran falta de interés y de participación. Los indicios suelen ser el descuido personal y conducta solitaria. El pronóstico suele ser desfavorable, debido a la personalidad inmadura del enfermo.

- **Esquizofrenia residual:** en estos casos debe haber presentado, por lo menos, un episodio de esquizofrenia anteriormente. Es la fase en la que los síntomas negativos son más evidentes. No se manifiesta en todos los enfermos.

2.1.2 Causas de la esquizofrenia

Hasta el momento no se sabe con seguridad cuál es la causa de la esquizofrenia, por lo que se atribuye a todo un conjunto de causas. La principal está asociada a las condiciones hereditarias, que explica cerca de la mitad de los casos de esta enfermedad, pero los genes o la combinación de genes responsables, a la fecha, no se han identificado. Las complicaciones durante el parto y las infecciones virales en los primeros meses de embarazo, provocan que algunas partes del cerebro del feto no se desarrollen con normalidad y, por consiguiente, se atribuyen al progreso de dicho trastorno. Como desencadenante de la enfermedad debe sumarse una carga emocional especial como es la pérdida o fallecimiento de un ser querido o una mudanza. Incluso las tensiones familiares contribuyen a que la enfermedad se desarrolle.^{4,6}

2.1.3 Tratamiento

El tratamiento de la esquizofrenia se basa fundamentalmente en fármacos llamados antipsicóticos o neurolépticos, los cuales controlan los síntomas activos. Los antipsicóticos constituyen un grupo de medicamentos de naturaleza química muy heterogénea (fenotiazinas, butirofenonas, tioxantenos, ortopramidas y otros). La mayoría actúan bloqueando el funcionamiento de la dopamina, un mensajero químico particular del cerebro.⁷ Estos fármacos, generalmente, suprimen los síntomas positivos; sin embargo, presentan efectos secundarios, por lo que en la actualidad se disponen de nuevos fármacos para el tratamiento de la esquizofrenia que bloquean diferentes mensajeros químicos cerebrales y que tienen menor frecuencia de efectos adversos indeseables y, por consiguiente, se distinguen dos grandes grupos de antipsicóticos, los clásicos o típicos y los atípicos:^{8,9}

Típicos: se caracterizan por bloquear los receptores dopaminérgicos D₂. Son muy eficaces en los síntomas positivos, pero provocan efectos secundarios como rigidez y temblores similares a los producidos en la enfermedad de Parkinson. Este es el caso del haloperidol y clorpromazina.

Atípicos: se caracterizan por bloquear simultáneamente los receptores dopaminérgicos D₂ y los receptores serotoninérgicos 5-HT₂, produciendo menos efectos secundarios y siendo más eficaces en los síntomas negativos, por ejemplo: clozapina, olanzapina, risperidona, quetiapina, sertindol, sulpirida.

La combinación de antipsicóticos atípicos ha sido bien tolerada y puede ser una alternativa para el tratamiento de pacientes esquizofrénicos con la reducción significativa de los síntomas positivos y negativos (clozapina-risperidona, clozapina-olanzapina, clozapina-sulpirida, olanzapina-sulpirida, olanzapina-risperidona).¹⁰

El tratamiento de la esquizofrenia no se basa únicamente en antipsicóticos, éste suele ir acompañado también de antidepresivos, ansiolíticos y a la vez de un tratamiento psicológico, para recuperar sus hábitos de vida. Debido al riesgo de la repetición de los episodios de la esquizofrenia, lo recomendable es el tomar el tratamiento durante varios años, y en ocasiones durante toda la vida, aunque la dosis preventiva es menor que la necesaria en el tratamiento de los episodios agudos.

2.2 Clozapina

2.2.1 Propiedades fisicoquímicas

La clozapina es un derivado tricíclico dibenzodiazepina, cuya estructura es la siguiente:

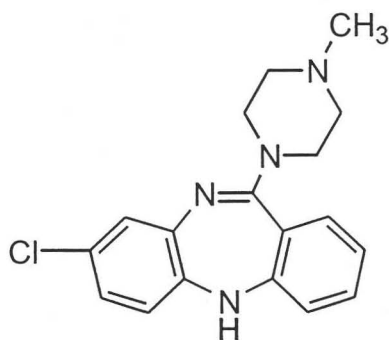


Figura 1. Fórmula estructural de la clozapina

Nombre químico:	[8-cloro-11-(4'-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e]-1,4-diazepina
Nombre genérico:	Clozapina
Nombres comerciales:	Leponex y Clopsine
Fórmula condensada:	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄
Peso Molecular:	326.83 g/mol
pKa:	7.5
Log P (octanol -agua):	3.23

La clozapina es un polvo amarillo cristalino o finamente cristalino, inodoro, con punto de fusión de 183 - 184°C y es ligeramente soluble en agua.^{11,12}

2.2.2 Propiedades farmacológicas

La clozapina es un antipsicótico atípico con bajo potencial para producir efectos extrapiramidales que se manifiestan en forma de movimientos o posturas involuntarias. Se emplea exclusivamente en pacientes con esquizofrenia refractaria a antipsicóticos típicos, que no responden o son intolerantes a los efectos adversos producidos por los antipsicóticos clásicos. También, presenta efectividad en un amplio rango de estados psicóticos, incluyendo trastornos de conducta. A diferencia de los antipsicóticos típicos produce una mejoría significativa tanto en síntomas positivos como en negativos.^{2,13,14}

Recientemente, se encontró que dosis de clozapina menores a 50 mg/día son efectivos para tratar el cuadro de psicosis y discinesia inducida por fármacos como la levodopa, empleados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson sin presentar deterioro significativo de la función motora.^{15,16}

2.2.3 Mecanismo de acción

La actividad antipsicótica de la clozapina se asocia principalmente a su efecto sobre los sistemas neurotransmisores: dopaminérgicos (D_4) y serotoninérgicos ($5-HT_2$). La clozapina actúa selectivamente sobre los receptores D_4 . Dado que el bloqueo específico es en el sistema dopaminérgico mesolímbico y no sobre la nigroestriada, se presentan menos efectos extrapiramidales que los antipsicóticos típicos.¹⁷ También actúa como antagonista sobre los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 , los receptores colinérgicos y histaminérgicos H_1 , aunque no se sabe si estos receptores contribuyen al efecto de la clozapina.¹⁸

2.2.4 Aspectos farmacocinéticos de la clozapina

Existen pocos estudios que han examinado la farmacocinética de clozapina en pacientes con esquizofrenia, ya que por su naturaleza variada, los estudios en estos pacientes resultan extremadamente difíciles de efectuarse. En el Cuadro 1 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos por diferentes investigadores, en el cual se puede apreciar diferencias en el tiempo de vida media, la depuración y el volumen de distribución.¹⁹⁻²¹

Cuadro 1. Parámetros farmacocinéticos de clozapina.

Referencia	n	Dosis (mg)	F	Cl(L/h)	Vd (L/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)
Jann et al. (1993)	NR	NR	0.55 ± 0.12	6.1 ± 1.6 ^a	5.4 ± 3.5	12 ± 4	NR
Guitton (1999)	8	400-900	NR	40.5	7	10.5	NR
Ackenheil (1989)	12	100	NR	37.55 ^b	NR	6.0 ± 1.5	1.5
Cheng et al. (1988)	10	200	0.27 ± 0.21	13.0 ± 8.7	1.6 ± 1.1 ^c	10.3 ± 2.9	3.0 ± 1.5
Gu (1988)	8	100 (n=4) 75 (n=4)	NR	36.9 ± 10.4	7.3 ± 2.7 ^c	9.1 ± 3.7	3.6 ± 3.2
Choc et al. (1987)	13	150	NR	53.3 ± 29.3	5.1 ± 2.3 ^c	17.4 ± 7.7	1.1 ± 0.5
Choc et al. (1990)	16	225	NR	29.6 ± 14.1	587 ^d	14.1 ± NR	NR

a. mL/min/kg; b. L/kg; c. Vd/F; d. L; NR=No reportado

2.2.4.1 Absorción

Después de la administración oral, la clozapina se absorbe rápidamente a través del tracto gastrointestinal. Por efecto de primer paso, la biodisponibilidad es del 50-60% y varía ampliamente entre pacientes. Los alimentos no afectan la biodisponibilidad sistémica de este fármaco.^{22,23}

2.2.4.2 Distribución

La clozapina se distribuye rápida y extensivamente atravesando la barrera hematoencefálica. Se une a proteínas plasmáticas en un 95%, tanto a albúmina como a la α -glicoproteína ácida. El volumen de distribución varía ampliamente entre los diferentes reportes con valores que van de 1.6 - 7.3 L/kg.^{20,21}

2.2.4.3 Metabolismo

La clozapina se metaboliza por las isoenzimas del citocromo P-450, principalmente por el CYP1A2 (~70%) y, en menor extensión, por el CYP3A4 produciendo los dos metabolitos mayoritarios: *N*-desmetilclozapina y la clozapina-*N*-óxido; el primero de éstos es el único que presenta actividad, la cual es menor que la del fármaco inalterado. En la Figura 2 se ilustran las estructuras de los dos metabolitos.^{19,24}

Fischer y colaboradores estudiaron el papel del CYP2D6 en el metabolismo de la clozapina, encontrando que este isoenzima contribuye con la formación de otros metabolitos que son 2-hidroxi- y 7-hidroxiclozapina. Con este estudio se eliminó la posibilidad de que el polimorfismo genético contribuya a la variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos de clozapina.²⁵⁻²⁷

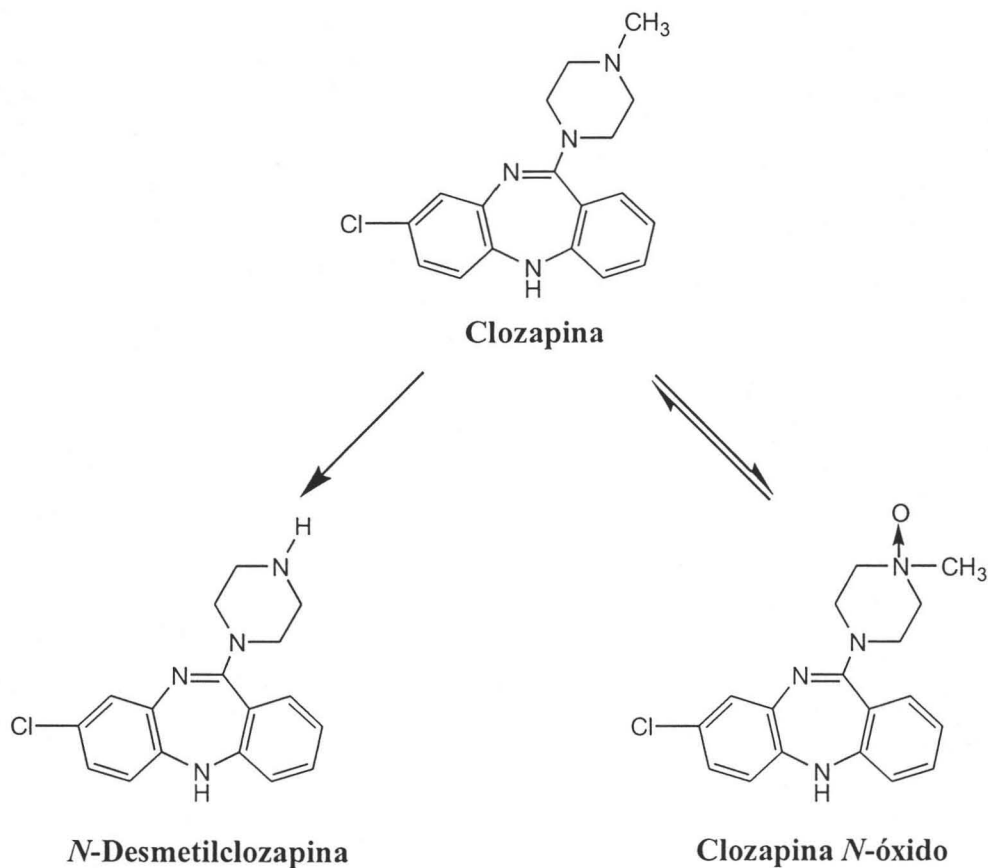


Figura 2. Metabolitos principales de la clozapina.

2.2.4.4 Eliminación

Aproximadamente, el 50 % de la dosis administrada se elimina en forma de metabolitos por vía renal junto con pequeñas trazas de clozapina inalterada, mientras que el 30 % de la dosis se elimina por las heces.²⁸ El tiempo de vida media promedio de la clozapina es de 12 horas con un rango de 6 a 33 horas.^{23,29}

2.2.5 Dosis y vía de administración

Oral. La dosis inicial recomendada es de 12.5 mg una o dos veces al día, incrementando gradualmente la dosis (25-50 mg/día) hasta alcanzar la dosis de 300-450 mg/día después de 2 semanas. Los subsecuentes incrementos de dosis deben hacerse con precaución, con un límite de 900 mg/día si se requiere para alcanzar la respuesta clínica. Para disminuir la incidencia de hipotensión, convulsiones y sedación, se recomienda administrarlo dos o tres veces al día.²⁹

2.2.6 Tolerabilidad

Aún cuando la clozapina presenta un 50-60% de eficacia en pacientes con esquizofrenia refractaria a antipsicóticos convencionales, su uso terapéutico ha sido limitado por una particular incidencia de agranulocitosis (0.05 – 2%), principalmente, durante los primeros 6 meses de tratamiento y en los pacientes mayores de 50 años, lo cual hace necesario un monitoreo hematológico frecuente. Otro riesgo significativo son las crisis convulsivas asociadas con el aumento de dosis. Estos eventos adversos hacen que la clozapina no sea el fármaco de primera elección, por lo que antes de iniciar la terapia se requiere que el paciente haya sido tratado previamente con al menos dos diferentes antipsicóticos.^{1,30}

Los efectos secundarios asociados comúnmente con la clozapina son fatiga, somnolencia, sedación, hipersalivación, taquicardia, constipación e hipotensión ortostática. La acatisia ocurre en una incidencia de 3% comparada con el 20-45% de los antipsicóticos clásicos. La taquicardia e hipotensión se presentan sólo en 1% durante el tratamiento. Durante el tratamiento prolongado con clozapina se han observado un aumento de peso y una incidencia a adquirir diabetes mellitus tipo 2 comparado con los pacientes no tratados.^{31,32}

2.2.7 Interacciones farmacocinéticas

Dado que la clozapina se metaboliza principalmente por el CYP1A2 y el CYP3A4, la administración concomitante con fármacos inhibidores e inductores del CYP450 puede alterar considerablemente los niveles de clozapina en plasma, lo cual puede dar lugar a la ineficacia o toxicidad en los pacientes bajo tratamiento. Así, la carbamazepina, la fenitoína y el tabaquismo disminuyen la concentración de clozapina a través de la inducción enzimática del CYP450. La cafeína, la cimetidina, la eritromicina, los conceptivos orales y los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (fluvoxamina, paroxetina, fluoxetina, sertralina y nefazodona) al inhibir el CYP450 incrementan la concentración de clozapina en plasma.³³⁻³⁶ Algunos estudios demostraron que no hay una interacción significativa de clozapina con paroxetina o fluoxetina.^{37,38} El tratamiento concomitante con litio puede aumentar el riesgo de la aparición del síndrome neuroléptico maligno. En el Cuadro 2 se presentan los fármacos que comúnmente interaccionan con la clozapina.

2.2.8 Margen terapéutico

El rango terapéutico de la clozapina no ha sido definido claramente. En el Cuadro 3 se resumen los resultados de algunos estudios de la relación entre la concentración mínima terapéutica y la eficacia clínica en pacientes con esquizofrenia.^{29,51-57} Estudios independientes han demostrado que la concentración mínima para la respuesta terapéutica es 350 - 420 ng/mL (1070-1290 nmol/L) y concentraciones arriba de 1000 ng/mL (3060 nmol/L) incrementan significativamente los riesgos de confusión, delirio y convulsiones generalizadas; sin embargo, también hay evidencia de pacientes con niveles mayores a 1000 ng/mL que responden favorablemente al tratamiento con clozapina sin presentar efectos adversos, o bien pacientes con niveles menores a 350 ng/mL que también presentan efecto terapéutico.⁵⁸⁻⁶⁰

Cuadro 2. Interacciones farmacocinéticas con la clozapina.

Fármaco de interacción	Efecto sobre los niveles de clozapina en plasma	Mecanismo propuesto	Comentarios
Cafeína ³⁹	Aumenta	Inhibición competitiva de CYP1A2	
Carbamazepina ^{33,40}	Disminuye	Inducción de CYP1A2(3A4)	No hay evidencia directa que involucre la interacción 1A2
Cimetidina ³⁷	Aumenta	Inhibición de CYP1A2	No es inhibidor selectivo del citocromo
Eritromicina ³⁷	Aumenta	Inhibición de CYP1A2	También inhibe CYP3A4
Fluoxetina ^{35,38,41}	Aumenta	Inhibición de CYP2D6	También inhibe CYP3A4
Fluvoxamina ^{33, 42-45}	Aumenta	Inhibición de CYP1A2	
Paroxetina ⁴⁵	Aumenta	Inhibición de CYP2D6	
Fenitoina ^{46,47}	Disminuye	Inducción de CYP1A2	Inhibe otros CYP
Risperidona ³⁷	Aumenta	Inhibición competitiva de CYP2D6	
Sertralina ³⁷	Aumenta	Inhibición de CYP2D6	
Fumar tabaco ^{48,49}	Disminuye	Inducción de CYP1A2	Efecto no evidente en todos los estudios
Valproato ^{37,50}	No claro	No conocido	Evidencias de aumentos y disminución.

Cuadro 3. Estudio de la relación entre la concentración umbral de la clozapina y la eficacia clínica.

Referencia	N	Dosis (mg/día)	Régimen Dosis/día	Tiempo de muestreo (h postdosis)	Umbral (ng/mL)	% Respuesta	
						Abajo del Umbral	Arriba del Umbral
Perry (1991) ⁵¹	29	400	1	~12	350	22	64
Hasegawa (1993) ⁴⁹	59	400	NR	~12	370	38	73
Potkin (1994) ⁵²	58	400	2	NR	420	8	60
Kroning (1995) ⁵³	45	<500	2	12	350	20	54
Pickar (1992) ⁵⁴	21	225-600	NR	NR	ND	55	20
Liu (1996) ⁵⁵	61	400	2	10-12	300	NR	NR
Spina (2000) ⁵⁶	45	300	2 o 3	~12	350	21	62
Fabrazzo (2002) ⁵⁷	32	400	2 o 3	11-13	350	22	100

NR=No reportado

A pesar de la gran controversia que hay sobre el margen terapéutico, se ha establecido que concentraciones mayores a 350-420 ng/mL permiten discriminar a los pacientes que presentan respuesta entre los que no responden al tratamiento con clozapina.

Son pocos los estudios que han encontrado correlación entre la dosis y los niveles plasmáticos de clozapina, entre ellos se describen los trabajos realizados por Ackenheil ($r=0.65$, $p<0.001$, 1989), Hasegawa ($r=0.40$, $p<0.002$, 1993), Olesen ($r=0.70$, $p<0.001$, 1998) y Llorca ($r=0.37$, $p=0.026$, 2002). También, estos encontraron una amplia variabilidad interindividual asociado a factores fisiológicos (edad y peso), genéticos (polimorfismo genético), patológicos (insuficiencia hepática, renal, cardíaca), interacciones con otros medicamentos y hábitos tales como el tabaquismo, los cuales influyen en la concentración de clozapina en plasma.^{19,48,59,61}

El tiempo requerido para obtener una respuesta óptima al tratamiento con clozapina también es una controversia, puesto que se ha encontrado pacientes que responden dentro de las primeras 8 semanas después del cambio de dosis, en tanto que otros presentan una mejoría hasta 1 año después del tratamiento.^{54,57,62,63}

2.3 Métodos analíticos para la cuantificación de clozapina en fluidos biológicos

Para la cuantificación de clozapina en fluidos biológicos, los métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución son los que más se han descrito. Algunos de ellos emplean procesos de extracción líquido-líquido o bien en fase sólida. En el Cuadro 4, se presentan los métodos analíticos para la determinación y cuantificación de este fármaco en fluidos biológicos publicados hasta la fecha.⁶⁴⁻⁷⁰

Cuadro 4 Métodos analíticos reportados para la cuantificación de clozapina en fluidos biológicos.

Referencia	Estándar interno	Método de extracción	Condiciones cromatográficas	Fase móvil	Rango lineal (ng/mL)
Lovdahl et al (1991)	Protriptilina	Liq-Liq (hexano:alcohol isoamílico)	Whatman Partisil ODS-3 (250 mm) y precolumna C ₁₈ (70 mm) $\lambda=230\text{nm}$, Flujo=2.0mL/min	ACN:H ₂ O:buffer fosfatos	50-1500
Weigmann et al. (1992)	Imipramina	Fase sólida C ₁₈	Hypersil ODS C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μm) $\lambda=254\text{nm}$, Flujo=1.5mL/min	ACN:H ₂ O (40:60)	5-2000
Chung et al (1993)	Protriptilina	Liq-Liq (hexano:alcohol isoamílico)	Whatman Partisil ODS-3 (250 x 4.6 mm, 10 μm) y precolumna C ₁₈ (70 mm, 10 μm) $\lambda=230\text{nm}$, Flujo=2.0mL/min	ACN:H ₂ O:buffer fosfatos pH=4.0 (24:12:64)	50-400
Gupta (1995)	Amoxapina	Fase sólida Bond-Elut C ₁₈	Ultrasphere RP C ₈ (150 x 4.6 mm, 5 μm) $\lambda=245\text{nm}$, Flujo=2.0mL/min	Perclorato de tetrametilamonio: ACN (73:27)	15.8-2000
Guitton et al. (1997)	Loxapina	Liq-Liq (acetato de etilo)	Kromasil Ultrabase C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 μm), $\lambda=254\text{nm}$, Flujo=1.5mL/min	ACN:buffer fosfatos pH=7.0 (48:52)	50-2000
Akerman (1997)	Protriptilina	Fase sólida Bond-Elut C ₁₈	Select-B C ₈ (125 x 4 mm, 5 μm) $\lambda=220\text{nm}$, Flujo=1.5mL/min	ACN:MeOH:buffer fosfatos pH=3.7 (30:2:100)	36-13500 ^a
Palego et al. (2001)	Dibenzepina	Fase sólida	Simmetry C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μm) $\lambda=254\text{nm}$, Flujo=1.5mL/min	ACN:H ₂ O (37:63) (0.5% TEMED y 0.01% trietilamina)	25-1000

a. nmol/L

2.4 Monitoreo terapéutico de fármacos

El monitoreo es una técnica de control terapéutico, basado en la medición de las concentraciones de un fármaco en un fluido biológico, que mediante la aplicación de los principios de la farmacocinética permite individualizar la posología con la finalidad de mantener al paciente dentro un margen de seguridad.⁷¹

2.4.1 Razones que justifican el monitoreo de fármacos

A continuación se presentan las características que debe presentar un fármaco para ser monitoreado en la clínica:

- Un estrecho margen terapéutico, puesto que una pequeña variación en las concentraciones plasmáticas incide un cambio de respuesta, que con facilidad pueden pasar de ser eficaz a ser ineficaz o tóxica.
- Variabilidad observada en la respuesta farmacológica y clínica tras la administración de dosis idénticas en diferentes pacientes. La variabilidad interindividual en la respuesta de numerosos fármacos constituye la causa principal de que ciertas dosis sean eficaces en unos pacientes e ineficaces en otros.
- Eficacia y toxicidad de difícil valoración clínica.

En el Cuadro 5 se presentan algunos de los fármacos que requieren del monitoreo de acuerdo a las características antes especificadas.^{72,73}

Cuadro 5. Fármacos habitualmente monitorizados.

Antibióticos	Amikacina, Gentamicina, Vancomicina
Antidepresivos	Amitriptilina, Imipramina, Nortriptilina
Antiepilépticos	Carbamazepina, Fenobarbital, Fenitoína, Valproato
Antineoplásticos	Metotrexate
Agentes Cardiovasculares	Digoxina
Agentes Inmunosupresores	Ciclosporina, Tacrolimus
Psicofármacos	Imipramina, Amitriptilina, Nortriptilina, Litio

2.3.2 Indicaciones generales del monitoreo

El monitoreo de las concentraciones plasmáticas de fármacos se indica en la práctica clínica para:

- Individualizar la posología de aquellos fármacos en los que el monitoreo parece justificado y, especialmente, cuando se utilizan en pacientes que por sus características presentan mayor riesgo (insuficiencia renal o hepática, insuficiencia cardiaca, ancianos, etc).
- Cuando existe sospecha de toxicidad debida al fármaco, para confirmar o descartar la implicación del mismo y decidir las medidas que se deben adoptar (disminuir dosis, suspender la terapia, etc).
- En presencia de fracaso terapéutico y/o modificaciones en la respuesta observada, para decidir si dicha situación obedece a una sobredosificación, incumplimiento de la prescripción médica, resistencia al tratamiento o alteraciones farmacocinéticas.

2.3.3 Beneficios clínicos del monitoreo

El monitoreo rutinario de los niveles plasmáticos de fármacos produce importantes beneficios que pueden clasificarse en directos, indirectos y adicionales. Entre los beneficios directos cabe destacar el aumento de la eficacia y la reducción en la toxicidad de los tratamientos con una evidente mejoría en la calidad de vida. Entre los beneficios indirectos destacan la reducción en la duración de la terapia y/o estancia hospitalaria, disminución de efectos adversos y la reducción del costo del tratamiento. Entre los beneficios adicionales se encuentra la recopilación de información relevante para investigaciones clínicas (farmacocinética poblacional).

3. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo comprendió la validación del método analítico y el estudio del monitoreo terapéutico de la clozapina. En el apartado 3.1 se presentan los aspectos concernientes al método analítico, mientras que en el apartado 3.2 los referentes al monitoreo terapéutico de clozapina en pacientes con esquizofrenia.

3.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOZAPINA EN PLASMA

Estándares.

- Clozapina. Novartis Farmacéutica S.A. de C.V. Lote 0207000176
- Haloperidol (Estándar Interno). Janssen-Cilag Lote 0102550

Reactivos.

- Metanol RA y grado HPLC, Mallinckrodt.
- Acetonitrilo grado HPLC, J. T. Baker
- Agua desionizada grado HPLC.
- Ácido fosfórico concentrado, pureza 85%, Mallinckrodt.
- Alcohol isoamílico RA pureza 85%, Sigma.
- Hexanos RA Mallinckrodt.
- Fosfato monobásico de potasio, J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio, J T. Baker.
- Nitrógeno industrial

Material y equipo.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent serie 1100 equipado con:
 - Bomba cuaternaria
 - Detector de longitud de onda variable UV-Vis
 - Autoinyector
- Balanza analítica Sartorius, modelo i 1800
- Potenciómetro
- Milli-Q Water System Millipore con membrana de 0.45 μm de porosidad
- Agitador vórtex thermolyne Maxi Mix II
- Centrifuga Beckman, modelo TJ-6
- Columna X- Terra RP-18, 5 μ , 250x4.6mm (Waters)
- Micropipeta automática Eppendorf de 100-1000 μL
- Micropipeta automática Eppendorf de 20-200 μL
- Micropipeta automática Eppendorf de 10-100 μL
- Sistemas de filtración Millipore
- Membranas para filtración Millipore de 0.45 μm .

3.1.1 Preparación de estándares y soluciones

- Solución estándar de clozapina.

Solución patrón de clozapina. Concentración: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se pesó con exactitud 5 mg de clozapina, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió y aforó con metanol HPLC.

Solución de trabajo 1 de clozapina. Concentración: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se transfirió 0.4 mL de la solución patrón a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol:agua (1:1). Esta solución contiene 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clozapina.

- Solución de haloperidol (estándar interno).

Solución patrón de haloperidol (E.I.). Concentración: 100 µg/mL.

Se pesó con exactitud 1 mg de haloperidol en un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió y aforó con metanol.

Solución de trabajo 1 de haloperidol (E.I.). Concentración: 5 µg/mL.

Se transfirió 0.5 mL de la solución patrón a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol:agua (1:1).

- Preparación de Soluciones.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 4.0.

Se pesó 6.8044 g de fosfato monobásico de potasio y se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 1000 mL, se disolvió con agua HPLC y aforó. Se ajustó el pH a 4.0 con ácido fosfórico diluido (1%), agitando con una barra magnética.

Solución de hidróxido de sodio 2 N.

Se adicionó 8.0 g de hidróxido de sodio a un matraz de 100 mL, se disolvió con agua HPLC y se aforó.

Solución de ácido fosfórico al 1 %.

Se adicionó 1 mL de ácido fosfórico concentrado a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió con agua HPLC y se aforó.

3.1.2 Preparación de la curva de calibración de clozapina en metanol y plasma

Se transfirió 0.5 mL de la solución 20 µg/mL de clozapina a un matraz volumétrico de 5 mL y se aforó con metanol o plasma (2000 ng/mL). Posteriormente, se realizaron las siguientes diluciones:

Tubo 1. Se tomó 2 mL de la solución de 2000 ng/mL y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 1000 ng/mL de CLZ.

Tubo 2. Del tubo 1 se tomó 2 mL de solución y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 500 ng/mL de CLZ.

Tubo 3. Del tubo 2 se tomó 2 mL de solución y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 250 ng/mL de CLZ.

Tubo 4. Del tubo 3 se tomó 2 mL de solución y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 125 ng/mL de CLZ.

Tubo 5. Del tubo 4 se tomó 2 mL de solución y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 62.5 ng/mL de CLZ.

Tubo 6. Del tubo 5 se tomó 2 mL de solución y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 31.2 ng/mL de CLZ.

Tubo 7. Del tubo 6 se tomó 2 mL de solución y se añadió 2 mL de metanol o plasma.

Concentración 15.6 ng/mL de CLZ.

3.1.3 Preparación de puntos control en plasma

- Control Alto. Se transfirió 187 µL de la solución de 2000 ng/mL de clozapina a un matraz aforado de 5 mL y se aforó con plasma. Concentración 750 ng/mL.
- Control Medio. Se transfirió 50 µL de la solución de 2000 ng/mL de clozapina a un matraz aforado de 5 mL y se aforó con plasma. Concentración 200 ng/mL.
- Control Bajo. Se transfirió 500 µL de la solución de 750 ng/mL de clozapina a un matraz aforado de 5 mL y se aforó con plasma. Concentración 75 ng/mL.

3.1.4 Optimización del método analítico para cuantificar clozapina en plasma

Para la determinación rutinaria de los niveles de clozapina en pacientes, la primera parte del estudio consistió en implementar el método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución, basándose en los trabajos reportados por Lovdahl et al. y Chung et al.

3.1.4.1 Selección de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max})

De acuerdo a la información previa, las longitudes de onda más empleadas para la detección de la clozapina en UV son 230 y 254 nm, por lo que durante el proceso de la optimización del método se trabajó con estas condiciones, para identificar la longitud de onda más adecuada para la cuantificación del fármaco.

3.1.4.2 Elección de la columna cromatográfica

Se realizaron pruebas con las siguientes columnas cromatográficas:

- Spherisorb ODS C₁₈, 250 X4.6 mm D.I., 5 μ m
- X-Terra RP C₁₈, 250 x 4.6 mm D.I., 5 μ m

Las columnas se probaron empleando una concentración de clozapina de 100 ng/mL en metanol, una proporción de fase móvil buffer de fosfatos pH=4.0:acetonitrilo:metanol (65:20:15, v/v) a un flujo de 1.6 mL/min. Se inyectó un volumen de 100 μ L. Para la elección de la columna, se consideraron los siguientes parámetros de respuesta:

- Tiempo de retención (t_r) de clozapina correspondiente a una respuesta cromatográfica del fármaco libre de señales endógenas y en menor tiempo.
- Simetría ~ 1.0 , como un estimador de la deformación o coleado del pico, ya que un pico muy ancho pueden conducir a separaciones deficientes lo que se traduce a una integración errónea de los mismos, y por consiguiente una cuantificación inadecuada del fármaco.

3.1.4.3 Optimización de la fase móvil

Después de haber seleccionado la columna cromatográfica se optimizó la fase móvil y su elección se basó en aquella que definiera mejores tiempos de retención y resolución a los picos, para garantizar una buena separación de los picos y un análisis rápido de la muestra plasmática. Para tal objetivo, se evaluaron diferentes proporciones de la composición buffer de fosfatos pH=4.0:acetonitrilo:metanol.

3.1.4.4 Selección del estándar interno

Para la selección del estándar interno se probaron sustancias que fueran fisicoquímicamente similares a la clozapina, que mostraran una longitud de onda máxima cercana a 230 nm para asegurar una igualdad de respuesta al UV, así como también pudieran cumplir con los siguientes requisitos: una resolución con respecto a la clozapina ≥ 2.0 , un tiempo de retención similar a la clozapina y químicamente estable en la muestra a analizar, ya que si reacciona con algún componente de la muestra, su concentración, respuesta y detección no será igual en todo el análisis. Se realizaron los análisis cromatográficos de los siguientes compuestos: diazepam, carbamazepina y haloperidol, en las condiciones cromatográficas preliminares mencionadas anteriormente.

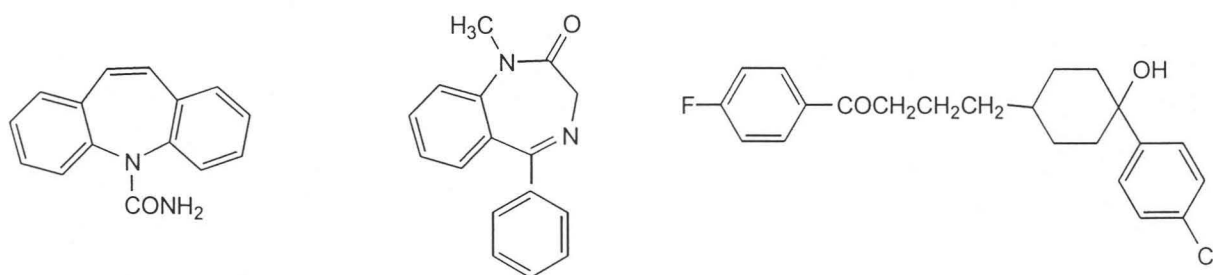


Figura 3. Formulas estructurales de la carbamazepina, diazepam y haloperidol.

3.1.4.5 Optimización del método de extracción

Tomando como base la solubilidad de la clozapina en diferentes disolventes orgánicos y las referencias antes citadas, se probó la técnica de extracción variando el disolvente de extracción (acetato de etilo, hexano y mezcla de hexano:alcohol isoamílico), y la agitación de la muestra (vórtex durante 1.5, 2.0 y 3.0 min y en agitador vertical durante 15 min). El criterio de selección del método de extracción se enfocó en aquel que ofreciera una mayor recuperación del fármaco, menor presencia de impurezas y repetibilidad en los resultados.

Después de evaluar los factores anteriormente mencionados, se establecieron las mejores condiciones para realizar el análisis. A continuación se presenta la metodología que fue desarrollada y utilizada durante el estudio para la cuantificación de clozapina en plasma.

En un tubo de ensaye de 15 mL con tapón de rosca, se colocó 1 mL de muestra plasmática, se adicionaron 60 μ L de estándar interno (haloperidol 5 μ g/mL) y 400 μ L de NaOH 2 N, se agitó durante 15 segundos en vórtex. Posteriormente, se adicionó 5 mL de hexano:alcohol isoamílico (98.5:1.5, v/v), se agitó durante 2 minutos en vórtex y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos. La fase orgánica se separó y transfirió a un tubo de fondo cónico. El extracto se evaporó a sequedad en baño María a 50 °C bajo corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituyó con 120 μ L de metanol:agua HPLC (1:1) y se inyectaron 100 μ L de sobrenadante al cromatógrafo. En la figura 4 se muestra el diagrama de la metodología empleada para la extracción de la clozapina del plasma.

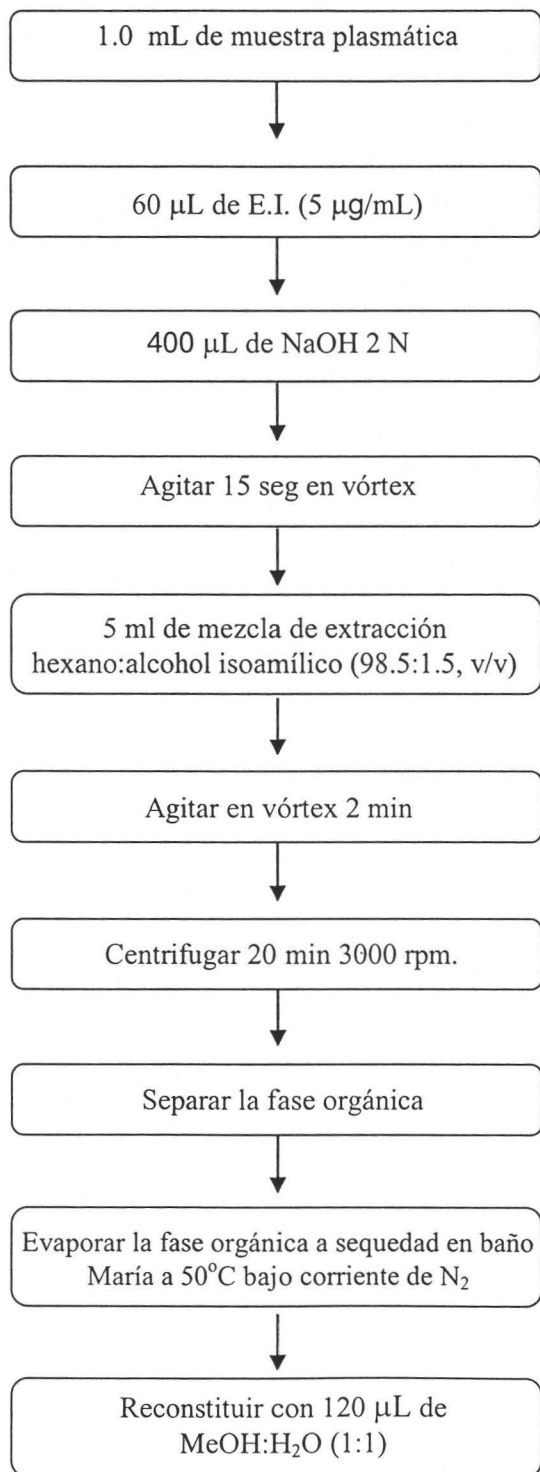


Figura 4. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras.

3.1.5 Validación del método analítico para cuantificar clozapina en plasma

El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución se validó de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en el apartado referente a la validación de métodos analíticos para realizar estudios de bioequivalencia.⁷⁴ A continuación se describen los parámetros evaluados.

3.1.5.1 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó preparando 3 curvas patrón de clozapina en metanol, en el intervalo de concentraciones de 15.6– 1000 ng/mL. Se tomó 1 mL de cada solución, se adicionaron 60 μ L de E.I. y se agitaron durante 15 segundos, las muestras se evaporaron en baño María a 50 °C bajo corriente de nitrógeno; el residuo se reconstituyó en 120 μ L de metanol:agua (1:1) y se inyectaron 100 μ L al cromatógrafo. Se gráfico la relación de alturas (CLZ/EI) contra la concentración y para cada curva se determinó, por un ajuste de mínimos cuadrados, el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2). Se considera que el sistema es lineal, si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a 0.99.

3.1.5.2 Linealidad del método

La linealidad del método se determinó preparando 3 curvas patrón de clozapina en plasma, en el intervalo de concentraciones de 15.6 – 1000 ng/mL. Las muestras se procesaron y se inyectaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.1.4.5. Se gráfico la relación de alturas (CLZ/EI) contra la concentración y para cada curva se determinó, por un ajuste de mínimos cuadrados, el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2). El método se considera lineal, si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a 0.99.

3.1.5.3 Precisión del método

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, analizando los puntos control de concentraciones conocidas de clozapina en plasma: alto (750 ng/mL), medio (200 ng/mL) y bajo (75 ng/ml).

3.1.5.3.1 Repetibilidad del método

Este parámetro se determinó evaluando por quintuplicado los puntos control de clozapina en plasma en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada control. El método es repetible, si el coeficiente de variación no es mayor al 15%.

3.1.5.3.2 Reproducibilidad del método

Para evaluar la reproducibilidad del método se analizaron por duplicado durante tres días continuos de trabajo los puntos control de clozapina en plasma, conservando las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada control. El método es reproducible, si el coeficiente de variación es menor al 15 %.

3.1.5.4 Exactitud del método

La exactitud del método se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad. Se determinó la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada punto control con respecto al valor nominal de la muestra. Para considerar que el método es exacto el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos deben estar dentro del +/- 15% del valor nominal de concentración.

$$\% \text{ Desv. Absoluta} = 100 * \left| \frac{(\text{Valor Nominal} - \text{Valor Experimental})}{\text{Valor Nominal}} \right|$$

3.1.5.5 Recobro absoluto

Se prepararon por triplicado los puntos control bajo, medio y alto (75 ng/mL, 200 ng/mL y 750 ng/mL, respectivamente) de clozapina en metanol y plasma de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.1.3 y 3.1.4.5. El porcentaje de recobro de cada punto control se determinó comparando la respuesta obtenida en plasma con respecto a la altura obtenida en metanol en la misma concentración. El porcentaje no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración ensayado.

3.1.5.6 Límite de cuantificación

Se analizó por quintuplicado la concentración de 15.6 ng/mL de clozapina en plasma. Se determinó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. Se consideró como el límite de cuantificación adecuado, si el valor promedio de las cinco repeticiones se encuentra dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación menor o igual al 20%.

3.1.5.7 Límite de detección

Se estableció como límite de detección, la concentración de clozapina cuya señal fue tres veces mayor a la línea basal.

3.1.5.8 Selectividad

Para evaluar la selectividad del método analítico, se analizaron muestras blanco de plasma y muestra de plasma adicionado con clozapina y haloperidol (E.I.), las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción mencionado en la sección 3.1.4. No deben presentar interferencias con el tiempo de retención de la clozapina ni con el registrado para el estándar interno.

3.1.5.9 Estabilidad de la muestra analítica

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que la clozapina podía permanecer estable en plasma durante su almacenamiento o proceso. Para ello se evaluó la respuesta de los tres puntos control (bajo, medio y alto) por duplicado bajo las siguientes condiciones:

3.1.5.9.1 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente

Se determinó analizando por duplicado los puntos control de clozapina en plasma los cuales se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

3.1.5.9.2 Estabilidad de la muestra procesada

Este parámetro se evaluó preparando por duplicado los puntos control de clozapina en plasma, los cuales fueron procesados de acuerdo al método, conservados a temperatura ambiente e inyectados al sistema cromatográfico en los siguientes tiempos: 0, 24 y 48 horas después de su preparación.

3.1.5.9.3 Estabilidad de la muestra en refrigeración

Para establecer la estabilidad de las muestras de clozapina bajo condiciones de refrigeración, se prepararon por duplicado los puntos control en plasma, las cuales se mantuvieron en refrigeración a 4.0°C y se analizaron los siguientes tiempos: 0, 8 y 15 días.

3.1.5.9.4 Estabilidad de la muestra en congelación

Se evaluó preparando por duplicado los puntos control de clozapina en plasma, las cuales se mantuvieron a -20°C y se analizaron al tiempo 0, 30 y 60 días.

El criterio de aceptación para la pruebas de estabilidad está definido por los valores de la desviación absoluta que no deberán ser mayores al 15% con respecto al valor original.

3.2 MONITOREO TERAPÉUTICO DE CLOZAPINA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA

El protocolo empleado para llevar a cabo esta investigación fue aprobado por el Comité de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. A continuación se presentan los criterios y procedimientos empleados en el trabajo.

3.2.1 Criterios de selección

En el estudio participaron 36 pacientes adultos hospitalizados o ambulatorios, que habían sido diagnosticados con esquizofrenia o un desorden psicótico de acuerdo a los criterios del DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4ª. edición), y presentaban resistencia a los antipsicóticos clásicos. Treinta pacientes pertenecían al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) y seis al Hospital Psiquiátrico Samuel Ramírez Moreno (HPSRM). En el Cuadro 6 se presentan las características generales de los pacientes.

- Criterios de inclusión

- a. Pacientes de 18 a 65 años que hayan iniciado o se encuentren bajo tratamiento con clozapina durante al menos 4 semanas.
- b. Pacientes que hayan aceptado y firmado el consentimiento informado (Anexo I y II).

- Criterios de exclusión

- a. Pacientes con alteraciones hepáticas manifestadas en la elevación de sus enzimas (AST, ALT, GGT, DHL).
- b. Pacientes con alteraciones hematológicas (leucocitos $< 3500/\text{mm}^3$) o que requieran por su padecimiento la administración conjunta de cualquier otro medicamento que sea potencialmente capaz de causar alteraciones hematológicas.

Trece de los participantes estaban bajo tratamiento adicional con valproato o con inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (fluoxetina, paroxetina y sertralina) para controlar crisis convulsivas o de depresión.

A cada uno de los pacientes se le hicieron pruebas hematológicas con la finalidad de asegurar su integridad durante su tratamiento con clozapina, por lo que su cuenta de leucocitos se mantuvo dentro del rango normal (Leucocitos $\geq 3500/\text{mm}^3$).

Además todos fueron tratados de acuerdo al protocolo de Helsinki y las regulaciones locales del Instituto para salvaguardar sus derechos y bienestar.

Cuadro 6. Características Generales de los Pacientes.

Edad (años):	36 ± 10.5
Género:	
Mujeres	10 (27.8 %)
Hombres	26 (72.2 %)
Fumadores:	10 (27.8%)
Peso (kg):	72 ± 13
Estatura (m):	1.67 ± 0.08
Duración del tratamiento con CLZ (años)	2.8 ± 1.6
Duración del padecimiento (años)	16 ± 9
Diagnóstico:	
Esquizofrenia desorganizada	5 (13.9 %)
Esquizofrenia indiferenciada	5 (13.9 %)
Esquizofrenia Paranoide	21 (58.3 %)
Esquizaafectivo	1 (2.8 %)
Trastorno mental	3 (8.3 %)

3.2.2 Régimen de dosificación

A los pacientes que iniciaban el tratamiento con clozapina se les administraron dosis graduales de clozapina hasta llegar a una dosis >200 mg/día después de dos semanas, la dosis se incrementó de acuerdo a la respuesta y la tolerancia del paciente con el medicamento. El régimen de dosificación de clozapina para los pacientes del INNN fue una dosis al día y para los del HPSRM la dosis total se dividió tres veces al día.

3.2.3 Muestra sanguínea

Después de 4 semanas bajo tratamiento con una dosis fija (concentración en estado estacionario), se tomó una muestra sanguínea de 5 mL, a las 13 ± 2.0 horas después de la última dosis de clozapina. Las muestras se colectaron en tubos heparinizados, se separó el plasma por centrifugación y se almacenaron en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis. Las muestras fueron identificadas de acuerdo a los datos personales del paciente y su registro clínico (Anexo III) y ninguna de las muestras se analizó en un período mayor a 15 días.

3.2.4 Determinación de clozapina en plasma

Los niveles de clozapina en plasma se determinaron por un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta a 230 nm previamente validado.

3.2.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los niveles plasmáticos de clozapina de pacientes esquizofrénicos, se analizaron empleando el software SPSS 10.0 aplicando diferentes pruebas estadísticas.

La correlación entre los niveles plasmáticos de clozapina y la dosis administrada y la respuesta terapéutica en la población mexicana, se analizó aplicando una prueba de correlación de Spearman.

La influencia de las variables: edad, peso, género, tabaquismo y el tratamiento concomitante (valproato y fluoxetina) en los niveles plasmáticos de clozapina, se evaluó empleando la prueba de t student para muestras independientes, considerado como diferencia significativa una $p < 0.05$.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLOZAPINA EN PLASMA

4.1.1 Optimización del método analítico para cuantificar CLZ en plasma

Los resultados obtenidos de la optimización del método analítico fueron los siguientes:

- La respuesta de la clozapina tanto en metanol como en plasma fue semejante a 230 y 254 nm. Dado que en ninguno de los casos se detectaron señales endógenas, se decidió utilizar la longitud de onda a 230 nm para el análisis cromatográfico.
- Se decidió emplear la columna X-Terra RP C₁₈, 250 x 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, debido a la respuesta cromatográfica de la clozapina que presentó una mejor simetría >0.8. En el caso de la columna Spherisorb ODS se obtuvieron picos coleados que dificultarían la separación con el estándar o bien su cuantificación por una integración errónea.
- La fase móvil de buffer de fosfatos 0.5 M (pH=4):acetonitrilo:metanol en la proporción: 60:25:15 v/v, presentó la mejor resolución. El tiempo de corrida aproximado fue de 9.0 minutos y los tiempos de retención para clozapina y el estándar interno fueron de 5.7 y 7.1 minutos respectivamente y la resolución entre los picos de interés de 4.8.
- La carbamazepina y el diazepam presentaron tiempos de retención de 4.9 y 16.4 minutos respectivamente y un recobro < 40 %, mientras que el haloperidol presentó un tiempo de retención de 7.1 y fue más estable químicamente en la muestra plasmática con un recobro de 83%, por lo que se decidió emplear este último como estándar interno.

4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

- El método de extracción consistió en una extracción simple con hexano:alcohol isoamílico (98.5:1.5, v/v) y agitación en vórtex durante 2 minutos, con el cual se consiguió un porcentaje de recuperación del fármaco alto (> 85 %), escasas impurezas en el cromatograma y repetibilidad en los resultados. Cabe mencionar, que en el presente trabajo se logró contar con un método analítico sencillo y rápido, a diferencia de los trabajos publicados por Lovdahl et al., Chung et al. y Avenosos et al., que utilizaban doble extracción, esto representa un ahorro en tiempo y disminución de costos.

Las condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras se resumen a continuación:

- Columna X-Terra RP-18, 5 μm , 4.6 X 250 mm
- Fase móvil: Buffer de fosfatos pH 4.0:Acetonitrilo:Metanol (60:25:15 v/v)
- Velocidad de flujo: 1.6 mL/min
- Longitud de onda: 230 nm
- Temperatura: 25 °C
- Tiempo de corrida: 9.0 min.

4.1. 2 Linealidad del Sistema

En el Cuadro 7 se presentan los valores promedio de la relación de alturas de las curvas preparadas en metanol en el intervalo de 15.6 - 1000 ng/mL, con un CV de 2.6 y 7.9 %. La gráfica correspondiente a la linealidad del sistema se muestra en la Figura 5. Dado que el coeficiente de correlación promedio fue de 0.999, se encontró que la relación matemática entre la concentración y respuesta es continua dentro del intervalo de concentraciones de trabajo.

Cuadro 7. Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de CLZ.

Concentración (ng/mL)	Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
15.6	0.2012	0.0120	6.0
20	0.2422	0.0192	7.9
31.2	0.3554	0.0257	7.2
62.5	0.7519	0.0336	4.7
125	1.4954	0.0768	5.1
250	3.0270	0.2027	6.7
500	5.7197	0.1461	2.6
1000	11.6070	0.4357	3.8

b	0.02801
m	0.01156
r	0.99990
r²	0.99980

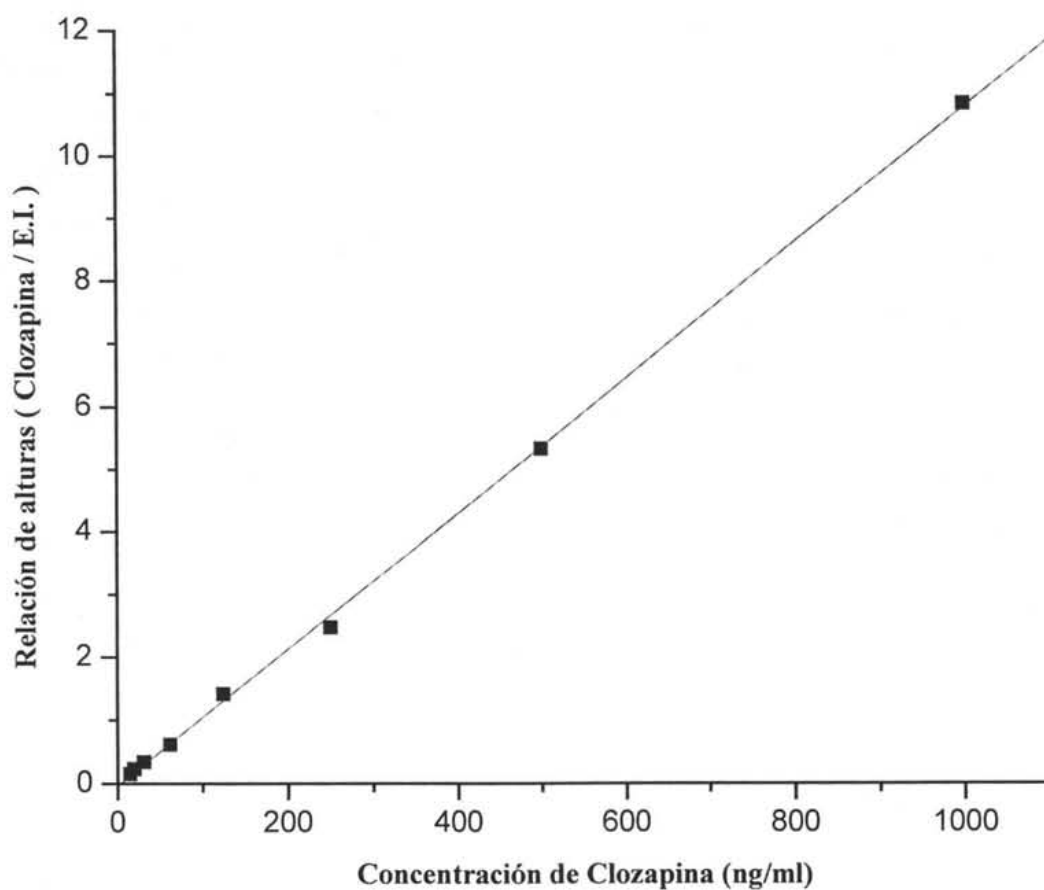


Figura 5. Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de CLZ en metanol.

4.1.2 Linealidad del método

En el Cuadro 8 se presentan los valores promedio de la relación de alturas de las 3 curvas preparadas en plasma, en donde se observa que el CV varía entre 1.2 y 13.2 %. En la Figura 6 se muestra la gráfica correspondiente a la linealidad del método analítico. El rango de concentraciones de 15.6 y 1000 ng/mL, con un coeficiente de correlación promedio de 0.9997, indica que la relación matemática entre la concentración y respuesta es continua dentro del intervalo de concentraciones de trabajo.

Cuadro 8. Linealidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma.

Concentración (ng/mL)	Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
15.6	0.1516	0.0152	10.0
20	0.2326	0.0307	13.2
31.2	0.3354	0.0279	8.3
62.5	0.6107	0.0535	8.8
125	1.4112	0.1795	12.7
250	2.4742	0.0498	2.0
500	5.3326	0.5143	9.6
1000	10.8405	0.1293	1.2

b -0.03796
m 0.01082
r 0.99971
r² 0.99942

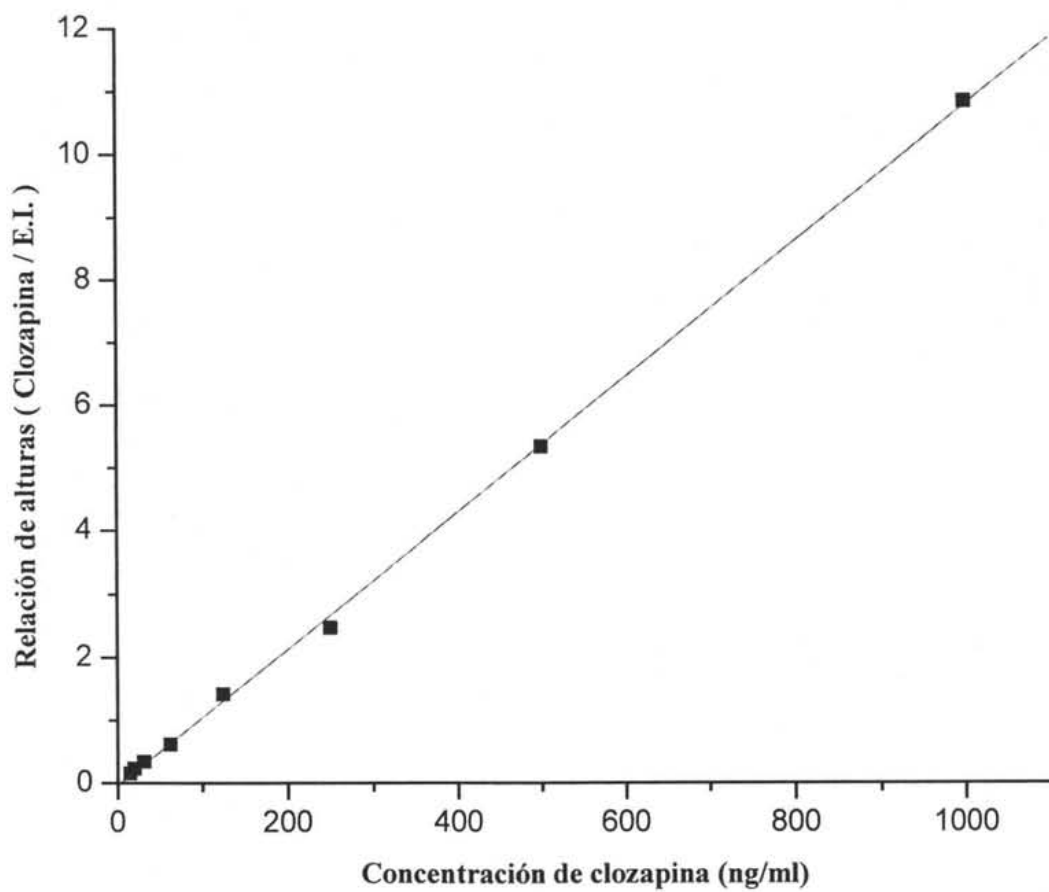


Figura 6. Linealidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma.

4.1.3 Precisión del método

4.1.3.1 Repetibilidad del método

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de la repetibilidad del método analítico de CLZ en plasma, al evaluar por quintuplicado los controles bajo, medio y alto. Los resultados muestran que el rango de los coeficientes de variación osciló entre 3.8 y 10.7 %; por lo tanto, según las especificaciones, el método analítico es repetible ya que los coeficientes de variación no son mayores al 15 %.

Cuadro 9. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma.

Concentración ng/mL	Relación de alturas CLZ / E.I.					Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
75	0.8880	0.9900	0.8604	1.0618	0.8210	0.92424	0.0991	10.72
200	1.8400	1.9100	1.8110	1.7940	1.9610	1.8632	0.0704	3.75
750	7.7281	7.8636	7.2403	8.4580	7.8921	7.83642	0.4351	5.55

4.1.3.2 Reproducibilidad del método

En el Cuadro 10 se encuentran los resultados de la reproducibilidad del método analítico para cuantificar clozapina en plasma para cada día evaluado. Dado que los coeficientes de variación se encuentran entre 4.2 y 11.2 % se demostró que el método analítico es reproducible bajo las condiciones estudiadas.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cuadro 10. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de CLZ en plasma.

Concentración (ng/mL)	Relación de Alturas Promedio CLZ / E.I.			Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
75	0.8742	0.9225	0.7400	0.8456	0.0946	11.19
200	1.875	2.2047	1.9895	2.0231	0.1674	8.27
750	7.8778	8.1114	7.4597	7.8163	0.3302	4.22

4.1.4 Exactitud del método

En el Cuadro 11 se muestran los resultados promedio de los valores experimentales en alturas de los puntos control, así como la variación con respecto al valor nominal, representada como porcentaje de desviación absoluta. Se puede observar que el método es exacto al cumplir con la especificación establecida que indica que la desviación debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

Cuadro 11. Exactitud del método para cuantificar CLZ en plasma.

Concentración (ng/mL)	Relación de Alturas Promedio CLZ / E.I.		Valor Experimental Promedio	Valor Nominal	% Desviación Absoluta
	Repetibilidad	Reproducibilidad			
75	0.9242	0.8456	0.8849	0.7736	9.30
200	1.8632	2.0231	1.9431	2.0231	4.86
750	7.8364	7.8163	7.8264	7.8163	3.24

4.1.5 Recobro absoluto

En el Cuadro 12 se muestra el porcentaje de recobro obtenido para clozapina en plasma. Se puede observar que la recuperación osciló entre 89 y 92%. Las especificaciones indican que el porcentaje de recuperación no debe ser necesariamente 100% pero debe ser consistente en el rango de concentraciones estudiado, por lo que el método cumple con los requisitos establecidos.

Cuadro 12. Recobro absoluto de CLZ en plasma.

Concentración (ng/mL)	Relación de alturas en metanol promedio	Relación de alturas en plasma promedio	% Recobro
75	0.9178	0.8455	92.12 ± 8.15
200	2.2623	2.0231	89.42 ± 7.3 9
750	8.7285	7.8163	89.55 ± 3.78

4.1.6 Límite de cuantificación

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de relación de alturas de clozapina/EI para la concentración de 15.6 ng/mL, donde se observa que al cuantificar por quintuplicado dicha concentración, se obtiene un CV menor al 20%. Para la concentración de 10 ng/ml no se cumplió con este criterio; por lo tanto, la concentración mínima que se cuantifica con precisión y exactitud bajo las mismas condiciones normales de trabajo es de 15.6 ng/mL.

Cuadro 13. Límite de cuantificación.

Concentración (ng/mL)	Relación de Alturas
15.6	0.1264
15.6	0.1611
15.6	0.1300
15.6	0.1477
15.6	0.1204
Promedio	0.1371
Desviación Estándar	0.0168
CV (%)	12.27
% Desviación Absoluta	3.55

4.1.7 Limite detección

El límite de detección fue de 10 ng/mL. La altura encontrada para esta concentración fue de 1.6, encontrándose que la respuesta correspondiente es tres veces mayor de la línea basal.

4.1.8 Selectividad

En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran los cromatogramas representativos de un blanco de plasma, una muestra de plasma adicionada con clozapina y haloperidol y la de un paciente bajo tratamiento con clozapina. Dado que no se encontraron interferencias con los picos de interés, el método se considera selectivo para la cuantificación de clozapina en plasma.

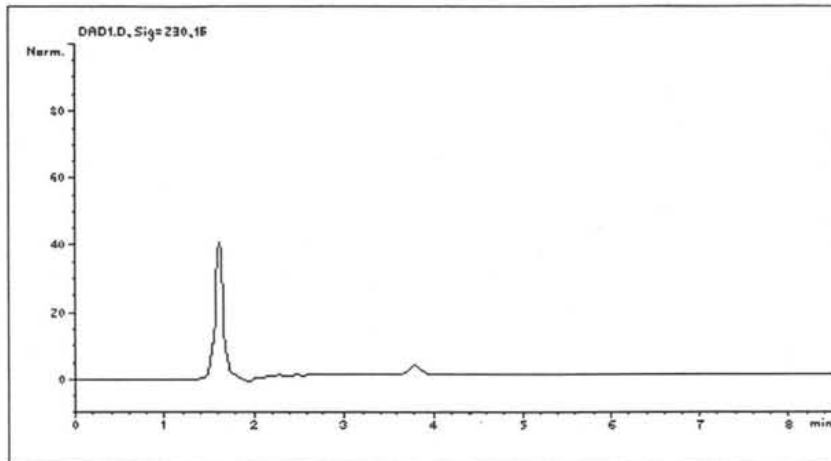


Figura 7. Cromatograma de un blanco de plasma.

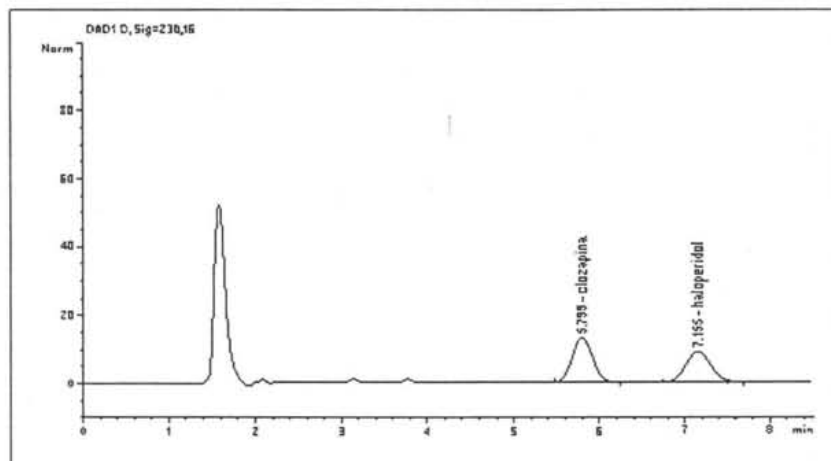


Figura 8. Cromatograma de una muestra de clozapina en plasma adicionada con E.I.

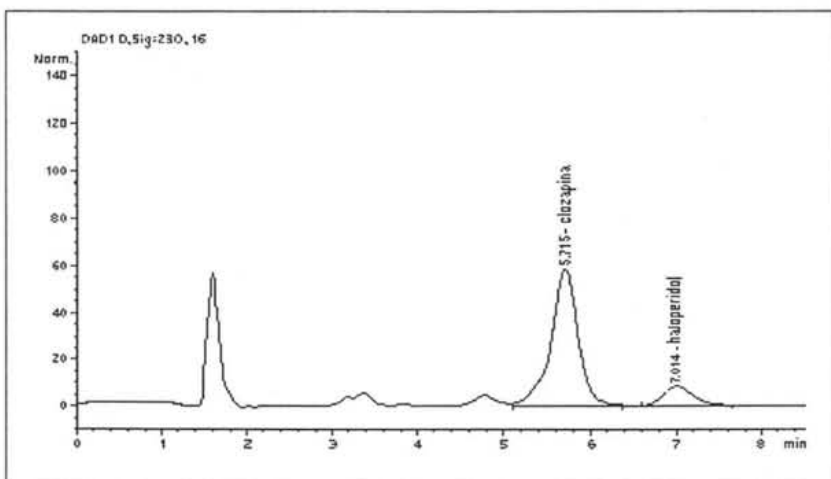


Figura 9. Cromatograma de un paciente bajo tratamiento con clozapina.

4.1.9 Estabilidad de la muestra analítica

4.1.9.1 Estabilidad a temperatura ambiente

En el Cuadro 14 se presentan los resultados del análisis de las muestras mantenidas a temperatura ambiente. Dado que el valor de la desviación absoluta fue menor al 15% con respecto al valor original, se concluye que la clozapina es estable a temperatura ambiente durante 24 horas después de su preparación.

Cuadro 14. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

	Control Bajo 75 ng/mL	Control Medio 200 ng/mL	Control Alto 750 ng/mL
Conc. Recuperada	77.16	202.79	730.17
Conc. Recuperada	71.16	184.75	748.72
Promedio	74.16	193.77	739.45
CV (%)	5.7	6.6	1.8

4.1.9.2 Estabilidad de la muestra procesada

En el Cuadro 15 se muestran los resultados obtenidos al analizar las muestras procesadas a las 24 y 48 horas después de su preparación. Dado que la desviación absoluta fue menor al 15% con respecto al valor original, se demuestra que es estable al menos durante 48 horas.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cuadro 15. Estabilidad de la muestra procesada.

	Control Bajo 75 ng/mL		Control Medio 200 ng/mL		Control Alto 750 ng/mL	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Conc. Recuperada	78.10	85.30	163.80	189.98	674.26	752.98
Conc. recuperada	72.66	70.06	196.11	181.40	765.11	759.76
Promedio	75.34	77.68	179.95	185.69	719.68	756.37
CV (%)	5.0	13.9	12.7	3.3	8.9	0.6

4.1.9.3 Estabilidad en refrigeración (4.0 °C)

En el Cuadro 16 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas almacenadas bajo condiciones de refrigeración a 4.0°C. Se puede observar que el porcentaje de desviación absoluta es menor al 15%, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas con clozapina son estables hasta 15 días en condiciones de almacenamiento en refrigeración.

Cuadro 16. Estabilidad de las muestras en refrigeración.

	Control Bajo 75 ng/mL		Control Medio 200 ng/mL		Control Alto 750 ng/mL	
	8 Día	15 Día	8 Día	15 Día	8 Día	15 Día
Conc. Recuperada	77.70	73.05	192.97	181.92	725.24	768.94
Conc. Recuperada	79.08	77.32	205.47	193.14	700.88	699.66
Promedio	78.39	75.18	199.22	187.53	713.06	734.30
CV (%)	1.2	4.0	4.4	4.2	2.4	6.7

4.1.9.4 Estabilidad en congelación (-20 °C)

En el Cuadro 17 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas de clozapina mantenidas en congelación hasta 65 días después de su preparación. El porcentaje de desviación absoluta fue menor al 15%, lo cual indica que las muestras pueden almacenarse durante 65 días a -20°C sin presentar degradación.

Cuadro 17. Estabilidad de las muestras en congelación.

	Control Bajo 75 ng/mL		Control Medio 200 ng/mL		Control Alto 750 ng/mL	
	35 Día	65 Día	35 Día	65 Día	35 Día	65 Día
Conc. Recuperada	68.58	74.53	170.47	158.47	738.36	802.27
Conc. Recuperada	79.52	63.40	171.36	192.34	746.50	712.79
Promedio	74.04	68.97	170.92	175.42	742.43	757.53
CV (%)	10.4	11.4	0.4	13.6	0.8	8.3

4.2 MONITOREO TERAPEÚTICO DE CLOZAPINA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA

Una vez validado el método analítico para cuantificar clozapina en plasma, se procedió a realizar el estudio de monitoreo terapéutico en pacientes diagnosticados con esquizofrenia y/o trastorno mental.

4.2.1 Determinación de los niveles de clozapina en plasma

En el Cuadro 18 se presentan los valores de los niveles de clozapina en estado estacionario, así como los datos de género, edad, peso, altura, tabaquismo y dosis de los 36 pacientes que participaron en el estudio. En la Figura 10 se puede observar que la dosis que se prescribió a este tipo de pacientes es muy variable: 50 - 600 mg/día (promedio = 281 ± 142) y hay una ligera tendencia al prescribir dosis de 400 y 100 mg/día (28 y 17 %).

Con la información obtenida se analizó la relación entre la edad, peso, género y tabaquismo con los niveles de clozapina en plasma de los pacientes que estaban bajo monoterapia ($n = 23$) y también se determinó la influencia del tratamiento concomitante con valproato e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina ($n = 13$).

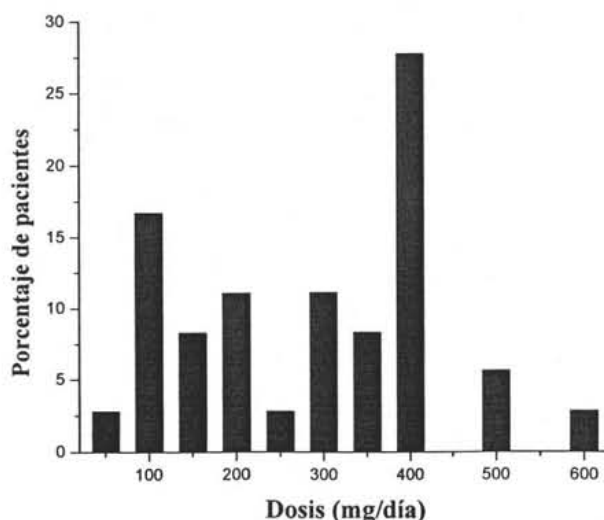


Figura 10. Dosis de clozapina administrada en la población mexicana.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cuadro 18. Características demográficas de los pacientes.

Paciente	Género	Edad (años)	Peso (kg)	Altura (m)	Fumador	Dosis (mg/día)	Dosis (mg/kg)	CLZ (ng/mL)
1	M	21	50.8	1.58	No	400	7.87	129.3
2	M	31	84.0	1.68	Si	600	7.14	337.7
3	M	41	76.0	1.63	No	400	5.26	399.5
4	M	29	55.0	1.50	No	400	7.27	360.7
5	M	34	63.4	1.67	No	400	6.31	200.1
6	M	27	81.0	1.75	No	300	3.70	682.6
7	M	32	63.2	1.64	Si	400	6.33	461.7
8	M	49	54.0	1.70	No	250	4.63	122.0
9	M	44	91.0	1.86	No	400	4.40	397.3
10	F	41	71.0	1.65	Si	400	5.63	485.9
11	M	36	81.0	1.66	No	400	4.94	794.7
12	F	42	60.5	1.63	No	100	1.65	99.3
13	F	56	64.0	1.64	No	500	7.81	869.4
14	M	28	67.0	1.76	No	500	7.46	454.5
15	M	24	57.2	1.56	No	100	1.75	464.5
16	M	52	64.0	1.68	No	300	4.69	1021.7
17	F	28	85.0	1.59	No	150	1.76	369.7
18	M	26	77.0	1.65	Si	200	2.60	164.6
19	M	33	75.0	1.73	No	200	2.67	399.5
20	M	50	98.0	1.85	No	50	0.51	57.3
21	F	19	54.0	1.62	No	150	2.78	660.3
22	M	23	86.0	1.78	No	350	4.07	1055.5
23	F	36	64.0	1.66	No	200	3.13	399.8
24	M	24	80.0	1.72	No	400	5.00	279.0
25	M	35	56.0	1.68	No	300	5.36	186.4
26	M	34	84.0	1.75	Si	350	4.17	528.8
27	M	42	84.0	1.70	No	100	1.19	140.4
28	M	48	57.0	1.70	Si	400	7.02	116.2
29	M	30	83.0	1.76	Si	100	1.20	77.8
30	F	47	71.0	1.60	No	200	2.82	641.3
31	F	38	83.0	1.56	No	300	3.61	556.0
32	F	32	68.0	1.58	No	125	1.84	416.9
33	M	60	93.0	1.70	Si	100	1.08	38.1
34	M	30	63.0	1.70	Si	350	5.56	969.7
35	F	23	56.0	1.62	Si	150	2.68	203.3
36	M	50	89.0	1.70	No	100	1.12	310.8

4.2.2 Relación entre la dosis y los niveles de clozapina en plasma

En la Figura 11 se muestra los niveles de clozapina en plasma de todos los pacientes en relación a la dosis ajustada por peso, en el cual se puede observar la gran variabilidad interindividual con niveles que van de 38 a 1056 ng/mL, por consiguiente, no se encontró relación entre la dosis ponderal (mg/kg) y los niveles plasmáticos de clozapina (coeficiente de correlación de Spearman de 0.280).

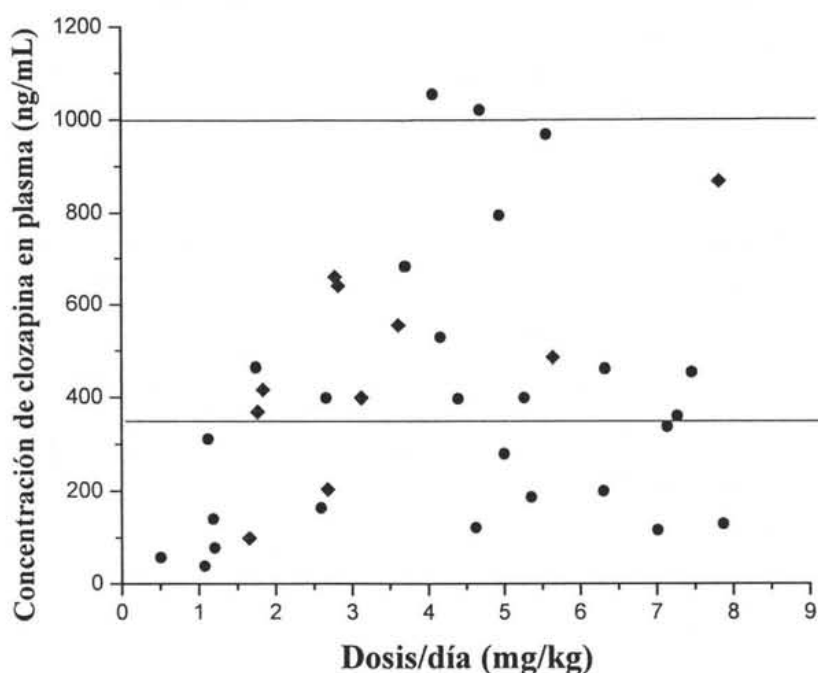


Figura 11. Relación entre la concentración plasmática en estado estacionario y la dosis diaria de clozapina en 36 pacientes bajo terapia incluidos en el estudio.

La gran variabilidad de los niveles plasmáticos de clozapina obtenida tras la administración de una dosis determinada de un individuo a otro en el presente estudio, puede estar asociada a diversos factores como la edad, peso, género, interacciones con otros medicamentos y a los hábitos de vida tales como el tabaquismo. En el Cuadro 19 se presentan los resultados generales del análisis de los niveles de clozapina en plasma en relación a las diferentes variables.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Considerando que el margen terapéutico de clozapina reportado en otros países es de 350-1000 ng/mL, se aplicó dicho criterio a los niveles obtenidos en pacientes mexicanos, lo cual indicaría que el 50% de los pacientes presentaría efecto terapéutico, mientras que el resto presentaría ineficacia o bien toxicidad. En el caso del estudio, dos pacientes presentaron niveles arriba de 1000 ng/mL; aunque, ninguno de ellos presentó efectos adversos severos que los limitaran a seguir con el tratamiento; lo cual indica que probablemente el margen terapéutico para la población mexicana sea más amplio que el reportado en otros países.

Cuadro 19. Influencia del género, hábitos de fumar y tratamiento concomitante sobre los niveles de clozapina en plasma.

	n (%)	Dosis (mg/día)	Nivel CLZ (ng/mL)
19 - 36 años	12 (52)	285 ± 147	378 ± 198
37 - 60 años	11 (48)	227 ± 140	304 ± 298
54 - 76 kg	12 (52)	264 ± 118	359 ± 272
77 - 98 kg	11 (48)	250 ± 173	325 ± 232
Mujeres	7 (30)	196 ± 110	399 ± 196
Hombres	16 (70)	284 ± 151	318 ± 270
No fumador	16 (70)	233 ± 126	376 ± 275
Fumador	7 (30)	314 ± 175	268 ± 188
Monoterapia	23 (64)	258 ± 144	343 ± 248
Politerapia - AVP	5 (14)	320 ± 130	342 ± 248
Politerapia - ISRS	8 (22)	325 ± 146	656 ± 271

4.2.3 Influencia de la edad y peso en los niveles de clozapina en plasma

Con el fin de evaluar la influencia de la edad en los niveles plasmáticos de clozapina se dividió el grupo en pacientes menores o igual a 36 años y mayores a 36 años, encontrando que no existe diferencia entre los grupos (378 vs 304 ng/mL). Al analizar la influencia del peso entre el grupo de 54 - 76 kg (359 ng/mL) y el de 77-98 kg (325 ng/mL), se encontró que no existe diferencia significativa en los niveles de clozapina entre los grupos, lo que indica que los niveles plasmáticos no están relacionados directamente con el peso. Con base a esta información, se encontró que la edad y el peso no influyen en los niveles plasmáticos de clozapina en la población mexicana estudiada.

4.2.4 Influencia del género en los niveles de clozapina en plasma

En la Figura 12 se muestran los niveles y dosis de clozapina en hombres y mujeres. Al analizar los resultados, se encontró que las mujeres presentan niveles más altos que la de los hombres (400 vs 318 ng/ml) a pesar de que estaban bajo tratamiento con dosis más bajas (196 vs 284 mg/día). Dado al pequeño número de mujeres que participaron en el estudio, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Sin embargo, se observó la tendencia de que las mujeres presentan niveles 25% más altos que los hombres. Esta diferencia puede explicarse por la menor actividad del CYP1A2 que presentan las mujeres.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

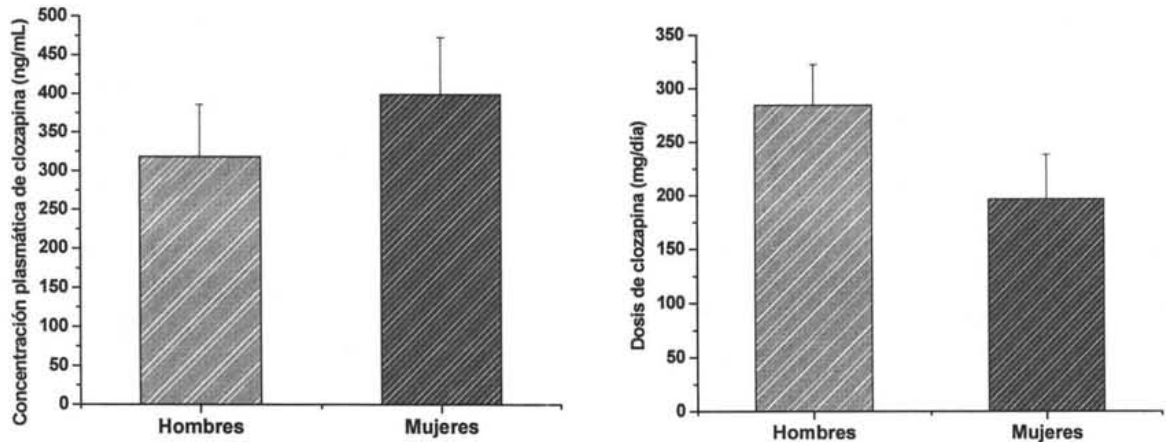


Figura 12. Dosis y niveles de clozapina en plasma en hombres y mujeres.

4.2.5 Influencia del tabaquismo en los niveles de clozapina en plasma

Se ha demostrado que el tabaquismo induce el CYP1A2, por consiguiente disminuye los niveles de clozapina en plasma en aquellas personas con dicho hábito. Los resultados del presente trabajo (Figura 13) concuerdan con lo reportado previamente, ya que en los fumadores las concentraciones de clozapina fueron un 30% menor a la de los no fumadores (268 vs 376 ng/ml), aún cuando tomaban dosis más altas (314 vs 233 mg/día). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones, lo cual puede deberse al tamaño de la muestra bajo estudio.

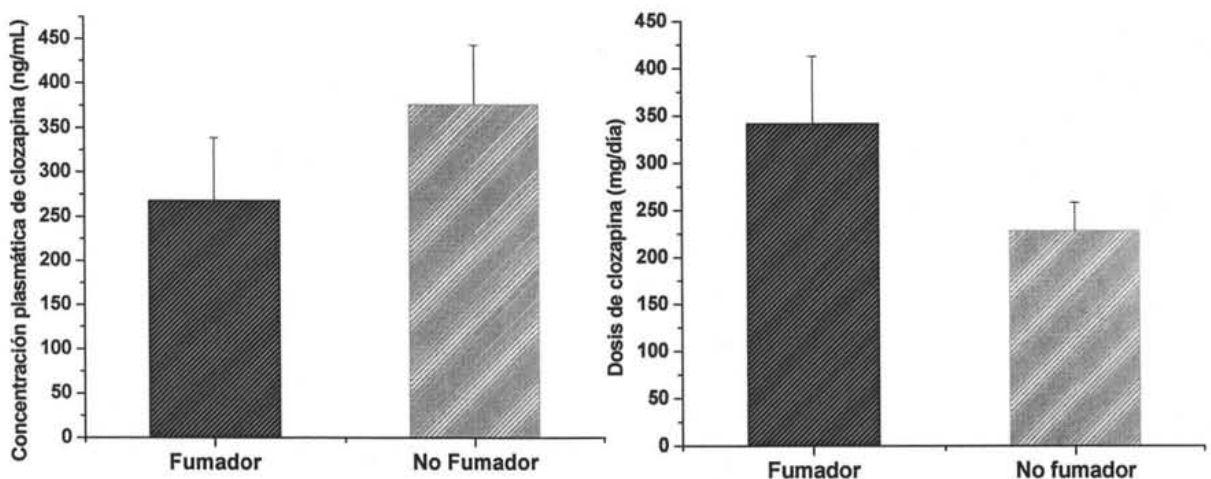
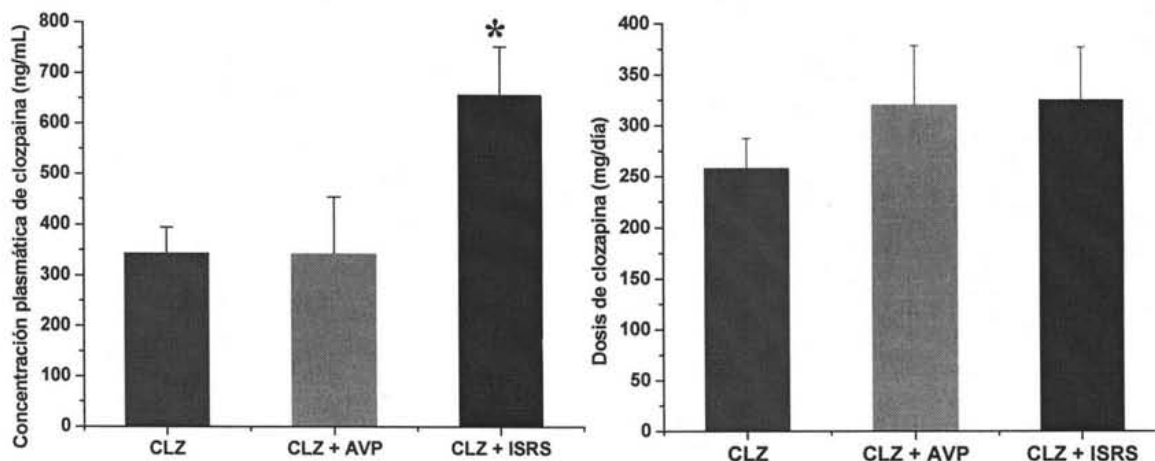


Figura 13. Dosis y niveles de clozapina en plasma en fumadores y no fumadores.

4.2.6 Influencia del tratamiento concomitante con valproato e ISRS

Al comparar los niveles plasmáticos de aquellos pacientes bajo monoterapia con clozapina con aquellos que tomaban valproato (AVP), se encontró que los niveles son semejantes (343 vs 342 ng/ml) (Figura 14). Se sabe que el ácido valproico se une altamente a proteínas plasmáticas, por lo que se esperaría que la administración concomitante con fármacos que también se unen altamente a proteínas puedan ocasionar toxicidad en el individuo. No obstante, a pesar del tamaño de muestra los resultados permiten asumir que no existe interacción en la unión a proteínas entre estos fármacos.



* Estadísticamente significativo en relación a la monoterapia con CLZ ($p < 0.05$, prueba t student)

Figura 14. Relación entre los niveles plasmáticos de clozapina y el tratamiento concomitante con valproato e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina.

Al hacer el análisis de el tratamiento concomitante de clozapina con los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), se obtuvieron niveles más altos en los pacientes bajo tratamiento con antidepresivos que en los pacientes que recibían monoterapia con clozapina (656 vs 343 ng/ml) (Figura 14), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p < 0.05$). El efecto de la fluoxetina sobre los niveles de clozapina se puede atribuir al efecto inhibidor del CYP3A4 por su principal metabolito norfluoxetina y a su alta unión a proteínas plasmáticas.

De acuerdo a estos resultados, la administración conjunta de clozapina con un ISRS, podría representar una ventaja terapéutica para aquellos pacientes que requieren dosis altas para presentar el efecto terapéutico, ya que se podría disminuir la dosis de clozapina y con ello reducir los eventos adversos asociados a este fármaco.

4.2.7 Efectos adversos

Los efectos adversos que se presentaron en la población estudiada fueron leves. No se presentó leucopenia ni agranulocitosis. Los síntomas más frecuentes fueron: somnolencia, estreñimiento y aumento de peso, como se observa en la Figura 15. Cabe mencionar que a uno de los pacientes se le suspendió el tratamiento con clozapina al comprobarse que presentaba daño hepático.

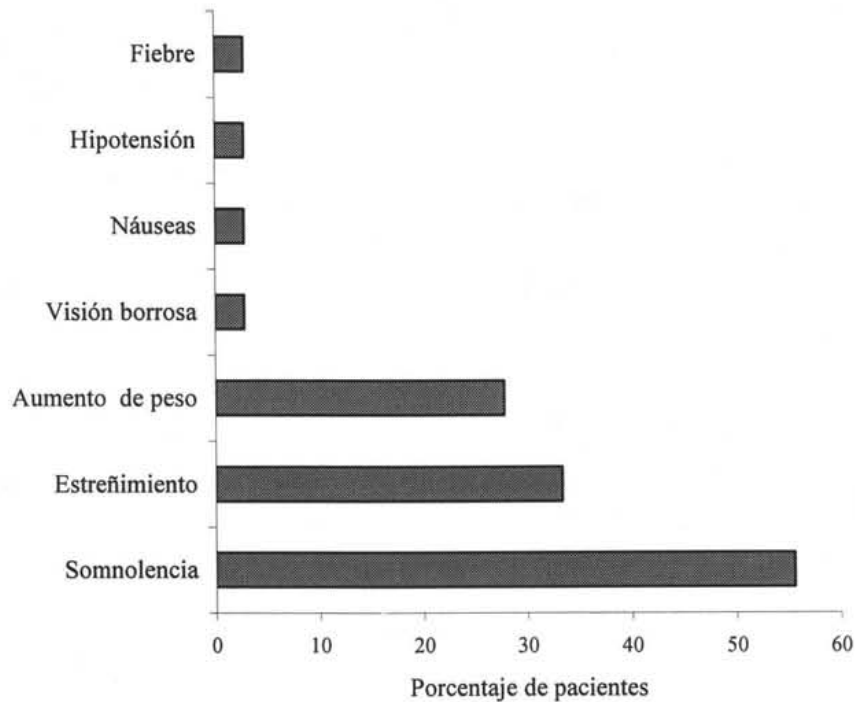


Figura 15. Efectos adversos debido al tratamiento con clozapina.

4.2.9 Nomograma de Perry

En 1998 Perry y colaboradores elaboraron un nomograma para predecir la concentración en estado estacionario de clozapina. En la Figura 16 se presenta el nomograma a partir del cual se elaboraron las siguientes ecuaciones:⁷⁵

Hombres:

$$\text{Clozapina (ng/mL)} = 111 (\text{fumador}) + 0.464 (\text{dosis}) + 145$$

Mujeres:

$$\text{Clozapina (ng/mL)} = 111 (\text{fumador}) + 1.590 (\text{dosis}) - 149$$

Donde: si es fumador = 0, no fumador = 1 y la dosis es expresada en mg/día.

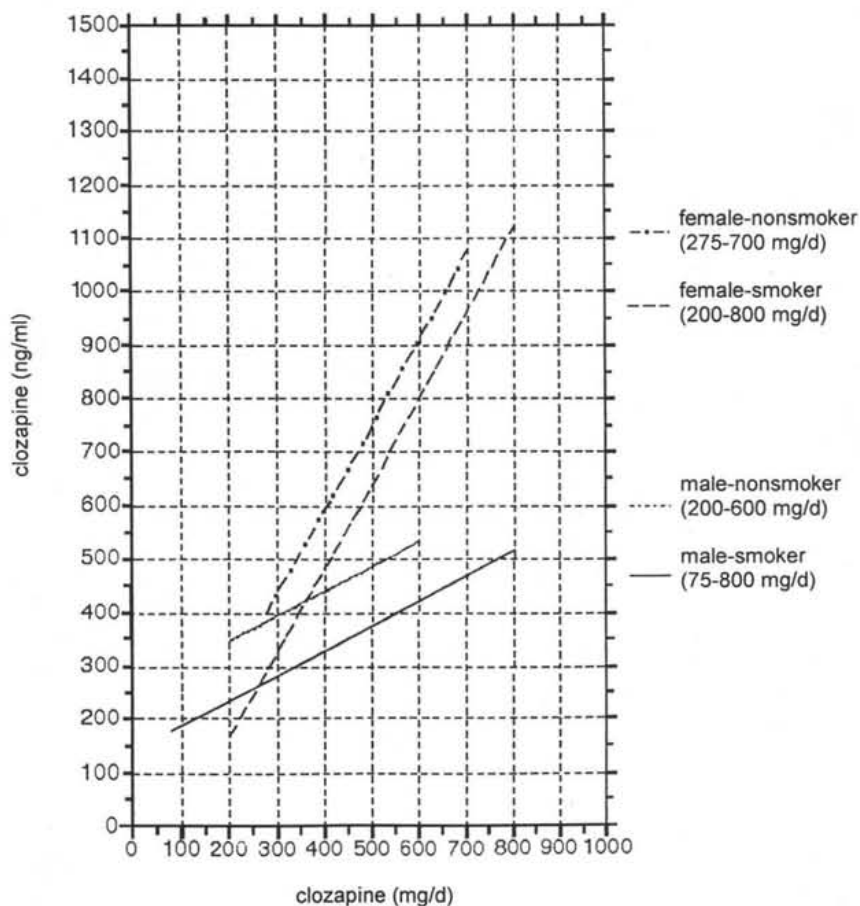


Figura 16. Nomograma de Perry.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al aplicar el nomograma de Perry para predecir los niveles plasmáticos de los pacientes bajo monoterapia que participaron en el estudio se encontró que solamente fue útil para predecir los niveles del 17% de la población (1 mujer fumadora y 4 hombres no fumadores), en este grupo los valores se encontraron dentro del $\pm 15\%$ respecto al valor real, mientras que en el 83% de los pacientes los niveles fueron 85% más bajos ó 115% más altos de los esperado, por lo que este nomograma no fue capaz de predecir los niveles de la población mexicana. En el Cuadro 20 se muestran los resultados que se determinaron por las ecuaciones de Perry.

Cuadro 20. Comparación de los niveles de clozapina en plasma obtenidos en el presente estudio con los predeterminados por Perry.

Paciente	Dosis (mg/día)	Nivel CLZ obtenido (ng/ml)	Nivel CLZ predeterminado (ng/mL)
2	600	337.7	423.4
3	400	399.5	441.6
5	400	200.1	441.6
8	250	122	372
10	400	485.9	487
11	400	794.7	441.6
12	100	99.3	63.59
16	300	1021.7	395.2
17	150	369.7	113.59
18	200	164.6	237.8
19	200	399.5	348.8
20	50	57.3	279.2
21	150	660.3	113.59
24	400	279	441.6
25	300	186.4	395.2
26	350	528.8	307.4
27	100	140.4	302.4
28	400	116.2	330.6
31	300	556	263.59
32	125	416.9	88.59
33	100	38.1	191.4
35	150	203.3	89.5
36	100	310.8	302.4

5. CONCLUSIONES

- El método analítico para la cuantificación de la clozapina en plasma (15.6 – 1000 ng/mL) fue confiable, rápido y sencillo por lo que puede ser utilizado para llevar a cabo estudios farmacocinéticos y de monitoreo terapéutico.
- Existe una gran variabilidad interindividual en los niveles de la clozapina en estado estacionario los cuales no se ven influenciados por el peso ni la edad.
- Los niveles de clozapina son mayores en aquellos pacientes bajo tratamiento concomitante con los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina.
- La gran variabilidad interindividual encontrada justifica el monitoreo de clozapina en pacientes con esquizofrenia refractaria, en situaciones específicas como: respuesta baja a dosis rutinarias, señales de toxicidad o eventos adversos relacionados con niveles plasmáticos altos, en el uso concomitante de fármacos que interaccionan con el CYP1A2 y en pacientes fumadores que están alterando el consumo usual de tabaco.

6. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo mostraron la gran variabilidad en los niveles plasmáticos de clozapina en pacientes con esquizofrenia, lo cual demuestra la necesidad de aumentar el tamaño de muestra y continuar con este trabajo de investigación con el fin de:

- Encontrar la relación de los niveles de clozapina con su respuesta terapéutica a partir de una adecuada evaluación clínica, para establecer el margen terapéutico de la población mexicana.
- Establecer el efecto del género, los hábitos de fumar, así como la interacción con otros fármacos en los niveles de clozapina en plasma.
- Individualizar la farmacoterapia, para aumentar la eficacia, disminuir la toxicidad y por ende aumentar la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Baldessarini R, Frankenburg F, 1991. Clozapine a novel antipsychotic agent. *N Eng J Med*, **324**: 746-754.
2. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H, 1988. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. *Arch Gen Psychiatry*, **45**: 789-796.
3. Alvir J, Lieberman J, Safferman A, Schwimmer J, Schaaf J, 1993. Clozapine induced agranulocytosis. *N Eng J Med*, **329**: 162-167.
4. Adams R, Victor M, Romper A. Principios de Neurología. 6ª ed., Edt. Mc Graw-Hill Interamericana, México 1999, p-p 1331-1343.
5. Goldman H. Psiquitría General. 5ª ed., Edt. El manual moderno, México 2001, p-p 211-215, 285-305.
6. Goodman and Gilman. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Vol. 1, 9ª ed., Edt. Mc Graw Hill Interamericana, México DF, pp. 661-704.
7. Murria R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. Bioquímica de Harper. 13ª ed., Edt. El Manual Moderno, México 1994, p-p 903-905.
8. Katzung Bertram F. Farmacología básica y clínica. 7ª ed., Edt. El Manual Moderno, México 1999, p-p 541-548.
9. Barnes T, McEvedy C, Nelson H, 1996. Management of treatment resistant schizophrenia unresponsive to clozapine. *Br J Psychiatry*, **169** (Suppl 31): 31-40.
10. Lerner V, Libov I, Kotler M, Strous R, 2004. Combination of atypical antipsychotic medication in the management of treatment-resistant schizophrenia and schizoaffective disorder. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, **28**: 89-98.
11. <http://www.nlm.nih.gov>
12. Budavari S. (ed.). The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway, New Jersey; Merck and Co., Inc., 1989.
13. Peacock L, Solgaard T, Lublin H, Gerlach J, 1996. Clozapine versus typical antipsychotics a retro- and retrospective study of extrapyramidal side effects. *Psychopharmacology*, **124**: 188-196.
14. Ciapparelli A, Dell'Osso L, Pini S, Chiavacci M, Fenzi M, Cassano G, 2000. Clozapine for treatment-refractory schizophrenia, schizoaffective disorder, and psychotic bipolar disorder: a 24-month naturalistic study. *J Clin. Psychiatry*, **61** (5): 329-334.

15. Durif F, Debilly B, Galitzky M, Morand D, Viallet F, Borg M, Thobois S, Broussolle E, Rascol O, 2004. Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease. *Neurology*, **62**: 381-388.
16. Pollack P, Tison F, Desteé A, Peré J, Senard J, Durif F, Bourdeix I, 2004. Clozapine in drug induced psychosis in Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled study with open follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75**: 689-695.
17. Gardner E, Jianping C, Paredes W, 1994. Therapeutic drug monitoring of clozapine in relapse prevention: a five-year prospective study. *J Clin Psychiatry*, **55** (suppl B):15-21.
18. Meltzer H, 1994. An overview of the mechanism of action of clozapine. *J Clin Psychiatry*, **55** (suppl B): 47-51.
19. Ackenheil M, 1989. Clozapine-pharmacokinetic investigations and biochemical effects in man. *Psychopharmacology (Berl)*, **99**: S32-S37.
20. Jann M, Grimsley S, Gray E, Chang W, 1993. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine. *Clin Pharmacokinet*, **24** (2): 161-176.
21. Guitton C, Abbar M, Kinowsky JM, Chabrand P, Bressolle F, 1998. Clozapine and metabolite concentrations during treatment of patients with chronic schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*, **18** (6): 470-476.
22. Schaber, Stevens, Gaertner, Dietz, Breyer-Pfaff., 1998. Pharmacokinetics of clozapine and its metabolites in psychiatric patients: plasma protein binding and renal clearance. *Br J Clin Pharmacol*, **46**(5): 453-459.
23. Drug information for the health care professional USPDI 2000. Vol. I; 20 ed., p-p 954-958.
24. Doude van Troostwijk L, Koopmans R, Vermeulen H, Guchelar H, 2003. CYP1A2 activity is an important determinant of clozapine dosage in schizophrenic patients. *Eur J Pharm Sci*, **20**: 451-457.
25. Fischer V, Vogels B, Maurer G, Tynes R, 1992. The antipsychotic clozapine is metabolized by the polymorphic human microsomal and recombinant cytochrome P450 2D6. *J Pharmacol Exp Ther*, **260**: 1355-1360.
26. Arranz M, Dawson E, Shaikh S, 1995. Cytochrome P4502D6 genotype does not determine response to clozapine. *Br J Clin Pharmacol*, **39**: 417-420.
27. Prior T, Chue P, Tibbo P, Baker G, 1999. Drug metabolism and atypical antipsychotics. *Eur Neuropsychopharmacol*, **9**: 301-309.

28. Dain J, Nicoletti J, Ballard F, 1997. Biotransformation of clozapine in humans. *Drug Met Disp*, **25** (5): 603-609.
29. Freeman D, Oyewumi K, 1997. Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy? *Clin. Pharmacokinet*, **32** (2): 93-100.
30. Krupp P, Barnes P, 1989. Leponex-associated granulocytopenia: a review of the situation. *Psychopharmacology (Berl)*, **99** (Suppl) : 118-121
31. Haller E, Binder R, 1990. Clozapine and seizures. *Am J Psychiatry*, **147**: 1069-1071.
32. Melkersson K, Dahl M, 2004. Adverse metabolic effects associated with atypical antipsychotics. *Drug*, **64** (7): 701-703.
33. Jerling M, Lindström L, Bondesson U, Bertilsson L, 1994. Fluvoxamine inhibition and carbamazepine induction on the metabolism of clozapine: evidence from therapeutic drug monitoring service. *Ther Drug Monit*, **16**: 368-374.
34. Gabbay V, Bowd M, Momamtourishuili M, 2002. . Clozapine and oral contraceptives: a possible drug interaction [Letter]. *J Clin Psychopharmacol*, **22**: 621-622.
35. Centorrino F, Baldessarini R, Kando J, Frankenburg F, Volpicelli S, Puopolo P, Flood J, 1994. Serum concentrations of clozapine and its major metabolites: effects of cotreatment with fluoxetine or valproate. *Am J Psychiatry*, **151** (1): 123-125.
36. Centorrino F, Baldessarini R, Kando J, Frankenburg F, Volpicelli S, Puopolo P, Flood J, 1996. Serum levels of clozapine and norclozapine in patients treated with selective serotonin reuptake inhibitors. *Am J Psychiatry*, **153**: 820-822.
37. Taylor D, 1997. Pharmacokinetics interactions involving clozapine. *Br J Psychiatry*, **171**: 109-112.
38. Eggert A, Crismon L, Dorson P, 1994. Lack of effect of fluoxetine on plasma clozapine concentrations. *J Clin Psychiatry*, **55** (10): 454-455.
39. Carrillo J, Herraiz A, Ramos S, Benítez J, 1998. Effects of caffeine withdrawal from the diet on the metabolism of clozapine in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol*, **18** (4): 311-316.
40. Raitasuo V, Lehtovaara R, Huttunen M, 1993. Carbamazepine and plasma levels of clozapine [Letter]. *Am J Psychiatry*, **150** (1): 169.
41. Ciraulo D, Shader R, 1990. Fluoxetine drug-drug interactions: I. Antidepressants and antipsychotics. *J Clin Psychopharmacol*, **10**: 48-50.

42. Lu MH, Lane HY, Chen KP, Jann M, Su MH, Chang WH, 2000. Fluvoxamine reduces the clozapine dosage needed in refractory schizophrenic patients. *J Clin Psychiatry*, **61** (8): 594-598.
43. Fabrazzo M, La Pia S, Monteleone P, Manelle R, Esposito G, Pinto A, Maj M, 2000. Fluvoxamine increases plasma and urinary levels of clozapine and its major metabolites in a time- and dose-dependent manner. *J Clin Psychopharmacol*, **20** (6):708-710.
44. Hiemke C, Weigmann H, Härtter S, Dahmen N, Wetzel H, Müller H, 1994. Elevated levels of clozapine in serum after addition of fluvoxamine [Letter]. *J Clin Psychopharmacol*, **14** (4): 279-281.
45. Wetzel H, Anghelescu I, Szegedi A, Wiesner J, Weigmann H, Härter S, Hiemke C, 1998. Pharmacokinetics interactions of clozapine with selective serotonin reuptake inhibitors: differential effects of fluvoxamine and paroxetine in a prospective study. *J Clin Psychopharmacol*, **18**: 2-9.
46. Miller D, 1991. Effect of phenytoin on plasma clozapine concentrations in two patients. *J Clin Psychiatry*, **52** (1): 23-25.
47. Goff D, Baldessarini R, 1993. Drug interactions with antipsychotic agents. *J Clin Psychopharmacol*, **13** (1): 57-67.
48. Hasegawa M, Gutierrez R, Way L, Meltzer H, 1993. Relationship between clinical efficacy and clozapine concentrations in plasma in schizophrenia: effect of smoking. *J Clin Psychopharmacol*, **13** (6): 383-390.
49. Haring, C., Fleischhacker, W., Schett, P., 1990. Influence of patient-related variables on clozapine levels. *Am. J. Psychiatry*, **147**: 1471-1475.
50. Finley P, Warner D, 1994. Potential impact of valproic acid therapy on clozapine disposition. *Biol Psychiatry*, **36**: 487-488.
51. Perry P, Miller D, Arndt S, Cadoret R, 1991. Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients. *Am. J Psychiatry*, **148** (2): 231-235.
52. Potkin S, Bera R, Gulasekaram B, Costa J, Hayes S, 1994. . Plasma clozapine concentrations predict clinical response in treatment-resistant schizophrenia. *J Clin. Psychiatry*, **55** (suppl B): 23-25.

53. Kroning M, Munne R, Szymanski S, Safferman A, Pollack S, Cooper T, Kane J, Lieberman J, 1995. Plasma clozapine levels and clinical response for treatment-refractory schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*, **152** (2): 179-185.
54. Pickar D, Owen R, Litman R, Konicki E, Gutierrez R, Rapaport M, 1992. Clinical and biologic response to clozapine in patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, **49**: 345-353.
55. Liu H, Chang W, Wei F, Lin SK, Jann M, 1996. Monitoring of plasma clozapine levels and metabolites in refractory schizophrenic patients. *Ther Drug Monit*, **18**: 200-207.
56. Spina E, Avenoso A, Facciola G, Scordo M, Ancione M, Madia A, Ventimiglia A, Perucca E, 2000. Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology*, **148**: 83-89.
57. Fabrazzo M, La Pia S, Monteleone P, Esposito G, Pinto A, Simone L, Bencivenga R, Maj M, 2002. Is the time course of clozapine response correlated to the time course of clozapine plasma levels? A one year prospective study in drug-resistant patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, **27** (6): 1050-1055.
58. Olesen O, Thomsen K, Jensen P, Wulff C, Rasmussen N, Refshammer C, Sorensen J, 1995. Clozapine serum levels and side effects during steady state treatment of schizophrenic patients: a cross-sectional study. *Psychopharmacology (Berl)*, **117**: 371-378.
59. Llorca, P., Lancon, C., Disdier, B., Farisse, H., 1993. Effectiveness of clozapine in neuroleptic-resistant schizophrenia: clinical response and plasma concentrations. *J Psychiatry Neurosci*, **27** (1) : 30-37.
60. Chong S, Tan C, Khoo YM, Lee HS, Wong KE, Ngui F, Winslow M, 1997. Clinical evaluation and plasma clozapine concentrations in Chinese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit*, **19**: 219-223.
61. VanderZwaag C, McGee M, McEvoy J, Freudenreich O, Wilson W, Cooper T, 1996. Response of patients with treatment-refractory schizophrenia to clozapine within three serum level ranges. *Am J Psychiatry*, **153** (12): 1579-1584.
62. Wilson W, 1996. Time required for initial improvement during clozapine treatment of refractory schizophrenia. *Am J Psychiatry*, **153** (7): 951-952.
63. Stern R, Kahn R, Davidson Nora R, Davis K, 1994. Early response to clozapine in schizophrenia. *Am. J Psychiatry*, **151**: 1817-1818.

64. Lovdahl M, Perry P, Millar D, 1991. Monitoring of plasma clozapine levels and metabolites in refractory schizophrenic patients. *Ther Drug Monit*, **13**, 69-72.
65. Weigmann H, Hiemke C, 1992. Determination of clozapine and its major metabolites in human serum using automated solid-phase extraction and subsequent isocratic high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*, **583**: 209-216.
66. Chung MC, Lin SK, Chang WH, 1993. Determination of clozapine and desmethylclozapine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*, **613**: 168-173.
67. Gupta R, 1995. Column liquid chromatographic determination of clozapine and N-desmethylclozapine in human serum using solid-phase extraction. *J Chromatogr B*, **673**: 311-315.
68. Guitton C, Kinowski J, Aznar R, Bressolle F, 1997. Determination of clozapine and its major metabolites in human plasma and red blood cells by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B*, **690**: 211-222.
69. Akerman K, 1997. Analysis of clozapine and norclozapine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. B*, **696**: 253-259.
70. Palego L, Dell'Osso L, Marazziti D, Biondi L, Sarno N, Ciapparelli A, Giromella A, Giannaccini G, Lucacchini A, Cassano G, 2002. Simultaneous analysis of clozapine, clomipramine and their metabolites by reversed-phase liquid chromatography. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiatry*, **25**: 519-533.
71. Doménech J, Martínez J, Plá JM. Biofarmacia y farmacocinética. Vol 1: Farmacocinética. Edt. Síntesis., España, p-p 355-389.
72. Benet L, Massoud N, Gambertoglio J. Pharmacokinetic basic for drug treatment. Edt. Raven Press Books., United States of America 1984; p-p 367-394.
73. Schumacher G. Therapeutic drug monitoring. Edt. Appleton & Lange; United States of America 1995, p-p 1-18.
74. NOM-177-SSA-1997. Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
75. Perry P, Bever K, Arndt S, Combs M, 1998. Relationship between patient variables and plasma clozapine concentrations: a dosing nomogram. *Biol Psychiatry*, **44**: 733-738.

ANEXO I

Carta propuesta para la información al paciente y de consentimiento informado.

Protocolo: Monitoreo terapéutico de clozapina.

El estudio en el que usted participará tiene como objetivo determinar los niveles plasmáticos de clozapina para con ello hacer el ajuste de dosis y obtener una mejor respuesta terapéutica.

En éste estudio usted será entrevistado semanalmente por el médico tratante con el fin de conocer su respuesta al medicamento clozapina. En caso de estar hospitalizado será entrevistado diariamente.

Se le administrará la dosis de clozapina de acuerdo a la recomendación médica. A las cuatro semanas de tratamiento se le tomará una muestra sanguínea de 5 mL, para determinar su concentración en sangre. También se tomará una muestra de sangre cada semana para determinar la cantidad de células blancas.

Riesgos

Todos los medicamentos tienen efectos secundarios, en el caso de la clozapina los efectos adversos más comunes son fiebre, taquicardia (rápido o irregular latido del corazón), hipotensión (presión sanguínea baja), trastornos de la regulación del sudor, mareo o cefalea, náuseas o vómito; menos frecuentemente se ha reportado somnolencia, sedación, sequedad de boca, visión borrosa, dificultad para orinar; y en casos raros puede causar disminución de las células blancas, confusión, inquietud, agitación, delirio, hipertensión (presión sanguínea alta), síndrome neuroléptico maligno y rash cutáneo. Dado que usted estará bajo vigilancia médica en caso de encontrar cualquier alteración se procederá a disminuir la dosis o a suspender el medicamento.

Beneficios

El medicamento clozapina se proporcionará sin costo durante el estudio. Su participación apoyará el conocimiento de los niveles de clozapina en la población mexicana, para realizar un modelo de ajuste de dosis que permita mejorar la respuesta terapéutica de los pacientes con esquizofrenia.

Importante

Su participación es totalmente voluntaria, si desea abandonar el estudio podrá hacerlo en cualquier momento y deberá notificarlo al investigador a cargo. Si usted no participa, no se afectan sus derechos que tiene como paciente de este Instituto y se le dará otro tratamiento de acuerdo a la decisión del médico.

En caso de cualquier duda comunicarse con:

Dra. Liliana Teresa García Martínez
o al Laboratorio de Neuropsicofarmacología

Tel. 56063822
Tel. 56063822

Ext. 1033
Ext. 2017

ANEXO II

Carta de consentimiento informado.

A través de la presente Yo, _____ doy mi consentimiento para participar como paciente (o representante legal del paciente) en el protocolo de investigación “**Monitoreo terapéutico de clozapina**”. Además hago constar que he recibido toda la información acerca de la naturaleza y el propósito del estudio.

Doy mi consentimiento en forma libre y expreso mi amplio entendimiento acerca de los objetivos del estudio, reconociendo los riesgos y posibles beneficios del tratamiento.

Estoy de acuerdo que la información clínica derivada del estudio de mi caso sea comunicada a la comunidad médica verbalmente o por escrito, pero sin revelar mi identidad.

He recibido, leído y entendido la carta de información del estudio así como los riesgos descritos.

Nombre del paciente o familiar responsable

Firma de autorización

Fecha

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Dirección

Teléfono

Fecha

Parentesco con el voluntario

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Dirección

Teléfono

Fecha

Parentesco con el voluntario

ANEXO III

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCÍRUGIA

“MANUEL VELASCO SUÁREZ”

Laboratorio de Neuropsicofarmacología. Edificio de Investigaciones Cerebrales.

Al paciente se le deberá tomar una muestra sanguínea antes de la administración de clozapina. Por favor anotar la siguiente información:

Nombre del paciente: _____

Registro: _____

Edad: _____ años Peso: _____ kg Altura: _____ m Fumador: Si No

Dosis de clozapina: _____ Esquema de dosificación: _____

Fecha de inicio del tratamiento: _____

Fecha y hora de la toma de muestra: _____

Fecha y hora de la última dosis: _____

Administración de otros medicamentos: _____

Efectos secundarios: Si No ¿Cuáles? _____

Nivel de clozapina en plasma (ng/ml): _____