

T  
1102

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

122292

122292



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ATENCIÓN Y SERVICIOS FARMACÉUTICOS

“ESTUDIO PILOTO DE MONITOREO DE CLOZAPINA EN PLASMA DE  
PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES ALANÍS MEDINA

MATRÍCULA: 206280260

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA.

ASESOR: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA.

ASESOR: DR. SERGIO MONTES LÓPEZ.

ENERO, 2011

**“ESTUDIO PILOTO DE MONITOREO DE CLOZAPINA EN PLASMA DE  
PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA”**

**VISTO BUENO DEL COMITÉ TUTORAL:**

**Vo. Bo. TUTOR**

**DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA**



**FIRMA**

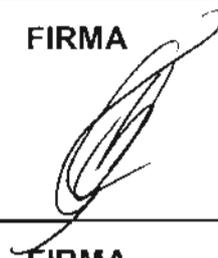
**Vo. Bo. ASESORES**

**DR. SERGIO MONTES LÓPEZ**



**FIRMA**

**DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA**



**FIRMA**

**ALUMNA**

**Q. F. B. MARÍA DE LOURDES ALANÍS MEDINA**



**MATRÍCULA: 206280260**

**FIRMA**

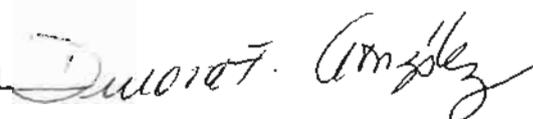
**“ESTUDIO PILOTO DE MONITOREO DE CLOZAPINA EN PLASMA DE  
PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA”**

**JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

**PRESIDENTE: DR. GABRIEL MARCELIN JIMÉNEZ**



**VOCAL: DRA. DINORA FABIOLA GONZÁLEZ ESQUIVEL**



**SECRETARIO: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA**



**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA  
DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL  
VELASCO SUÁREZ"**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

### **A CONACYT**

Por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría, con número de Registro: 203242

Por el apoyo económico otorgado para la realización de este estudio; con fondos del proyecto No. SEP2004C-01-47467 CONACYT.

Al

**Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"**

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

**Al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**

Por la oportunidad y el apoyo otorgado para realizar este estudio.

**A la Dra. Dinora Fabiola González Esquivel**

Por su guía y gran apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

*A mis hijas*  
*Con amor por su comprensión*

*A Ricardo y Rosana*  
*Con cariño por su apoyo*

## RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN

En el presente estudio se determinaron los niveles plasmáticos de clozapina y de su metabolito principal; N – desmetil-clozapina con la finalidad de relacionar sus concentraciones con el posible desarrollo de agranulocitosis, así como la influencia de algunos factores demográficos sobre los niveles de clozapina y su principal metabolito.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética y por el Comité de Investigación Clínica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

En este estudio participaron 66 pacientes de ambos sexos con diagnóstico de esquizofrenia resistente, con edad entre 18 y 60 años quienes se encontraban bajo tratamiento con clozapina por al menos 4 semanas previas a su inclusión en el estudio.

Previo a la inclusión en el estudio, los pacientes o sus representantes legales firmaron la forma de consentimiento informado. Una vez iniciado el estudio, mensualmente se les tomaron muestras sanguíneas de 5 mL, antes de la administración de la siguiente dosis. El plasma fue separado para la cuantificación de clozapina y sus metabolitos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), así como para realizar el conteo de leucocitos (prueba realizada semanalmente durante los 2 primeros meses de iniciado el estudio y posteriormente se realizó mensualmente).

El método analítico por CLAR fue desarrollado y validado siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-177.

La respuesta clínica fue evaluada por un psiquiatra, utilizando el formato PANSS (Positive and Negative Síndrome Scale). Para el diagnóstico de los pacientes se aplicó el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) que es una entrevista estructurada.

Resultados: La concentración plasmática de clozapina mostró una gran variabilidad interindividual, el valor promedio fue de 402.7 ng/mL (DE= 335.0 ng/mL) y para la N-desmetil clozapina fue de 177.5 ng/mL (DE= 202.7 ng/mL). El valor medio de la relación metabólica (N-desmetil clozapina/clozapina) fue de 0.55 (D.E. = 0.76). Se

encontró una correlación entre la relación dosis/peso y la concentración en plasma de clozapina ( $r=0.523$ ); ( $p=0.01$ ). No hubo diferencia significativa en el valor de la concentración de clozapina en plasma entre hombres y mujeres ( $p=0.2$ ). Sin embargo, la concentración promedio encontrada en mujeres fue más alta, 437.8 ng/mL (D.E.=400.9) que la encontrada en hombres, 391.694 ng/mL (D.E.=304.7ng/mL). La dosis promedio administrada fue similar a las dosis utilizadas en estudios con pacientes chinos y europeos, pero menor que la utilizada en pacientes norteamericanos. De la misma manera, se encontró diferencia significativa por género ( $p=0.01$ ) en la concentración de N-desmetil clozapina, siendo mayor en los hombres. Ninguno de los pacientes presentó agranulocitosis.

Conclusiones: Existe gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos de clozapina en estado estacionario, los cuales no se ven influenciados por el peso ni por la edad. Se observó disminución de la concentración de clozapina en plasma en relación al tiempo que tiene el paciente bajo tratamiento con este fármaco. Se observó mayor concentración de N-desmetil clozapina en hombres que en mujeres. El promedio de dosis utilizada en este grupo de pacientes bajo estudio es menor a las dosis utilizadas en poblaciones de Estados Unidos de Norteamérica. No se encontró influencia de otros medicamentos sobre la concentración de clozapina.

## ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
MARCO TEÓRICO	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOZAPINA Y DOS DE SUS METABOLITOS	20
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLOZAPINA EN PLASMA	29
MONITOREO TERAPÉUTICO DE CLOZAPINA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA	33
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DEL MÉTODO ANALÍTICO	35
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS DEL MONITOREO DE CLOZAPINA EN PLASMA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA	54
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	80
ANEXOS	89
ANEXO I FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	
ANEXO II RESÚMENES DE EVENTOS CIENTÍFICOS	

## ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla		Número de página
1	Subtipos de esquizofrenia basados en la Guía DSM – IV.	5
2	Fármacos inductores e inhibidores de los citocromos CYP1A2 y CYP3A4 .	16
3	Métodos analíticos por CLAR reportados para la separación de clozapina y sus metabolitos.	24
4	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma.	43
5	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de N – desmetil clozapina en plasma.	44
6	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma.	44
7	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de N–desmetil clozapina en plasma.	45
8	Exactitud del método para cuantificar clozapina en plasma.	45
9	Exactitud del método para cuantificar N–desmetil clozapina en plasma.	46
10	Recobro absoluto de clozapina en plasma.	46
11	Recobro absoluto de N–desmetil clozapina en plasma.	47
12	Límite de cuantificación para clozapina.	47
13	Límite de cuantificación para N-desmetil clozapina.	48
14	Estabilidad de la muestra de clozapina a temperatura ambiente.	50
15	Estabilidad de la muestra con N–desmetil clozapina a temperatura ambiente.	51
16	Estabilidad de la muestra procesada de clozapina.	51
17	Estabilidad de la muestra procesada de N – desmetil clozapina.	51
18	Estabilidad de las muestras de clozapina en refrigeración	52

Número de tabla		Número de página
19	Estabilidad de las muestras de N – desmetil clozapina en refrigeración.	52
20	Estabilidad de las muestras plasmáticas de clozapina en congelación.	53
21	Estabilidad de las muestras plasmáticas de N – desmetil clozapina en congelación.	53
22	Características promedio de los pacientes incluidos en el estudio.	54
23	Rangos de las dosis administradas en los pacientes y la relación N-desmetil clozapina/clozapina.	55
24	Características demográficas y niveles plasmáticos individuales de CLZ y N-desmetil clozapina en los pacientes que participaron en el estudio (n=66)	56
25	Concentraciones plasmáticas de clozapina y N-desmetil clozapina, número de neutrófilos y relación N-desmetil-clz/clozapina.	65
26	Pacientes bajo monoterapia con clozapina y pacientes bajo terapia concomitante.	72
27	Concentración de clozapina en plasma en pacientes bajo monoterapia y pacientes bajo terapia concomitante.	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura		Número de página
1	Fórmula estructural de la clozapina.	12
2	Estructuras químicas de clozapina, N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina.	16
3	Estructuras químicas de compuestos probados como estándar interno: haloperidol, imipramina, clozapina, clorhidrato de protriptilina y loxapina.	26
4	Esquema del procedimiento de extracción de clozapina y su metabolito en plasma.	28
5	Cromatograma en solución metanólica donde se muestra la separación entre clozapina, su metabolito principal, N-desmetil clozapina y loxapina, como estándar interno; utilizando la columna Bravao CN.	36
6	Cromatograma en solución metanólica al utilizar la columna Lichrosorb RP para la separación de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.	37
7	Cromatograma obtenido al utilizar la columna Spherisorb para la separación de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.	37
8	Cromatograma obtenido utilizando la columna para catecolaminas en la separación de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.	38
9	Cromatograma de una solución metanólica conteniendo Clozapina, N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina.	40
10	Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de clozapina en metanol.	41

Número de figura		Número de página
11	Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de N-desmetil clozapina en metanol.	41
12	Linealidad del método analítico para cuantificar clozapina.	42
13	Linealidad del método para cuantificar N-desmetil clozapina	43
14	Cromatograma que muestra el límite de detección de clozapina en plasma 7.5 ng/mL.	48
15	Cromatograma de una muestra de plasma sin clozapina.	49
16	Cromatograma representativo de plasma adicionado con clozapina (500 ng/mL), N – desmetil clozapina (400 ng/mL), N- óxido clozapina (400 ng/mL) y Loxapina (500 ng mL) como estándar interno.	49
17	Cromatograma de la muestra de plasma de un paciente bajo tratamiento con clozapina (clozapina 660.9 ng/mL, desmetil clozapina 209.8 ng/mL).	50
18	Diagnóstico de la frecuencia del tipo de esquizofrenia en los pacientes que participaron en el estudio.	55
19	Relación entre la concentración plasmática de clozapina y la concentración de N-desmetil clozapina. (Spearman $r=0.60$ )	58
20	Relación entre la relación dosis/peso de los pacientes y la relación clozapina/N-desmetil clozapina. ( $r=0.37$ )	58
21	Variabilidad interindividual en la concentración plasmática de CLZ en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia.	59
22	Variabilidad en la concentración de N-desmetil clozapina en plasma.	59
23	Relación entre la edad de los pacientes y la concentración de clozapina en plasma ( $r= -0.1$ ).	60

Número de figura		Número de página
24	Relación entre la dosis diaria (mg/kg de peso) de clozapina y la concentración plasmática en estado estacionario, en los pacientes incluidos en el estudio. (r=0.5 Spearman)	62
25	Concentración plasmática de clozapina de acuerdo al género (p =0.2).	63
26	Concentración plasmática de clozapina en relación a la fase de tratamiento con clozapina. (p>0.06)	64
27	Relación del tiempo que tiene el paciente bajo tratamiento con clozapina y la concentración en plasma de clozapina. (r= - 0.32)	64
28	Relación entre la concentración plasmática de clozapina y la cuenta de neutrófilos absolutos. (r=0.36 Spearman)	66
29	Relación entre el tiempo bajo tratamiento con CLZ y la cuenta de neutrófilos absolutos. (r= - 0.26).	67
30	Valores medios de la cuenta de neutrófilos absolutos presentes en los pacientes (n=45) divididos por género.	67
31	Valores medios de la concentración plasmática de N – desmetil clozapina en los pacientes de acuerdo al género (n= 62).	69
32	Concentración plasmática de N- desmetil clozapina en relación al número de neutrófilos presentes (r = 0.46)	69
33	Concentración plasmática de N-desmetil clozapina de acuerdo a la fase de tratamiento con clozapina en que se encontraban los pacientes (n=62).	70
34	Concentración de clozapina en plasma respecto a la relación de N-desmetil clozapina/clozapina (r=0.08)	71
35	Concentración de clozapina en plasma en pacientes bajo monoterapia en relación al género. (n=31)	73

Número de figura		Número de página
36	Concentración de clozapina en plasma en pacientes bajo politerapia haciendo la comparación por género.(n = 35)	74
37	Concentración plasmática de clozapina en pacientes bajo monoterapia y politerapia. (n=66)	74
38	Concentración de N-desmetil clozapina en plasma, metabolito principal de clozapina, en pacientes bajo terapia con clozapina y otros fármacos concomitantes de acuerdo al género. (n=35)	75
39	Concentración plasmática de N-desmetil clozapina en pacientes bajo monoterapia con clozapina de acuerdo al género. (n=31)	76
40	Concentración plasmática de clozapina en pacientes bajo terapia concomitante.	77

## INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad mental que afecta alrededor del 1% de la población mundial (Arredondo y cols., 2003), causando discapacidad en hombres y mujeres lo cual tiene como consecuencia pérdidas del tipo laboral, social, familiar y económico en esta población.

La esquizofrenia se caracteriza por pensamiento desordenado crónico, aislamiento emocional y en muchos casos delirios y alucinaciones auditivas (Baldessarini y Tarazi, 2001). Para su tratamiento se utilizan antipsicóticos como las fenotiazinas, tioxantenos, butirofenonas, indolonas y dibenzodiazepinas. Estos fármacos a pesar de ser químicamente diferentes son efectivos. Es importante mencionar que las benzodiazepinas potentes carecen de eficacia en el tratamiento del paciente esquizofrénico (Baldessarini y cols., 1988).

Los antipsicóticos en general, reducen las alucinaciones, los delirios y el pensamiento desordenado, pero pocos actúan adecuadamente en el aspecto del aislamiento social y la apatía que son características de la esquizofrenia.

El primer medicamento utilizado para tratar la esquizofrenia fue la clorpromazina, que pertenece al grupo de las fenotiazinas. A pesar de que desde 1950 muchos pacientes han sido tratados con neurolepticos con efectos benéficos, es necesario resaltar sus efectos adversos, de los cuales sobresalen los efectos neurológicos extrapiramidales. Para disminuir este tipo de efectos, en ocasiones se utilizan fármacos antiparkinsonianos, los cuales producen otro tipo de efectos adversos ocasionando a su vez, incremento en los gastos del plan terapéutico.

Los antipsicóticos atípicos como la clozapina, olanzapina y quetiapina generan menores riesgos de efectos adversos extrapiramidales (Blin, 1999). Desde 1990, la clozapina ha mostrado su eficacia en el tratamiento de la esquizofrenia en pacientes que muestran poca mejoría con los antipsicóticos clásicos como clorpromazina y haloperidol (Worrell y cols., 2000) ya que no produce efectos extrapiramidales ni tampoco discinesia tardía; reduce los síntomas positivos y negativos, así como algunos cognitivos que presentan los pacientes con esquizofrenia refractaria o resistente (Baldessarini, 1991). En lo general se requieren de dos a tres semanas para observar mejoría evidente en los pacientes esquizofrénicos. La clozapina es efectiva en el 60

% de pacientes con esquizofrenia resistente (Spina y cols., 2000), sin embargo, su uso ha sido limitado por el riesgo de agranulocitosis, observada en el 1% de los pacientes, lo cual hace necesario el monitoreo hematológico durante los primeros meses del tratamiento (Kane y cols., 1988).

Existen reportes que muestran la amplia variabilidad farmacocinética de clozapina así como el que sus niveles plasmáticos se ven influenciados por hábitos del paciente como el fumar (Aichhorn y cols., 2006; Khan y Preskorn, 2005; Fabrazzo y cols., 2002; Llorca y cols., 2002; Gaudoneix y cols., 2001).

En México, la clozapina se utiliza en pacientes con esquizofrenia resistente, pero no existe información acerca de sus niveles plasmáticos ni de su posible relación con la presencia de agranulocitosis en población mexicana.

Bajo estas consideraciones, es importante el llevar a cabo un estudio de monitoreo en pacientes bajo tratamiento con clozapina con la finalidad de optimizar la eficacia terapéutica sin la aparición de eventos adversos como la agranulocitosis.

## **ANTECEDENTES**

A nivel mundial la esquizofrenia ocupa el séptimo lugar dentro de las enfermedades con carga por discapacidad y días vividos (OMS, 2001). En nuestro país, aproximadamente 15 millones de personas presentan alguna enfermedad mental y este tipo de padecimientos ocupan el quinto lugar como carga de enfermedad, tomando en cuenta los indicadores de muerte prematura y días vividos con discapacidad (Sistema Nacional de Salud, 2003). Dentro de estos indicadores la prevalencia de la esquizofrenia en México es del 1% (Primera Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México, 2003).

A pesar de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda destinar como mínimo un 10% del total de los recursos asignados al presupuesto en el área de la salud, para dar tratamiento a los enfermos con trastornos mentales, en México solamente se destina el 2.0 % del presupuesto global (Gaceta Parlamentaria No. 16, 2005). En México, el sector salud gasta anualmente 211 USD por paciente en el tratamiento de la esquizofrenia y el 94% de la demanda está cubierta por las instituciones de seguridad social (Arredondo y cols., 2003).

A partir de la década de los cincuenta, se desarrollaron los fármacos antipsicóticos clásicos (medicamentos utilizados antes de la clozapina, denominados neurolepticos, por sus efectos secundarios característicos sobre el sistema motor extrapiramidal). Estos fármacos son útiles para reducir y algunas veces eliminar los síntomas positivos de la esquizofrenia. Cuando este tipo de medicamentos no son efectivos para el paciente esquizofrénico ya sea porque no se observa mejoría o bien porque el paciente es intolerante al compuesto químico, existen algunas alternativas farmacológicas para el tratamiento de la esquizofrenia y dentro de éstas se encuentra la clozapina, fármaco aprobado por segunda ocasión para su uso en 1989; por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos, EUA). La clozapina es un antipsicótico atípico, de segunda generación que no genera efectos extrapiramidales como los antipsicóticos clásicos (Alvir y cols., 1993). Los antipsicóticos de segunda generación como la clozapina fueron incluidos en el Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud a partir del 2000 (Arredondo y cols., 2003) y son utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia al igual que el haloperidol y la clorpromazina (Titiér y cols., 2003).

Debido a que los pacientes con esquizofrenia frecuentemente presentan intoxicaciones o efectos adversos por el uso de estos fármacos y en especial la clozapina, que produce agranulocitosis (Guest y cols., 1998; Alphas y Anand, 1999), es necesario realizar monitoreo clínico de los niveles del fármaco así como de la cuenta de leucocitos para prevenir la agranulocitosis en los pacientes que están bajo tratamiento con clozapina.

## **MARCO TEORICO**

### **Esquizofrenia**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud: "La esquizofrenia se caracteriza por un disturbio fundamental de la personalidad, una distorsión del pensamiento, delusiones, percepciones alteradas, respuestas emocionales inapropiadas y un grado de autismo. Estos síntomas son experimentados en presencia de conciencia clara y generalmente capacidad intelectual conservada". (WHO, 1973)

## **Evolución histórica del concepto**

Emil Kraepelin desarrolló una serie de textos sobre el concepto de "Demencia Precoz" entre 1883 y 1926. Entre sus pacientes identificó un grupo de jóvenes que presentaban diferentes síntomas tales como alucinaciones, empobrecimiento emocional y con tendencia, tras un lapso variable, a volverse completamente incapaces de atenderse a sí mismos.

En 1911, Eugen Bleuler, psiquiatra suizo, introdujo el término esquizofrenia (WHO, 1996) en sustitución a Demencia Precoz. La palabra esquizofrenia viene del griego y está formado por *skhizein* (separar) y *paren* (mente). Bleuler identificó cuatro síntomas negativos de la esquizofrenia:

- a) Los procesos del pensamiento son desordenados y desconectados.
- b) La respuesta emocional a los estímulos es disminuida e inapropiada.
- c) Pensamiento paulatinamente empobrecido con aislamiento del medio.
- d) Pensamientos o sentimientos contradictorios.

Posteriormente, Kurt Schneider establece los síntomas positivos de la esquizofrenia. Llegada la década de los '70 la comunidad médica formalizó acuerdos alrededor de los criterios para el diagnóstico y tratamiento de la esquizofrenia y como resultado, en 1974, Strauss propuso que la esquizofrenia comprendía tanto síntomas positivos (que representan distorsiones activas del funcionamiento cerebral) como negativos (que representan la pérdida o disminución de las funciones cerebrales normales).

También durante esta década, la Organización Mundial de la Salud (OMS) instituyó un programa de estandarización de la clasificación de las enfermedades incluyendo los desordenes mentales, que daría lugar a la Clasificación Mundial de las Enfermedades (ICD) (WHO, 1992). Paralelamente, Estados Unidos preparó el manual conocido como Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM) (DSM - IV, 1994).

Ambos sistemas de clasificación han sido revisados en diversas ocasiones, hallándose en vigencia el ICD 10 y el DSM IV, los cuales son ampliamente aceptados; en la tabla No. 1 se presenta la clasificación de los subtipos de esquizofrenia basados en la guía DSM - IV.

En la actualidad, la esquizofrenia se considera una patología compleja que involucra cuatro alteraciones: Síntomas positivos, síntomas negativos (Andreasen y Olsen, 1982; Crow, 1980), síntomas del estado de ánimo y síntomas cognitivos.

El esquema de los síntomas positivos es el siguiente:

Alucinaciones, trastornos del pensamiento.

En los sentimientos: angustia, excitabilidad

Vegetativos: insomnio, palpitaciones, sudores, mareos, trastornos gastrointestinales y trastornos respiratorios.

Con respecto a la motricidad: agresividad o agitación, inquietud corporal, conducta repetitiva.

El esquema de los síntomas negativos es el siguiente:

No se tiene voluntad para levantarse cada día

Disminución de emociones y sentimientos.

Empobrecimiento del pensamiento y de la cognición.

Problemas de concentración y de atención.

**Tabla No. 1 Subtipos de esquizofrenia basados en la Guía DSM – IV**

<b>Subtipo</b>	<b>Sistemas afectados</b>	<b>Síntomas típicos</b>	<b>Comentarios</b>
Paranoide	Pensamiento, percepción	Delirios (sobre todo de persecución)	Subtipo más común
Desorganizada	Emociones, voluntad	Afectividad inapropiada, trastornos formales del pensamiento, fragmentación mental	Inicia en la adolescencia
Catatónica	Voluntad, actividad motora	Retraimiento social, aplanamiento emocional, pobreza de ideas, disminución de los impulsos y la motivación	Es el más raro
Residual	No hay alteración psicótica importante	Síntomas negativos más evidentes	No se manifiesta en todos los enfermos
Indiferenciada		Es una mezcla de los síntomas anteriores	

## **Curso de la Enfermedad**

Existen cuatro fases en el curso de la enfermedad: (Jablensky y cols., 1992)

1. Fase Prodrómica: Es el período anterior al comienzo de los síntomas activos, sus manifestaciones son sutiles y pueden aparecer entre días o años. Se caracterizan por aislamiento social, cambios en el comportamiento o en la respuesta emocional a estímulos.
2. Fase Aguda: Está marcada por severos síntomas psicóticos. Habitualmente requiere medicación y/u hospitalización.
3. Fase de Continuación: Puede abarcar más de seis meses desde el comienzo de la enfermedad, se produce el decremento en gravedad de los síntomas.
4. Fase de Estabilización: Durante esta fase los pacientes pueden estar asintomáticos o exhibir síntomas tales como tensión, irritabilidad, depresión, síntomas negativos y de deterioro cognitivo.

## **Epidemiología:**

En el año de 1973, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1973) publicó un reporte del estudio piloto internacional sobre esquizofrenia en donde se establecen criterios definidos para el diagnóstico y las características de la enfermedad. En ese estudio se detectó que el tipo más frecuente de esquizofrenia es el paranoide.

Los estudios de prevalencia (proporción de casos existentes) realizados en América del Norte revelan que del 1.0 al 1.9 por mil habitantes sufren de esquizofrenia alguna vez en sus vidas.

La incidencia, número de casos nuevos en un determinado periodo de tiempo varía entre 0.3 a 1.2 por mil habitantes, por año.

Los factores de riesgo para la esquizofrenia se agrupan en tres categorías: (Cooper, 1978).

a) Características sociodemográficas. Las encuestas epidemiológicas han identificado que la esquizofrenia se presenta con más frecuencia en miembros de las clases socioeconómicas bajas. Este hallazgo se puede explicar porque las dificultades económicas y sociales de las clases bajas favorecen la aparición de la enfermedad en un individuo genéticamente predispuesto a ella.

Otro factor notable de riesgo es el estado civil, ya que se ha detectado un alto porcentaje de personas solteras, divorciadas o viudas sin distinción de género, que desarrollan la enfermedad (Eaton y cols., 1995).

La esquizofrenia es una enfermedad de la edad juvenil, su mayor incidencia ocurre entre los 15 y los 35 años (60-80%).

b) Factores de predisposición. Los genéticos son los más importantes, si los padres tienen la enfermedad, el riesgo de transmitirla a sus hijos es de 40%. El índice de concordancia de gemelos monocigotos es de 50%, (Kendler y Diehl, 1993) comparado con 10% para los dicigotos.

La hipoxia perinatal (falta de oxígeno en el feto) se presentó en el 30% de las personas que padecen esquizofrenia (Torrey y cols., 1988).

La esquizofrenia también se encuentra vinculada a complicaciones de gestación (Kendler y cols., 1996), exposición prenatal a la influenza durante el segundo trimestre y deficiencias nutricionales en fase prenatal (McNeil, 1995).

c) Factores de precipitación. El entorno familiar cuando el patrón característico sea una comunicación fragmentada o incierta, un estilo afectivo negativo, crítica y hostilidad (Miklowitz, 1994).

### **Trastornos Comórbidos o Concomitantes**

Las personas con esquizofrenia presentan comorbilidad con otras enfermedades mentales, la más relevante es la depresión; la cual incrementa el riesgo del suicidio.

El abuso o dependencia de sustancias en personas con esquizofrenia, se estima que ocurre en un porcentaje del 30% para el alcohol y 25% para la cafeína y estimulantes; el uso del tabaco se presenta en el 50% de los pacientes (Regier y cols., 1990; Lohr y Flyn., 1992). La nicotina es una sustancia que reduce las alucinaciones y otros síntomas de la esquizofrenia (Freedman y cols., 1994).

El abuso de sustancias es un factor importante ya que reduce la efectividad del tratamiento, afecta los síntomas positivos, incrementa la inestabilidad social y aumenta la violencia (Cuffel y cols., 1994).

Entre las personas con una enfermedad mental grave aumenta el riesgo de infección por VIH debido al consumo de drogas por vía parenteral y a las relaciones sexuales sin protección (Sewell, 1996).

### **Mortalidad**

Las personas con esquizofrenia tienen mayor probabilidad de presentar accidentes o de tener intentos de suicidio; se estima que es 10% mayor que en la población general (Caldwell and Gottesman, 1990).

### **Fisiopatología**

Por medio de tomografía axial computarizada y resonancia magnética se han observado asimetrías del cerebro y del sistema ventricular que afectan a los lóbulos frontales, al hemisferio izquierdo y a la envoltura craneal, lo cual no aumenta durante el curso de la enfermedad. Se considera que las anomalías que se presentan en el cerebro de los pacientes reflejan alteraciones que se dieron durante el desarrollo del cerebro (Kasai y cols., 2002; Vita y cols., 1997). Las asimetrías parecen guardar relación con los síntomas negativos y estos parecen estar relacionados con atrofia del lóbulo temporal izquierdo (Turetsky y cols., 1995). La tomografía de emisión de un solo fotón permite observar disminución del flujo sanguíneo cerebral en los lóbulos frontales en más del 80 % de los pacientes, lo cual se correlaciona con los síntomas negativos (Steinberg y cols., 1995; Sabri y cols., 1997).

El receptor muscarínico del subtipo  $M_1$  es el más abundante en la corteza e hipocampo, el cual es de gran importancia en la función cognitiva; se ha reportado que en pacientes con esquizofrenia éste se encuentra disminuido lo que produce deterioro cognitivo. También se ha propuesto que la disminución de la actividad glutamatérgica es el factor que influye en mayor proporción en la fisiopatología de la esquizofrenia (Li y cols., 2005).

Considerados en conjunto, estos datos indican que la esquizofrenia se produce por un déficit en la regulación de la actividad cerebral de forma que se excede en su respuesta a la gran cantidad de señales ambientales que recibe y que carece de la capacidad de descartar los estímulos no deseados. Al mismo tiempo, se observa disminución del tamaño de los lóbulos temporales que procesan la información

sensorial y que permiten que un ser humano desarrolle un comportamiento innovador y adecuado.

## **Tratamiento**

Los medicamentos que se emplean actualmente para tratar la esquizofrenia se dividen en dos grupos:

- Antipsicóticos convencionales (denominados anteriormente neurolépticos).
- Nuevos antipsicóticos, también denominados de segunda generación o antipsicóticos "atípicos".

Los primeros antipsicóticos se introdujeron en la práctica clínica a inicios de los años 50. El término clásico o convencional se emplea para referirse a todos los antipsicóticos utilizados previamente al grupo de la clozapina. Antiguamente se les denominaban neurolépticos, por sus efectos secundarios característicos sobre el sistema motor extrapiramidal, como distonía, parkinsonismo, discinesia y acatisia. Estos fármacos han resultado útiles para reducir y a veces eliminar los síntomas positivos de la esquizofrenia, como trastornos del pensamiento, alucinaciones e ideas delirantes. También pueden aliviar síntomas asociados como agitación, impulsividad y agresividad. Lamentablemente, no son tan eficaces para disminuir los síntomas negativos de la esquizofrenia, como la apatía, el retraimiento social y empobrecimiento del pensamiento.

La clozapina fue el primer antipsicótico de segunda generación, con mínimos efectos secundarios extrapiramidales. A la clozapina le han seguido otros nuevos fármacos que comparten esta ventaja. Los términos de "segunda generación" o "atípico" se utilizan para referirse a este grupo de medicamentos, prefiriéndose la denominación de segunda generación. La característica principal de estos nuevos antipsicóticos es que poseen menor riesgo de producir efectos extrapiramidales. También poseen otras ventajas, ya que mejoran los síntomas negativos y provocan un aumento mínimo o insignificante del nivel de prolactina.

## **Antipsicóticos clásicos o Neurolépticos.**

La estructura química de estos medicamentos es muy variada, su mecanismo de acción comprende el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el sistema

mesolímbico del cerebro (Davis y cols., 1994) y los ganglios basales. La potencia clínica de estos medicamentos corresponde a su afinidad por el receptor a dopamina del tipo D2. Los antipsicóticos clásicos no difieren entre ellos en su eficacia y tienen diferentes perfiles de efectos secundarios (Baldessarini y Tarazi, 2001). Son eficaces en reducir los síntomas positivos de la esquizofrenia y su impacto sobre los síntomas negativos es modesto.

Los efectos secundarios de estos medicamentos suelen ser muy desagradables para el paciente y es posible que debido a ellos disminuya el apego al tratamiento. Algunos de los efectos secundarios más frecuentes, originados por los antipsicóticos convencionales, son los síntomas extrapiramidales, que representan un problema especialmente en los primeros días del tratamiento (Baldessarini y Tarazi, 2001). Estos síntomas, como distonía, discinesia, acatisia y parkinsonismo, pueden ocasionar rigidez, temblores, inquietud o espasmos musculares agudos.

Otros posibles efectos secundarios de los antipsicóticos clásicos son los efectos anti colinérgicos que se manifiestan como visión borrosa, boca seca y constipación. Dentro de los efectos cardiovasculares se puede presentar taquicardia e hipotensión postural. Además en algunos pacientes se presenta sedación excesiva, impotencia sexual, interrupción del ciclo menstrual normal, aumento de peso y rara vez crisis epilépticas. No existen tratamientos específicos para los efectos secundarios. Generalmente el médico trata de disminuir la dosis o bien cambiar a otro antipsicótico. La discinesia tardía puede aparecer después de tomar antipsicóticos convencionales durante varios años y con menor frecuencia, después de algunos meses. Provoca movimientos involuntarios de la lengua, de la boca o de otros músculos, habitualmente en episodios breves (Kane y cols., 1988b). En algunos casos, la discinesia tardía se vuelve crónica o irreversible.

El síndrome neuroléptico maligno es un efecto adverso poco frecuente que puede poner en peligro la vida del paciente, consiste en acinesia, fluctuación de la conciencia, sudoración profunda, fiebre, rigidez y aumento de las enzimas hepáticas. Cuando se presenta, se debe interrumpir inmediatamente la administración del fármaco e incluso pueden ser necesarios los cuidados intensivos.

Se ha observado que el 30 % de los pacientes que presentan resistencia a este tipo de medicamentos no responden al tratamiento o presentan intolerancia al compuesto químico (Kerwin, 2007; Llorca y cols., 2002).

La clorpromazina es el más antiguo de los antipsicóticos clásicos presentando características sedantes y anticolinérgicas, tiende a causar mayor grado de hipotensión ortostática, mientras que los antipsicóticos clásicos más potentes, como haloperidol, y perfenazina, tienen mayor riesgo de inducir efectos secundarios extrapiramidales. Algunos ejemplos de antipsicóticos clásicos más comunes son: Levomepromazina, Loxapina, Sulpiride y Promazina entre otros.

### **Antipsicóticos atípicos**

El mecanismo de acción de los antipsicóticos atípicos involucra una gran afinidad por varios receptores, entre los que se incluyen los dopaminérgicos D2 y los receptores de la serotonina 5-HT<sub>2</sub> (Meltzer y cols., 1989; Mauri y cols., 2007). Reportes en la literatura establecen que otros receptores también intervienen en la patología de la esquizofrenia como: D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) así como los receptores para noradrenalina de tipo  $\alpha$ 1 (Khan y Preskorn, 2005). Estos fármacos presentan una disociación más rápida de la unión D<sub>2</sub>. El modelo de antipsicótico atípico es la clozapina. Como ejemplos de antipsicóticos atípicos están: Olanzapina, Quetiapina, Risperidona, Amisulpirida, Zotepina y Sertindol.

En ensayos comparativos la clozapina es el único antipsicótico que ha mostrado de manera constante su superioridad con respecto a otros antipsicóticos. También se ha demostrado que supera a los antipsicóticos convencionales en pacientes que no han respondido a la terapia con este tipo de fármacos. Aunado a esto, mejoran los síntomas psicopatológicos, los problemas psicosociales y su efecto sobre los síntomas negativos es mejor que el de los antipsicóticos convencionales. A diferencia de estos últimos, la clozapina no produce síntomas extrapiramidales clínicamente significativos en la mayoría de los pacientes (Stanniland y Taylor, 2000; Iqbal y cols., 2003) y tiene un efecto antagonista dopaminérgico mucho más débil que el de los antipsicóticos convencionales.

Lamentablemente, la clozapina tiene efectos secundarios graves. El más significativo es que puede producir un trastorno sanguíneo mortal llamado agranulocitosis, el cual provoca destrucción súbita de los leucocitos en 1% de los pacientes tratados con este fármaco (Alvir y cols., 1995) y suele presentarse en los tres primeros meses del tratamiento. Dado que la agranulocitosis es reversible si se interrumpe el tratamiento, en la mayoría de los países se exige que se realice con regularidad un recuento de leucocitos. Por esta razón, la indicación de la clozapina se restringe a los enfermos resistentes al tratamiento con otros antipsicóticos o bien que son incapaces de tolerarlos por sus efectos secundarios (Schulte, 2003).

La dosis recomendada de clozapina varía de un paciente a otro sin embargo, las más usadas se encuentran en el rango de 300 – 600 mg/día (Simpson y cols. 1999; Spina y cols. 2000).

La clozapina es el único medicamento comercializado con un riesgo insignificante de provocar discinesia tardía (Stanniland y Taylor, 2000; Oyewumi y cols. 2004; Iqbal y cols. 2003).

## Clozapina

### Propiedades Fisicoquímicas

La clozapina es un derivado tricíclico dibenzodiazepínico, cuya fórmula estructural es la siguiente:

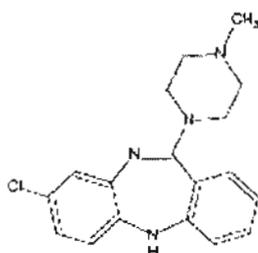


Figura No. 1. Fórmula estructural de la clozapina.

*Nombre químico:* 8 – cloro -11 – (4 – metil -1- piperazinil) – 5H – dibenzo [b,e] -1, 4 – diazepina.

*Nombre genérico:* Clozapina.

*Nombres comerciales:* Leponex (Novartis), Clopsine (Psicofarma), Closaril (Sandoz).

*Fórmula condensada:* C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>.

*Peso molecular:* 326.82 g/mol.

La clozapina es un polvo amarillo, cristalino, inoloro, con punto de fusión de 183 – 184° C; es soluble en ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N y ligeramente soluble en agua.

Es inestable químicamente con agentes oxidantes. Su descomposición genera CO, CO<sub>2</sub>, óxidos de nitrógeno y ácido clorhídrico gas. En presencia de fuego produce vapores tóxicos (Budavari, 1989; <http://www.clozaril.com.mdex>).

## **Farmacocinética**

Los estudios farmacocinéticos de clozapina muestran que el fármaco presenta una gran variabilidad interindividual; el tiempo de vida media reportado es de 7.6 h (4.1 – 13.7 h), el tiempo al cual se obtiene la máxima concentración plasmática (t<sub>max</sub>) se ha reportado ser de 3 h (rango 1 a 5 h), la depuración total de 10.32 L/h y el volumen de distribución 1.5 L/kg. En pacientes esquizofrénicos a quienes se les administró clozapina por vía oral en un rango de dosis de 300-900 mg/día, se observó la concentración mínima (C<sub>min</sub>) promedio en estado estacionario de 381 ng/mL y la concentración máxima (C<sub>max</sub>) promedio de 894 ng/mL (Mauri, 2007; Guillon C. y col. 1998).

Después de administración oral, la clozapina se absorbe rápidamente; solamente del 27 al 50% de la dosis llega a la circulación sistémica sin cambio, su metabolismo inicia en el hígado, después de este primer paso hepático se liberan dos metabolitos principales: N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina, de los cuales la N-desmetil clozapina tiene actividad terapéutica. La clozapina se une a proteínas plasmáticas en un 95%, principalmente a la alfa 1 glucoproteína ácida. Los alimentos no afectan su absorción.

Sólo una mínima porción del fármaco se excreta en forma inalterada, ya que el 50% de la dosis administrada se elimina metabolizada por la orina y 30% por heces.

Se puede administrar 2 veces al día para mantener concentraciones plasmáticas estables (60 a 1000 ng/mL con un promedio de 150 a 450 ng / mL).

En estudios clínicos realizados en Europa con pacientes que presentan esquizofrenia resistente se ha observado eficacia terapéutica a partir de concentraciones plasmáticas de 350 ng/ mL de clozapina (Bondolfi y cols., 1998; Khan y Preskorn, 2005), aunque

se acepta que los niveles plasmáticos donde se observa eficacia son muy variables. (Mauri y cols., 2007; Schulte, 2003; Buur-Rasmussen y Bræsen, 1999 ; Guitton y cols., 1998)

### **Farmacodinamia.**

El bloqueo de la clozapina sobre los receptores dopaminérgicos es específico en el sistema mesolímbico y no sobre la vía nigro estriatal, por lo cual se presentan menos efectos extrapiramidales en los pacientes comparado con la administración de neurolepticos típicos (Mauri y cols., 2007; Wong y Van, 2003; Remington, 2003).

El comportamiento farmacodinámico de la clozapina es complicado ya que interactúa con varios receptores:

#### a) Receptores para dopamina

Mayor afinidad por los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_4$  que por los  $D_2$ .

Presenta menor afinidad por los receptores  $D_2$  comparado con los antipsicóticos clásicos.

#### b) Receptores para serotonina.

La actividad antipsicótica de la clozapina se asocia principalmente al potente bloqueo de los receptores serotoninérgicos  $5HT_{2a}$ ,  $5HT_{2c}$ ; a este bloqueo se han atribuido sus efectos sobre los síntomas negativos y la ausencia de efectos extrapiramidales (Mosier y cols. 2003; Mauri y cols., 2007), lo que sugiere que el bloqueo serotoninérgico del estriado incrementa el recambio de dopamina en forma exclusiva para esta estructura, impidiendo que se afecte el componente extrapiramidal del movimiento con el bloqueo  $D_2$ ; este mecanismo de la serotonina no existe en el tracto mesolímbico por lo que no hay incremento del recambio de dopamina.

#### c) Receptor para noradrenalina.

La clozapina también actúa como antagonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ . Su alta afinidad por este receptor produce los efectos adversos sedantes e hipotensivos de este fármaco (Baldessarini y Tarazi. 2001.)

#### d) Receptor para acetilcolina $M_1$ . Este receptor muscarínico es el más abundante en la corteza y el hipocampo, que son regiones del cerebro muy importantes para la función cognitiva; este receptor se encuentra disminuido en los pacientes con

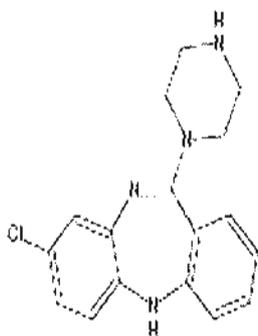
esquizofrenia. La N-desmetil clozapina es un agonista del receptor M1 lo cual produce una mejoría en el déficit cognitivo de los pacientes con esquizofrenia (Li y cols., 2005).

- e) Receptor para Histamina H<sub>1</sub>. La acción bloqueadora H<sub>1</sub> explica su efecto sedante. A diferencia de otros neurolepticos, este fármaco no incrementa la concentración de prolactina (Mauri y cols., 2007; Wolfgang y cols., 2006; Remington, 2003). La clozapina ha demostrado ser superior comparada con otros agentes típicos; sin embargo, no es un fármaco de primera opción por el perfil de efectos adversos que presenta; siendo los más graves la agranulocitosis, con incidencia de 1%, y la inducción de convulsiones, con incidencia de 1% en pacientes con dosis de 300 mg/día y del 5% con dosis entre 600 y 900 mg/día (Khan y Preskorn, 2005). Debido a esto es preciso hacer recuentos semanales de leucocitos, en especial durante los tres primeros meses de tratamiento y posteriormente el recuento se realiza mensual (Buur-Rasmussen y Brøsen, 1999; Alphs y Anand, 1999; Alvir y cols., 1993).

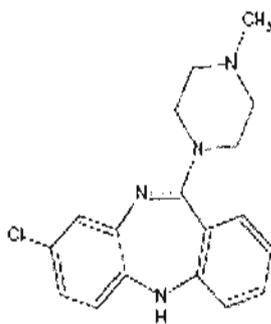
## **Metabolismo**

La Clozapina presenta metabolismo hepático en el cual participan las enzimas del citocromo P<sub>450</sub>. Las principales enzimas involucradas son CYP1A2 y CYP3A4, la primera cataliza la N-desmetilación de clozapina y el CYP3A4 está involucrado en la oxidación del fármaco, por lo cual el metabolismo es alterado cuando se administra clozapina con sustancias que son inductoras o inhibidores de estos citocromos (Khan y cols. 2005). Alrededor del 45% del metabolismo está regulado por el CYP3A4 (Mauri y cols., 2007; Khan y Preskorn, 2005).

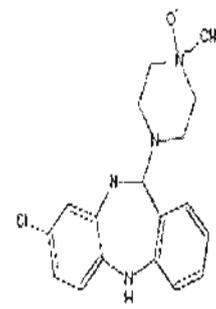
En la figura No. 2 se presentan las estructuras químicas de clozapina y sus metabolitos, N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina.



**N-desmetil clozapina**



**Clozapina**



**N-óxido clozapina.**

Fig No. 2 Estructuras químicas de clozapina, N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina.

Las sustancias inductoras de los citocromos CYP1A2 y/o CYP3A4 disminuyen la concentración plasmática de clozapina, lo cual altera su efecto terapéutico (Buur-Rasmussen y Brøsen, 1999). Por el contrario, las sustancias inhibidoras de los citocromos CYP1A2 y/o CYP3A4 producen un incremento en la concentración plasmática de clozapina (Schulte, 2003; Guillon y cols., 1998). En la tabla No. 2 se presentan algunos fármacos que son inductores o inhibidores de estos citocromos.

Algunos estudios sugieren que la combinación de clozapina con antidepresivos tricíclicos aumenta los efectos adversos relacionados con la actividad anticolinérgica (Besag y Berry, 2006).

**Tabla No. 2 Fármacos inductores e inhibidores de los citocromos CYP1A2 y CYP3A4**

<b>CITOCROMO CYP 1 A 2</b>		<b>CITOCROMO CYP 3 A 4</b>	
<i><b>Inhibidores</b></i>	<i><b>Inductores</b></i>	<i><b>Inhibidores</b></i>	<i><b>Inductores</b></i>
Ciprofloxacina	Carbamazepina	Etanol	Carbamazepina
Fluvoxamina	Fenobarbital	Fluoxetina	Dexametasona
Norfloxacina	Omeprazol	Fluvoxamina	Prednisona
Anticonceptivos	Rimfapicina	Ketoconazol	Fenobarbital
	Nicotina	Ritonavir	Fenitoina
	Fenitoina	Sertralina	Rimfapicina
		Eritromicina	
		Cimetidina	

Cuando la monoterapia con clozapina no es efectiva para el paciente con esquizofrenia resistente, la opción adecuada es el tratamiento combinado con otros fármacos, siendo los más utilizados los que se indican a continuación:

- a) Clozapina en conjunto con neurofármacos con la finalidad de administrar una dosis menor de clozapina y mantener una respuesta terapéutica adecuada (monoterapia 600mg/día, 400 mg/día de clozapina cuando se administra junto con clorpromazina) pero se presenta un incremento en los efectos secundarios tales como: delirio, mayor hostilidad e hipersalivación. Con sulpiride se observa un aumento en los niveles de prolactina; por lo cual no hay un apego adecuado al tratamiento por parte del paciente.
- b) Clozapina en conjunto con otros antipsicóticos atípicos: Clozapina con risperidona: produce un incremento en los niveles plasmáticos de clozapina y los pacientes presentan mejoría en los síntomas en un 20%; si la dosis de risperidona es mayor a los 6 mg al día los pacientes pueden presentar hipersalivación (Josiassen y cols., 2005).
- c) Benzodiazepinas. Se utilizan para tratar la agitación, ansiedad e irritabilidad en los pacientes. No es común el uso de estos fármacos con clozapina, una complicación seria con esta combinación es un colapso cardiorrespiratorio (Buur-Rasmussen y Brøsen, 1999; Besag y Berry, 2006; Conley y Kelly, 2007).
- d) Estabilizadores del estado de ánimo: Carbamacepina, aumenta la probabilidad de agranulocitosis. El tratamiento con carbamacepina produce disminución en los niveles plasmáticos de clozapina, ya que induce los citocromos CYP1A2 y CYP3A4, que participan en el metabolismo de clozapina. (Khan y cols. 2005).
- e) Ácido valproico se utiliza en conjunto con clozapina para disminuir el riesgo de convulsiones; los efectos secundarios reportados con esta combinación son sedación y alteraciones en la función hepática; con respecto al efecto sobre los niveles plasmáticos de clozapina los resultados aún son contradictorios (Besag y Berry, 2006).
- f) Litio: con esta combinación no se ha observado incremento de los efectos adversos, el litio no afecta las enzimas del citocromo P450, ya que se absorbe en su totalidad por la mucosa digestiva y no presenta metabolismo hepático. Se utiliza para disminuir el riesgo de agranulocitosis en los pacientes tratados

con clozapina además de que reduce los síntomas negativos, así como los afectivos (Chong y Remington, 2000).

- g) Antidepresivos tricíclicos. Pueden aumentar los efectos adversos relacionados con la actividad anticolinérgica.
- h) Inhibidores de la recaptura de serotonina (SSRI). Fluoxetina, fluvoxamina y sertralina; aumentan los niveles plasmáticos de clozapina, esto se debe a que inhiben los CYP1A2 y CYP3A4 que participan en el metabolismo de clozapina. El uso de fluoxetina en el tratamiento con clozapina potencia su actividad y mejora la función cognitiva en los pacientes, esta combinación se utiliza en los pacientes esquizofrénicos que no responden al tratamiento; la dosis de fluoxetina debe ser menor a 60 mg/día para evitar temor y nerviosismo; en algunos pacientes se ha observado hipersalivación, hipotensión y leucopenia (Chong y Remington, 2000; Besag y Berry, 2006; Conley y Kelly, 2007).

#### **Efectos indeseables Agranulocitosis.**

Puede tratarse también de granulocitopenia, su prevalencia es del 1%. Es más frecuente en mujeres y en personas de edad avanzada, se presenta con mayor frecuencia en los primeros 3 meses de tratamiento. Para su prevención y manejo se siguen las siguientes medidas:

- 1) Evitar la asociación de clozapina con fármacos identificados que producen agranulocitosis.
- 2) Biometría hemática completa antes de iniciar el tratamiento.
- 3) Biometría hemática semanal durante las primeras 18 semanas y posteriormente mensual durante todo el tratamiento.
- 4) Biometría hemática 2 veces por semana si la cuenta de leucocitos es menor de  $3.5 \times 10^9/L$  y la de granulocitos neutrófilos está entre  $2.0$  y  $1.5 \times 10^9/L$ .
- 5) Suspensión del tratamiento si la cuenta de leucocitos es menor de  $3.0 \times 10^9/L$  y la de granulocitos neutrófilos es menor de  $1.5 \times 10^9/L$  (Chong y cols., 2000)

**Crisis convulsivas.** Su incidencia es del 1% en pacientes que reciben menos de 600 mg de clozapina al día, dosis mayores incrementan esta incidencia hasta 5%. Son más frecuentes en pacientes con antecedentes de epilepsia; se pueden tratar con antiepilépticos o bien con la reducción de la dosis de clozapina (Khan y Preskorn, 2005).

**Fiebre.** Su prevalencia alcanza hasta el 20%, se le considera transitoria y benigna si no se prolonga más allá de cuatro semanas. Se controla con antipiréticos, se debe tener cuidado que la fiebre no sea por infecciones o por síndrome neuroléptico maligno (Karagianis y cols., 1999; Redding y cols., 1993).

**Otros.** Sedación, taquicardia, cefalea, constipación, aumento de peso, mareo y disfunción sexual (Aichhorn y cols. 2006; Khan y Preskorn, 2005; Oyewumi y cols., 2004).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los pacientes con esquizofrenia resistente pueden presentar agranulocitosis como efecto adverso durante el tratamiento con clozapina, por lo cual se justifica el realizar monitoreo para observar una posible relación entre la concentración plasmática de clozapina o de su metabolito activo, la N-desmetil, con el desarrollo de agranulocitosis; así como evaluar la posible influencia de otros factores demográficos sobre los niveles de clozapina.

## **HIPÓTESIS**

El monitoreo de niveles plasmáticos de los pacientes que estén bajo tratamiento con clozapina permitirá determinar si existe una relación entre la concentración plasmática de clozapina y la presencia de agranulocitosis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Monitorear los niveles plasmáticos de clozapina en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia resistente y evaluar la posible relación con la toxicidad y la influencia de diversos factores demográficos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar un método analítico por CLAR para el análisis y cuantificación de clozapina y sus principales metabolitos, la N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina, en plasma de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana: NOM-177-SSA 1-1998.
- Cuantificar los niveles de clozapina y N-desmetil clozapina en muestras plasmáticas de pacientes bajo tratamiento con clozapina.
- Determinar la influencia de algunos factores como edad, género, hábito de fumar, uso de medicamentos concomitantes sobre los niveles plasmáticos de clozapina.
- Evaluar la relación entre las concentraciones plasmáticas de clozapina y su metabolito principal, con los efectos adversos hematológicos que presenten los pacientes y los factores demográficos mencionados en el punto anterior.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

La parte experimental se dividió en dos: la analítica y la clínica con pacientes. A continuación se presentan los aspectos relacionados con el método analítico, su optimización y validación.

## **MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLOZAPINA Y DOS DE SUS METABOLITOS. OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN.**

### **Estándares.**

- Clozapina. Sigma – Aldrich Inc.
- Loxapina (Estándar Interno). Sigma – Aldrich Inc.
- N – desmetil clozapina. Sigma – Aldrich Inc.

### **Reactivos**

- Metanol grado HPLC, Mallinckrodt.
- Acetonitrilo grado HPLC, Mallinckrodt.

- Acetato de amonio RA, Sigma – Aldrich Inc.
- Ácido acético RA, Sigma – Aldrich Inc.
- Alcohol isoamílico RA, pureza 98 %. Sigma – Aldrich Inc.
- Hexano RA, Sigma – Aldrich Inc.
- Hidróxido de sodio, J T Baker
- Agua desionizada.
- Nitrógeno industrial

### **Material y Equipo**

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Agilent Technologies, serie 1200 equipado con:
  - Bomba isocrática modelo G1310A
  - Detector de longitud de onda variable UV – Visible modelo G1314B
  - Automuestreador modelo G1329A

### **Preparación de la curva de calibración de clozapina en metanol y plasma**

- Tomar una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo de clozapina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y aforar a 10 mL con metanol o con plasma, para obtener una solución de 1000 ng /mL de clozapina.
- De la solución anterior tomar una alícuota de 3.5 mL y aforar con metanol HPLC o con plasma a 5 mL, para obtener una solución de 700 ng/ mL de clozapina.
- De la solución que contiene 1000 ng/ mL tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración de 500 ng/mL de clozapina.
- De la solución que contiene 500 ng/ mL tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración de 250 ng/mL de clozapina.
- De la solución que contiene 250 ng/ mL tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración de 125 ng/mL de clozapina.

- De esta última dilución tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración de 62.5 ng/mL de clozapina.

#### **Preparación de la curva de calibración del metabolito de clozapina (N – desmetil clozapina) en metanol y plasma.**

Tomar una alícuota de 100 µL de la solución de trabajo de N-desmetil clozapina, aforar a 10 mL con metanol o con plasma, para obtener una solución con 800 ng /mL de N-desmetil clozapina.

De la solución anterior tomar una alícuota de 3.5 mL y aforar con metanol HPLC o con plasma a 5 mL, para obtener una solución con 560 ng/ mL de N- desmetil clozapina.

De la solución que contiene 800 ng /mL de N- desmetil clozapina tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración con 400 ng/mL de N- desmtil clozapina.

De la solución que contiene 400 ng/ mL de N- desmetil clozapina tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración con 200 ng/mL de N-desmetil clozapina.

De la solución que contiene 200 ng/ mL de N-desmetil clozapina tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración con 100 ng/mL de N-desmetil clozapina.

De esta última dilución tomar una alícuota de 5 mL y aforar a 10 mL con metanol HPLC o con plasma para obtener una concentración con 50 ng/mL de N-desmetil clozapina.

#### **Preparación de los puntos control en plasma.**

De las soluciones de la curva que contienen 1000 ng/ mL de clozapina y 800 ng/mL de N-desmetil clozapina tomar una alícuota de 8 ml y aforar a 10 ml con plasma para obtener concentraciones de 800 ng/ mL de clozapina y 640 ng/mL de N-desmetil clozapina respectivamente.

Tomar 5 mL de la solución anterior y aforar a 10 mL con plasma, para obtener concentraciones de 400 ng/mL de clozapina y 320 ng/mL de N-desmetil clozapina.

Para el punto de concentración bajo tomar 2 mL de la dilución anterior y aforar a 10 mL con plasma para obtener 80 ng/ mL de clozapina y 64 ng/mL de N-desmetil clozapina.

### **Optimización del método analítico para cuantificar clozapina y su metabolito principal N – desmetil clozapina en plasma.**

Para la determinación rutinaria de los niveles de clozapina y N – desmetil clozapina en pacientes, la primera parte del estudio consistió en implementar el método analítico para la cuantificación de clozapina y su metabolito en plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución, basándose en los trabajos reportados por: Frahnert, 2003; García y cols., 2003; Llerena y cols., 2001; Mosier y cols., 2003; Palego y cols. 2001; Titier y cols. 2003. En la tabla No. 3 se presentan las condiciones propuestas en los diferentes trabajos para la separación de la clozapina y sus metabolitos.

### **Selección de la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda$ max).**

De acuerdo a información previa la detección de clozapina y su metabolito se realizó con un detector de UV a 220 nm, disolviendo la muestra en acetonitrilo grado HPLC (Garay y cols., 2003).

Tabla No. 3 Métodos analíticos por CLAR reportados para la separación de clozapina y sus metabolitos.

AUTOR	Frahnet	Mosier	Titler	Palego	Llerena
TAMAÑO DE PÁRTICULA	5µm	5µm		5µm	5µm
PRECOLUMNA		CN 4x3mm			
FASE MÓVIL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Acetonitrilo (60:40)	Acetonitrilo:Agua:Acetato de amonio 1M (50:49:1)	Buffer de fosfatos 50mM pH=3,8:Acetonitrilo 15 a 35%	370 ml Acetonitrilo:630ml agua con 0.5% Tetrametilendiamina 0.01% trietilamina	5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :320 mL ACN: 190 µL HClO <sub>4</sub> , 100µLH <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> aforar a 1L con agua
pH DE LA FASE MÓVIL	7	5	3.8	6.5	
FLUJO (mL/min)	1	1	1.5	1.5	1
λ (nm)	230	254	240	254	230
VOLUMEN DE INYECCIÓN (µL)	100	50	100	100	100
DETECTOR	U.V.	U.V.	Arreglo de diodos	Arreglo de diodos	U.V.
ESTANDAR INTERNO	Melperona	Loxapina	Metilrisperidona	Dibenzepina	Protriptilina

### **Elección de la columna cromatográfica.**

Se realizaron pruebas con las siguientes columnas para la separación de clozapina y su metabolito N-desemtil clozapina:

- Lichrosorb RP 5 $\mu$ m, 250 x 4.6 mm.
- Spherisorb 5 $\mu$ m, 250 x 4.6 mm.
- Columna para catecolaminas 5 $\mu$ m, 100 x 4.6 mm.
- Brava Cyano 5 $\mu$ m, 250 x 4.6 mm.

La columna donde se obtuvo la mejor separación de clozapina y su metabolito fue la Brava Cyano, utilizando concentraciones de: 500 ng /mL de clozapina y 400 ng/mL de N – desmetil clozapina; una fase móvil compuesta de acetonitrilo/agua/acetato de amonio (50:49:1) a un flujo de 1 mL/min. Se inyectó un volumen de 100  $\mu$ L. Para la elección de la columna, se consideraron los siguientes parámetros:

- El tiempo de retención de clozapina (RT) fue de 18 minutos; corresponde a una respuesta cromatográfica del fármaco, sin interferencia de señales endógenas y permite la separación adecuada del fármaco y de su metabolito.
- Simetría  $\sim$  1, se obtiene un pico sin coleo, con una separación adecuada, una integración y cuantificación eficiente del fármaco.

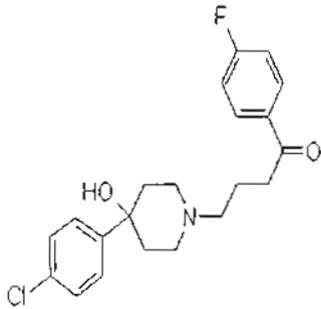
### **Optimización de la fase móvil.**

Se optimizó la fase móvil y su elección se basó en aquella que definiera mejores tiempos de retención y resolución de los picos, para garantizar una buena separación y un análisis rápido de la muestra de plasma. Para tal objetivo, se evaluaron diferentes proporciones de la composición acetonitrilo/ buffer de fosfatos, dos diferentes pHs de 2.8 y 5 para las primeras tres columnas mencionadas anteriormente y diferentes proporciones de acetonitrilo/agua /acetato de amonio con un pH entre 5 y 5.5 para la columna Brava Cyano.

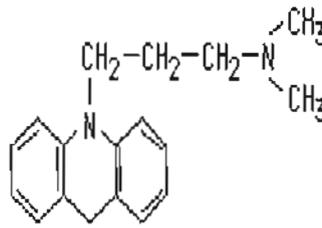
### **Selección del estándar interno.**

Para la selección del estándar interno se probaron los siguientes compuestos, realizando sus correspondientes análisis cromatográficos: Haloperidol, Imipramina,

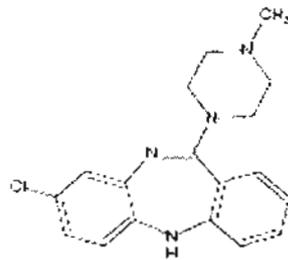
Clorhidrato de Protriptilina y Loxapina. Son compuestos con propiedades fisicoquímicas similares a las de clozapina; en la figura No. 3 se muestran las estructuras químicas. Su tiempo de retención debe ser cercano al de clozapina, sin alterar la separación de sus metabolitos. La respuesta de Loxapina a la misma longitud de onda, 220 nm fue similar a la de los componentes de interés; se mantuvo estable y no reactivo en la muestra por analizar, su concentración, respuesta y detección no se vio alterada durante el análisis.



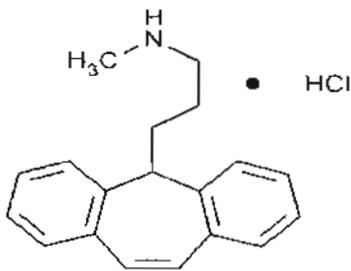
Haloperidol



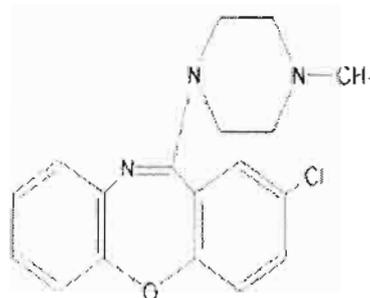
Imipramina



Clozapina



Clorhidrato de Protriptilina



Loxapina.

Fig. No. 3 Estructuras químicas de compuestos probados como estándar interno: haloperidol, imipramina, clozapina, clorhidrato de protriptilina y loxapina.

## **Optimización del método de extracción.**

### **Mezcla de disolventes para la extracción.**

Tomando como base la solubilidad de la clozapina en diferentes disolventes orgánicos así como las referencias antes mencionadas, se realizaron pruebas para la extracción del fármaco, variando el disolvente de extracción: acetato de etilo, hexano, mezcla de hexano/butanol y hexano/alcohol isoamílico; así mismo, también se probaron diferentes volúmenes de las mezclas de disolventes orgánicos. La solución para alcalinizar la muestra también se varió utilizando solución saturada de bicarbonato de sodio o bien solución de hidróxido de sodio 1N y 2N.

### **Tiempo de agitación y centrifugación.**

Otro factor que se probó fue el variar el tiempo de agitación de la muestra en vortex para realizar la extracción de clozapina y su metabolito, utilizando el vortex a una velocidad aproximada de 1800 rpm a diferentes tiempos: 1 minuto, 2 minutos y 2.5 minutos así como variando el tiempo posterior de centrifugación en 10, 15 y 20 minutos a 3000 rpm.

El criterio de selección del método de extracción se enfocó en aquel que ofreciera una mayor recuperación del fármaco y su metabolito, menor presencia de impurezas y repetibilidad en los resultados.

Después de evaluar los factores mencionados, se establecieron las mejores condiciones para realizar la extracción. En la figura No. 4 se presenta la metodología establecida para la cuantificación de clozapina y su metabolito en plasma.

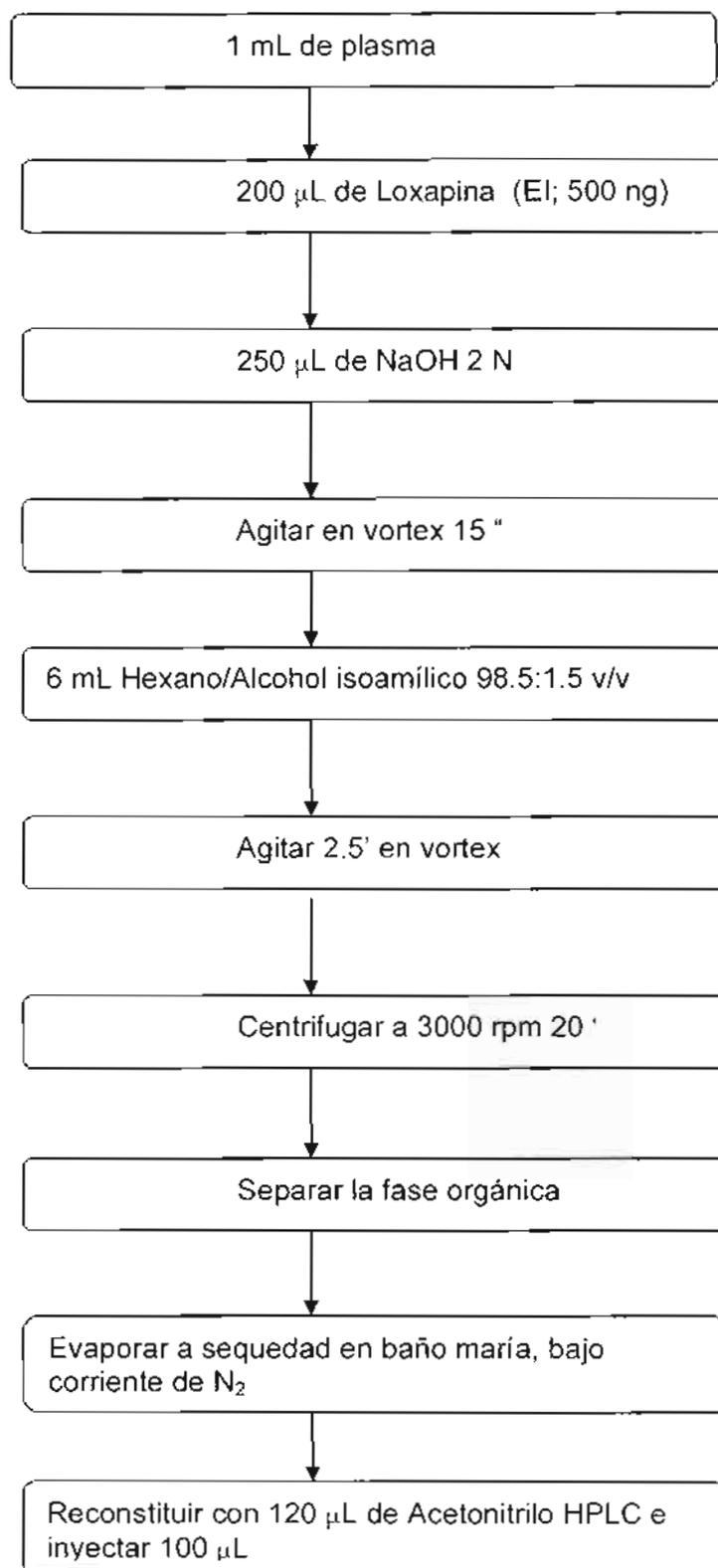


Figura No. 4 Esquema del procedimiento de extracción de clozapina y su metabolito en plasma.

## 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-SSA-1998, en el apartado referente a validación de métodos analíticos para realizar estudios de bioequivalencia (NOM-177).

A continuación se describen los parámetros evaluados.

### Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se determinó preparando 3 curvas patrón de clozapina y N-desmetil clozapina en metanol en los siguientes intervalos de concentración: 62.5 ng/mL a 1000 ng /mL para clozapina y 50 ng/mL a 800 ng/mL para N-desmetil clozapina.

Se graficó la relación de alturas de clozapina/estándar interno contra la concentración de clozapina y las alturas de N-desmetil clozapina/estándar interno contra la concentración del metabolito; para cada curva se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) por un ajuste de mínimos cuadrados. Se considera que el sistema es lineal si el coeficiente de correlación ( $r$ ) es mayor o igual a 0.99.

### Linealidad del método.

La linealidad del método se determinó preparando 3 curvas patrón de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina en plasma, en los siguientes intervalos de concentración: 62.5 ng/mL a 1000 ng /mL para clozapina y 50 ng/mL a 800 ng/mL para N-desmetil clozapina. Las muestras se procesaron de acuerdo al procedimiento indicado en la figura No. 4 del método de extracción. Se graficó la relación de alturas de cada compuesto contra la concentración adicionada: clozapina/ estándar interno y N-desmetil clozapina/ estándar interno; para cada curva se determinó el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), por un ajuste de mínimos cuadrados.

El método se considera lineal, si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99.

### **Precisión del método.**

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, analizando 3 puntos control por duplicado de concentraciones conocidas de clozapina en plasma:

Puntos Control:

Concentración alta: 800 ng/ mL para clozapina y 640 ng/ mL para N-desmetil clozapina,

Concentración media 400 ng/ mL de clozapina y 320 ng/ mL de N-desmetil clozapina.

Concentración baja 80 ng/ mL de clozapina y 64 ng / mL de N-desmetil clozapina.

### **Repetibilidad del método.**

Este parámetro se determinó evaluando por quintuplicado los puntos control de clozapina y su metabolito 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 concentración control. El método es repetible si el coeficiente de variación no es mayor al 15 %.

### **Reproducibilidad del método.**

Para evaluar la reproducibilidad del método se analizaron por duplicado durante tres días continuos de trabajo los puntos control de clozapina y su metabolito 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%.

### **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.

$$\text{Desviación Absoluta} = 100 * \left( \frac{\text{Valor nominal} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor nominal}} \right)$$

#### **Recobro absoluto.**

Se prepararon por triplicado los puntos control bajo, medio y alto de clozapina y su metabolito en metanol y plasma; las muestras se procesaron de acuerdo al procedimiento de extracción indicado en la figura No. 4. 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 debe de ser del 100%, pero si debe ser reproducible en cada nivel de concentración ensayado.

#### **Límite de cuantificación.**

Se analizó por quintuplicado la concentración de 62.5 ng/mL de clozapina y 50 ng/mL N-desmetil clozapina. Se determinó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. Se consideró como 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 %.

#### **Límite de detección.**

Se estableció como límite de detección, la concentración de clozapina y sus metabolitos cuya señal fuera tres veces mayor a la línea basal.

#### **Selectividad.**

Para evaluar la selectividad del método analítico, se analizaron muestras blanco de plasma y muestras de plasma adicionado con clozapina, N-desmetil clozapina y loxapina (E.I.), las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción que se indica en el esquema de la figura No. 4. No deberán observarse interferencias en

los tiempos de retención registrados para: clozapina, N-desmetil clozapina y loxapina (E.I.).

#### **Estabilidad de la muestra analítica.**

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

##### Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

Se determinó analizando por duplicado los puntos control de clozapina y sus metabolitos en plasma, los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas.

##### Estabilidad de la muestra procesada.

Este parámetro se evaluó preparando por duplicado los puntos control de clozapina y su metabolito 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.

##### Estabilidad de la muestra en refrigeración.

Para establecer la estabilidad de las muestras de clozapina y su metabolito bajo condiciones de refrigeración, se prepararon por duplicado los puntos control en plasma, los cuales se mantuvieron en refrigeración a 4 °C y se analizaron en los siguientes tiempos: 0, 8 y 15 días.

##### Estabilidad de la muestra en congelación.

Se evaluó preparando por duplicado los puntos control de clozapina en plasma, las muestras se mantuvieron a -20°C y se analizaron al tiempo 0, 15 y 30 días.

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

## **MONITOREO TERAPÉUTICO DE CLOZAPINA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA.**

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Clínica y por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. A continuación se presentan los criterios y procedimientos empleados en el trabajo.

### **Criterios de inclusión.**

- Pacientes adultos entre 18 y 60 años, sin distinción de género.
- Pacientes con diagnóstico de esquizofrenia de acuerdo a los criterios DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4<sup>a</sup>, edición) que hayan presentado resistencia a los antipsicóticos clásicos y/o no se observó mejoría o bien se observó intolerancia.
- Pacientes que se encuentren bajo tratamiento con Clozapina por al menos 4 semanas previas a su inclusión en el estudio.

### **Criterios de exclusión.**

- a) Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia
- b) Pacientes con alteraciones hepáticas.
- c) Pacientes con alteraciones renales.
- d) Pacientes con adicciones (excepto los fumadores).
- e) Pacientes que estén bajo tratamiento con Eritromicina o Rifampicina.
- f) Pacientes con alteraciones hematológicas (leucocitos  $< 3500/\text{mm}^3$ ) que requieran por su padecimiento la administración conjunta de cualquier otro medicamento que sea potencialmente capaz de causar alteraciones hematológicas.

### **Criterios para la suspensión del tratamiento al paciente.**

Con la finalidad de asegurar la integridad del paciente, se realizaron pruebas hematológicas, por lo que los pacientes se mantuvieron dentro del rango normal: la cuenta de leucocitos  $\geq 3500/\text{mm}^3$  y la de neutrófilos mayor a  $1500/\text{mm}^3$ .

Todos los pacientes fueron tratados de acuerdo a la declaración de Helsinki (Declaración de Helsinki, 2004), a las buenas practicas clínicas (Internacional Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjets, 2002) y las regulaciones locales del Instituto, para salvaguardar sus derechos y bienestar (Lazcano y cols., 2004).

Protocolo de estudio:

Antes de iniciar el estudio clínico los pacientes y sus representantes legales fueron informados del tipo de estudio y sus objetivos. Se les informó que el medicamento clozapina, les sería proporcionado por los laboratorios Psicofarma S. A. DE C. V. durante tres meses, a partir de su inclusión en el estudio, sin costo alguno. Cada paciente (o su representante legal) firmó la forma del consentimiento informado para poder participar en el protocolo (Ley General de Salud, 1987). **ANEXO I**

### **Régimen de Dosificación.**

Participaron 66 pacientes los cuales se mantuvieron con el régimen terapéutico tanto de clozapina como de otros fármacos concomitantes, bajo el cual se encontraban.

En aquellos pacientes que iniciaron tratamiento con CLZ, se administró la dosis correspondiente de acuerdo a las indicaciones médicas.

### **Muestra sanguínea.**

Se prepararon frotis sanguíneos de cada uno de los pacientes para realizar el conteo de leucocitos y neutrófilos, para lo cual se les tomaron muestras sanguíneas de 2 mL durante un período de 3 meses; si el paciente tenía menos de 3 meses con la administración de clozapina la toma de muestra se realizó de manera semanal; si el paciente tenía más de 3 meses bajo tratamiento, la toma de muestra sanguínea se hizo mensual.

Para determinar la concentración plasmática de clozapina y sus metabolitos se recolectaron muestras sanguíneas de 5 mL por un período de tres meses, después de su inclusión en el estudio. El día de la toma de la muestra sanguínea esta se tomó previo a la administración de la siguiente dosis de clozapina, utilizando para ello tubos vacutainer con EDTA, se separó el plasma por centrifugación y se almacenaron a -20° C hasta el momento de su análisis. Las muestras fueron identificadas de acuerdo a los datos personales del paciente y su registro, ninguna de las muestras se analizó en un período mayor a 15 días.

#### **Determinación de clozapina en plasma.**

Los niveles en plasma de clozapina y N-desmetil clozapina se determinaron con el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución previamente validado.

#### **Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos de los niveles plasmáticos de clozapina y de su metabolito N-desmetil clozapina de los pacientes que participaron en el protocolo, se analizaron empleando el software SPSS 13, aplicando diferentes pruebas estadísticas.

### **RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

#### **MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLOZAPINA EN PLASMA.**

##### **Optimización del método analítico para cuantificar clozapina y N-desmetil clozapina en plasma.**

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

- Con respecto a la longitud de onda para la detección de clozapina y su metabolitos, se trabajó a 220 nm basándonos en el trabajo realizado por Garay y cols., 2003, ya que la respuesta que se observó en los cromatogramas fue adecuada.

- Se decidió emplear la columna Bravao – CN (longitud de 250 mm, 4.6 mm de diámetro interno y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula), con la que se obtuvo la mejor respuesta cromatográfica y una buena separación entre clozapina y su metabolito. La simetría de la clozapina con esta columna es de 0.97 y la de N – desmetil clozapina es 0.49. Se utilizó una precolumna del mismo material y tamaño de partícula de la columna Bravao CN para mejorar las condiciones cromatográficas y una fase móvil compuesta de acetonitrilo/agua/acetato de amonio 1M (50:49:1 v/v), pH de 5.5 a un flujo de 1 mL/min. El tiempo de corrida fue de 20 minutos y los tiempos de retención que se obtienen bajo estas condiciones son: 14.9 min para N-desmetil clozapina, 17.9 min para clozapina y 19.6 min para loxapina el cual se utiliza como estándar interno. En la figura No. 5 Se presenta un cromatograma obtenido con las condiciones descritas en solución con metanol.



Figura No. 5 Cromatograma en solución metanólica donde se muestra la separación entre clozapina, su metabolito principal, N-desmetil clozapina y loxapina, como estándar interno; utilizando la columna Bravao CN.

En el caso de la columna Lichrosorb RP 5 $\mu$ m (250 x 4.6 mm) solamente se obtuvo un pico con un tiempo de retención de 9.54 sin obtener la separación del metabolito activo y clozapina; la figura No. 6 presenta el cromatograma obtenido con esta columna.

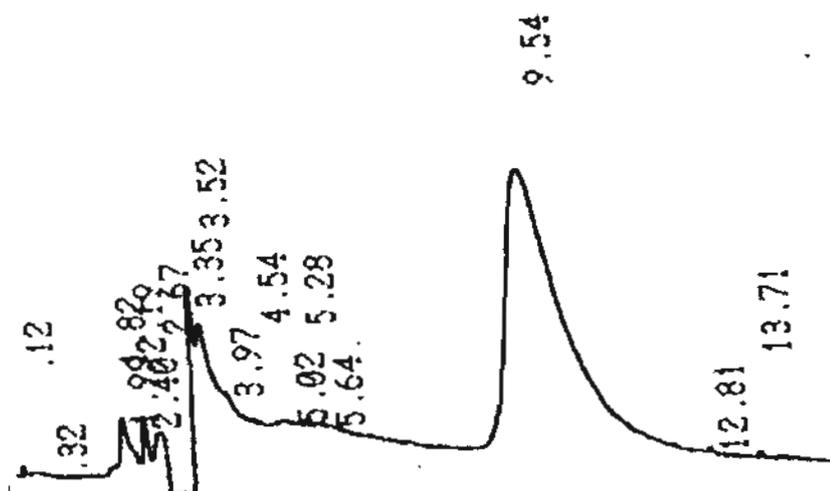


Figura No. 6 Cromatograma en solución metanólica al utilizar la columna Lichrosorb RP para la separación de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.

En la figura No.7 se muestra el cromatograma obtenido utilizando la columna Spherisorb (5µm, 250 x 4.6 mm), no se obtuvo la separación entre clozapina y su metabolito, observándose un pico con tiempo de retención de 7.2 minutos.

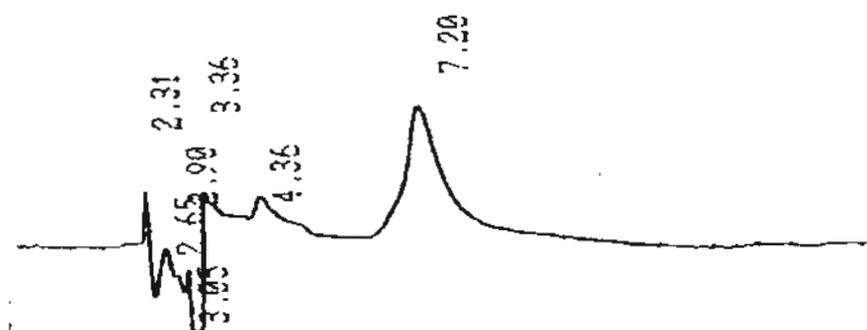


Figura No. 7 Cromatograma obtenido al utilizar la columna Spherisorb para la separación de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.

En la figura No. 8 se presenta el cromatograma obtenido con la columna para catecolaminas (5µm, 100 x 4.6 mm) se obtuvieron dos picos con tiempos de retención de 4.79 y 5.78 respectivamente, en los cuales se observa coleo, sin obtener una separación adecuada entre ellos.

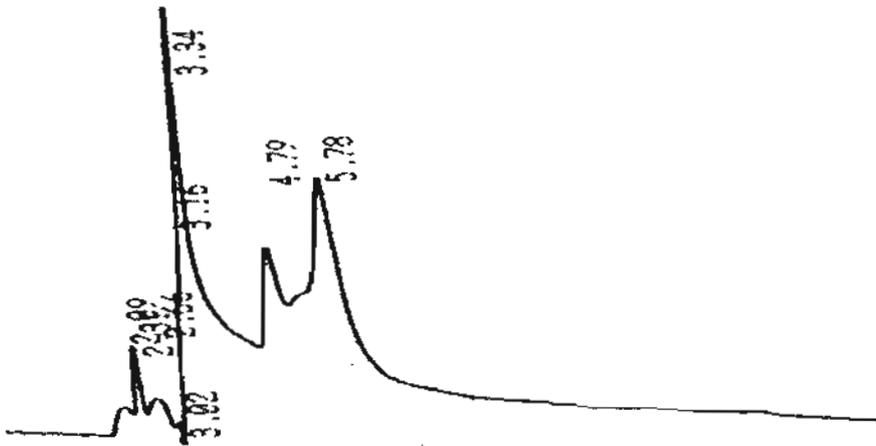


Figura No. 8 Cromatograma obtenido utilizando la columna para catecolaminas en la separación de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.

Con las 3 columnas anteriores se utilizó una fase móvil constituida por solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Acetonitrilo (60:40) (Frahert, y cols, 2003).

- Para la elección del estándar interno con las condiciones cromatográficas seleccionadas el haloperidol y la imipramina presentaron tiempos de retención muy largos y la resolución de los picos fue inadecuada; con respecto a clorhidrato de protriptilina el tiempo de retención que se obtuvo fue de 14.4 min y no fue posible obtener una separación adecuada entre la protriptilina y la N-desmetil clozapina. La loxapina fue el compuesto seleccionado como estándar interno ya que químicamente es muy similar a la clozapina y durante el proceso de extracción es muy estable, obteniendo una recuperación en la muestra plasmática de 103.7 % con un tiempo de retención de 16 min lo cual permite observar una buena separación entre todos los componentes de interés en el cromatograma.

- El método de extracción consiste en una extracción líquida simple con una mezcla de hexano: alcohol isoamílico (98.5:1.5, v/v) y agitación en vortex durante 2.5 minutos: Con este procedimiento se obtiene un porcentaje de recuperación para clozapina de 99.6% (DE=1.15) y para N- desmetil clozapina de 86.5 % (DE =4.5). Se observaron escasas impurezas en el cromatograma y se obtuvo repetibilidad adecuada en los resultados. Es importante mencionar que el método de extracción (Llerena y cols., 2001) es sencillo y rápido comparado con otros métodos publicados (Frahner, 2003; y Palego y cols. 2001); en los cuales se utiliza extracción en fase sólida, este método representa ahorro de tiempo y una disminución en los costos del procedimiento.

A continuación se describen las condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras y en la figura No. 9 se presenta el cromatograma que se obtuvo con una muestra de 500 ng/mL de clozapina, 400 ng/mL N-desmetil clozapina y 250 ng/mL N-óxido clozapina.

- Columna: Bravao – CN, 250 mm X 4.6 mm., 5 $\mu$ m.
- Precolumna: Bravao – CN, X 4.6 mm., 5 $\mu$ m.
- Fase móvil: Acetonitrilo:Acetato de amonio 1 M: Agua (50:1:49, v/v), pH de 5.5.
- Velocidad de flujo: 1.0 mL/min.
- Longitud de onda: 220 nm
- Tiempo de corrida: 20 min.

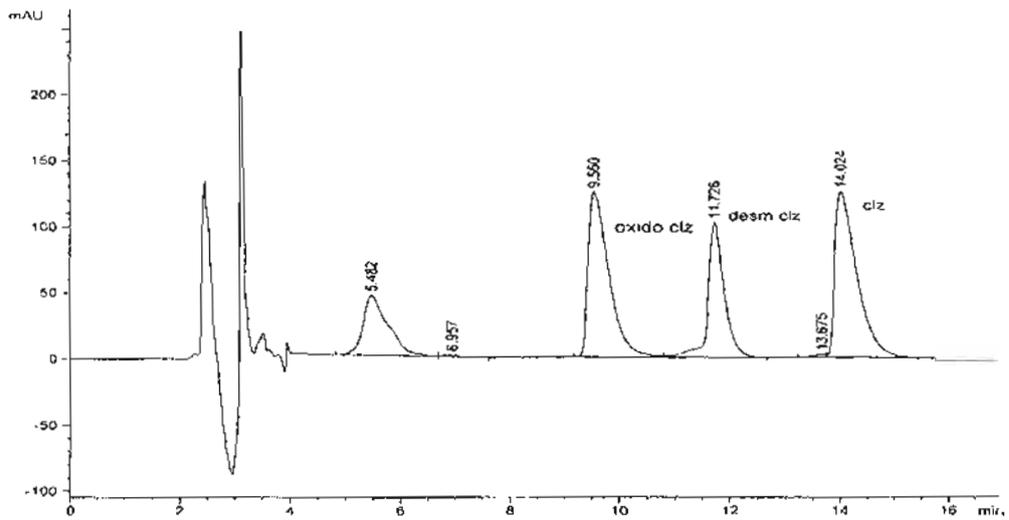


Figura No. 9. Cromatograma de una solución metanólica conteniendo Clozapina, N-desmetil clozapina y N-óxido clozapina.

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

Los valores promedio de la relación de alturas de las curvas de clozapina preparadas en metanol en el intervalo de 62.5 - 1000 ng/ mL, presentaron un CV de 0.2 y 2.2 %. La gráfica correspondiente a la linealidad del sistema se presenta en la figura 10. Dado que el coeficiente de correlación fue de 0.99929, se encontró que la relación entre la concentración y la respuesta es lineal dentro del intervalo de concentraciones de trabajo.

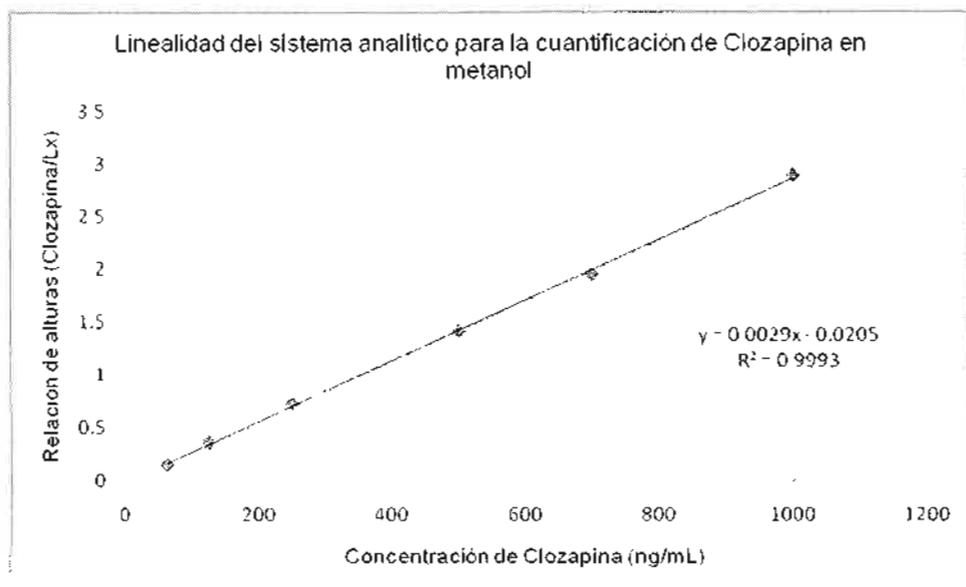


Figura No.10. Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de clozapina en metanol.

Los valores promedio de la relación de alturas de las curvas de N-desmetil clozapina preparadas en metanol en el intervalo de 50 - 800 ng/ mL, presentaron un coeficiente de variación (CV%) entre 0.3 y 2.5. La gráfica correspondiente a la linealidad del sistema se presenta en la figura 11. Dado que el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9986, la relación entre la concentración y la respuesta es lineal dentro del intervalo de concentraciones de trabajo.

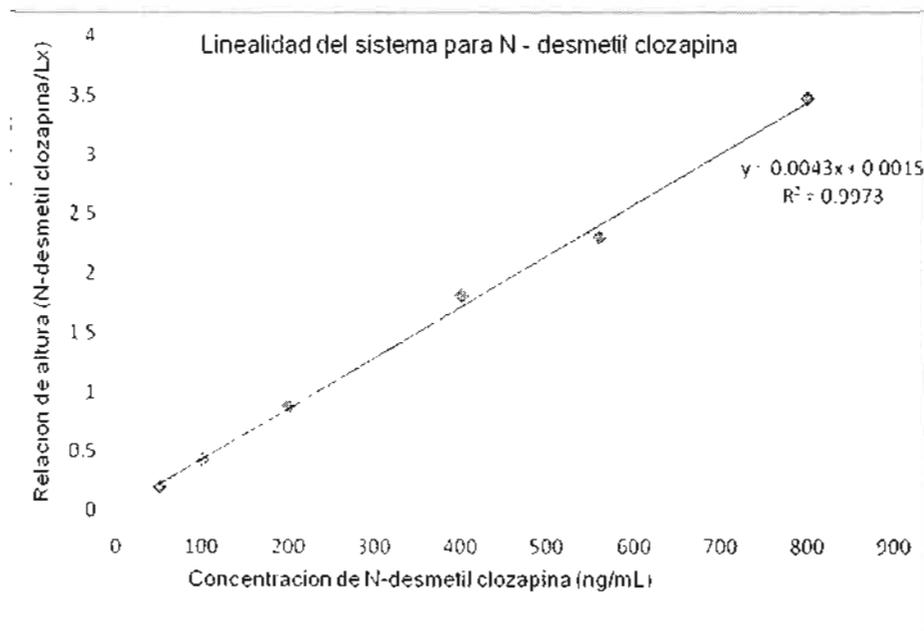


Figura No. 11 Linealidad del sistema analítico para la cuantificación de N-desmetil clozapina en metanol.

### Linealidad del método para clozapina.

Con los valores promedio de la relación de alturas de las 3 curvas de clozapina preparadas en plasma en el intervalo de 62.5 – 1000 ng/mL, se observa que el CV se encuentra entre 1.3 y 7.7 %.

En la Figura 12 se muestra la gráfica correspondiente a la linealidad del método analítico para clozapina. Dado que el coeficiente de correlación promedio fue de 0.99934, se encontró que la relación entre la concentración y respuesta es lineal, dentro del intervalo de las concentraciones de trabajo.

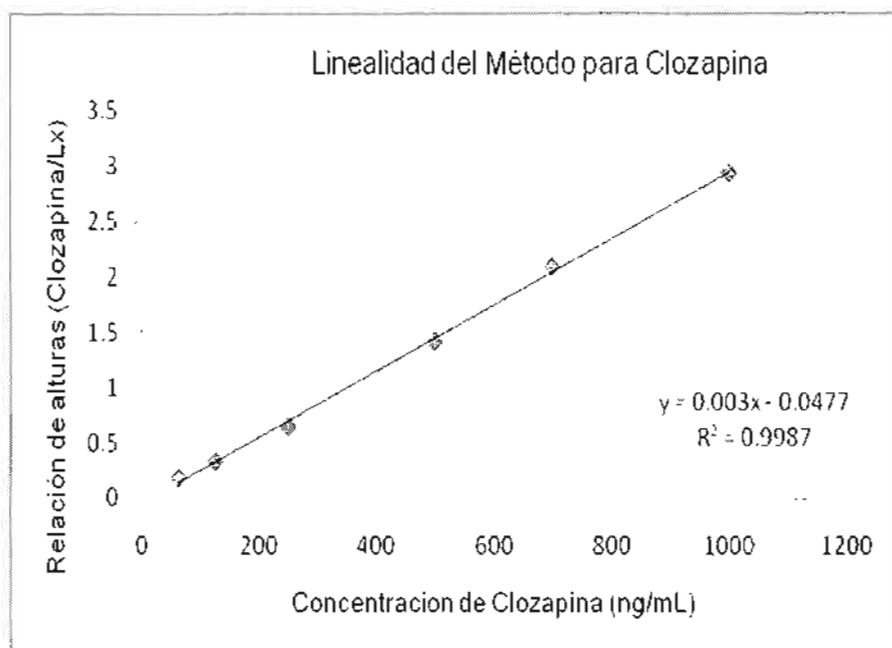


Figura No. 12 Linealidad del método analítico para cuantificar clozapina.

Con los valores promedio de la relación de alturas de las 3 curvas de N – desmetil clozapina preparadas en plasma, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9956, lo cual indica que la relación entre la concentración y respuesta es lineal dentro del intervalo de concentraciones de trabajo.

La Figura 13 muestra la gráfica correspondiente a los resultados de linealidad del método en el rango de concentración de 50 a 800 ng/mL,

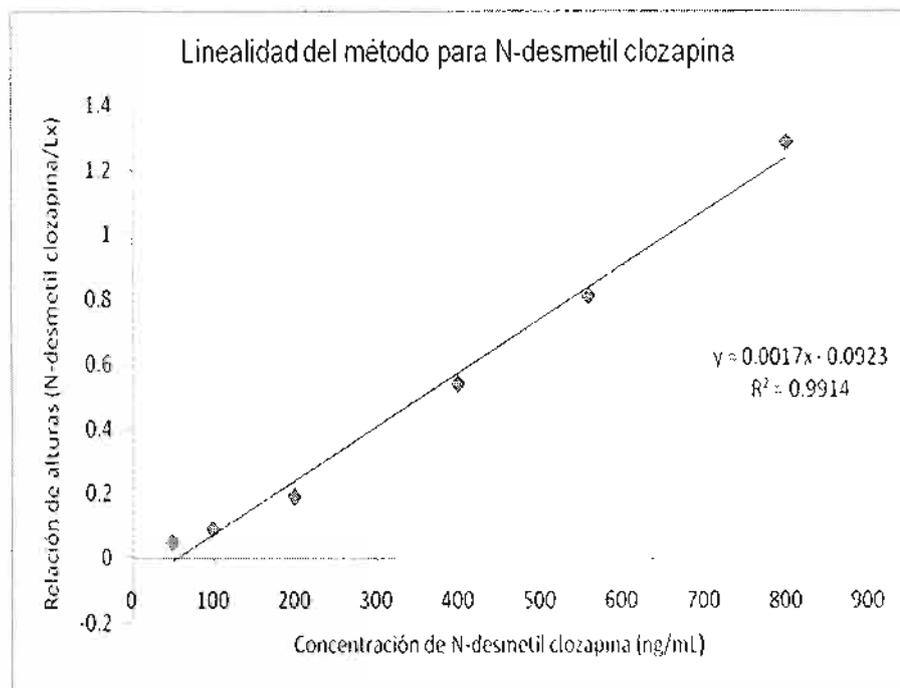


Figura No. 13 Linealidad del método para cuantificar N-desmetil clozapina.

### Precisión del método

#### Repetibilidad del método para clozapina

En la tabla No. 4 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la repetibilidad del método analítico para cuantificar clozapina en plasma. Los resultados muestran que el coeficiente de variación osciló entre 1.77 y 8.8 %; por lo que de acuerdo a las especificaciones, el método analítico se considera repetible ya que no fueron mayores al 15 %.

Tabla No.4. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma.

Concentración ng/mL	Relación de alturas CLZ/Lx					Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
80	0.2839	0.3075	0.3226	0.3160	0.2509	0.2961	0.0261	8.8
400	1.4600	1.2259	1.2654	1.1895	1.2178	1.2717	0.0972	7.64
800	2.3621	2.2901	2.3729	2.4071	2.3159	2.3496	0.0417	1.77

### Repetibilidad del método para N – desmetil clozapina

En la tabla No. 5 se presentan los resultados de la repetibilidad del método analítico para N – desmetil clozapina en plasma, Los resultados muestran nuevamente que el coeficiente de variación no fue mayor al 15 %, osciló entre 6.9 y 10.4 %; por lo cual, el método se considera repetible

**Tabla No. 5 Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de N – desmetil clozapina en plasma.**

Concentración ng/mL	Relación de alturas CLZ/Lx					Promedio	Desviación Estándar	CV (%)
64	0.10894	0.12941	0.11424	0.10924	0.1274	0.11784	0.0088	7.5
320	1.18434	1.41836	1.19540	0.99832	1.1338	1.18604	0.12384	10.4
640	2.5236	2.3945	2.2194	2.7983	2.4589	2.47894	0.17266	6.9

### Reproducibilidad del método para clozapina

En la tabla No. 6 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método analítico para cuantificar CLZ en plasma la cual fue evaluada en dos días diferentes de análisis. La desviación absoluta osciló entre 2.08 y 6.0 % demostrando que el método analítico es reproducible bajo las condiciones especificadas.

**Tabla No. 6. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de clozapina en plasma.**

Concentración ng/mL	Relación de alturas promedio CLZ/Lx			Valor Experimental Promedio	Valor Nominal	% Desviación Absoluta
	Día 1	Día 2	Día 3			
80	0.2837	0.2837	0.3018	0.2897	0.2733	6.00
400	1.1363	1.1636	1.3510	1.2169	1.1920	2.08
800	2.3600	2.4799	1.9727	2.2708	2.3403	2.96

### Reproducibilidad del método para N – desmetil clozapina.

En la tabla No. 7 se encuentran los resultados de la reproducibilidad del método analítico para cuantificar la N – desmetil clozapina en plasma en 2 diferentes días.

La desviación absoluta se encuentran entre 4.4 y 6.6 % lo por lo que el método analítico es reproducible bajo las condiciones especificadas.

**Tabla No. 7. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de N – desmetil clozapina en plasma**

Concentración ng/mL	Relación de alturas promedio N- desmetil CLZ/Lx			Valor Experimental Promedio	Valor Nominal	% Desviación Absoluta
	Día 1	Día 2	Día 3			
64	0.1334	0.1261	0.10723	0.12224	0.1284	4.7
320	1.14107	1.13103	1.1564	1.14283	1.1955	4.4
640	2.2789	2.5843	2.2194	2.36086	2.5294	6.6

#### **Exactitud del método para clozapina.**

En la tabla No. 8 se muestran los resultados promedio de los valores experimentales de la relación de 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 ser menor del 15 % del valor nominal de la concentración.

**Tabla No. 8. Exactitud del método para cuantificar clozapina en plasma.**

Concentración ng/mL	Relación de alturas promedio CLZ/Lx		Valor Experimental Promedio	Valor Nominal	% Desviación Absoluta
	Repetibilidad	Reproducibilidad			
80	0.2961	0.2897	0.2929	0.2733	7.17
400	1.2717	1.2169	1.2443	1.1920	4.38
800	2.3496	2.2708	2.3102	2.3403	1.28

#### **Exactitud del método para N – desmetil clozapina.**

En la tabla No. 9 se muestran los resultados promedio de los valores experimentales de la relación de 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 ser menor del 15 % del valor nominal de la concentración.

**Tabla No. 9. Exactitud del método para cuantificar N – desmetil clozapina en plasma.**

Concentración ng/mL	Relación de alturas promedio N – desmetil CLZ/Lx		Valor Experimental Promedio	Valor Nominal	% Desviación Absoluta
	Repetibilidad	Reproducibilidad			
64	0.11784	0.12224	0.12004	0.12844	6.5
320	1.18604	1.14283	1.1644	1.1955	2.6
640	2.47894	2.36086	2.4199	2.5294	4.3

### **Recobro absoluto de clozapina.**

La tabla No. 10 muestra el porcentaje de recobro obtenido para clozapina en plasma. Se puede observar que la recuperación osciló entre 98.01 y 100.6 %. Las especificaciones indican que el porcentaje de recuperación no debe ser necesariamente 100 % pero debe ser constante en el rango de concentraciones estudiado, por lo que el método cumple con los parámetros establecidos.

**Tabla No. 10. Recobro absoluto de clozapina en plasma.**

Concentración (ng/mL)	Relación de alturas promedio en metanol	Relación de alturas promedio en plasma	% Recobro
80	0.289598	0.291466	100.6
400	1.493352	1.463670	98.01
800	2.473482	2.479958	100.26

### **Recobro absoluto de N – desmetil clozapina.**

En la tabla No. 11 se muestra el porcentaje de recobro obtenido para N–desmetil clozapina en plasma. Se puede observar que la recuperación osciló entre 80.3 y 93.6 %. Las especificaciones indican que el porcentaje de recuperación no debe ser

necesariamente 100 % pero debe ser constante en el rango de concentraciones estudiado, por lo que el método cumple con los parámetros establecidos.

**Tabla No. 11. Recobro absoluto de N – desmetil clozapina en plasma.**

Concentración (ng/mL)	Relación de alturas promedio en metanol	Relación de alturas promedio en plasma	% Recobro
64	0.087075	0.0815049	93.6
320	0.550423	0.471369	85.6
640	1.121208	0.9007712	80.3

#### **Límite de cuantificación de clozapina.**

En el Tabla No. 12 se muestran los resultados de la relación de alturas de clozapina/loxapina para la concentración de 62.5 ng/mL, la cual se cuantificó por quintuplicado y se obtuvo un CV menor al 20 %. Al utilizar la concentración de 31.25 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 62.5 ng/mL.

**Tabla No. 12. Límite de cuantificación para clozapina.**

Concentración (ng/mL)	Relación de Alturas
62.5	0.1729317
62.5	0.1923076
62.5	0.1521212
62.5	0.1337317
62.5	0.161932
Promedio	0.16260484
Desviación Estándar	0.01968
CV (%)	12.09
% Desviación absoluta	6.56 %

### Límite de cuantificación de N-desmetil clozapina.

En tabla No. 13 se muestran los resultados de la relación de alturas de N – desmetil clozapina/ loxapina para la concentración de 50 ng/mL, donde se observa que al realizar la cuantificación por quintuplicado de dicha concentración, se obtiene un CV menor al 20 %. Para la concentración de 25 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 50 ng/mL.

Tabla No. 13. Límite de cuantificación para N-desmetil clozapina.

Concentración (ng/mL)	Relación de Alturas
50	0.05095
50	0.03936
50	0.04704
50	0.04545
50	0.04436
Promedio	0.045432
Desviación Estándar	0.003769
CV (%)	0.08297
% Desviación absoluta	5.16 %

La figura No. 14 muestra el cromatograma con el límite de detección de la clozapina en las condiciones analíticas probadas el cual fue de 7.5 ng/mL.

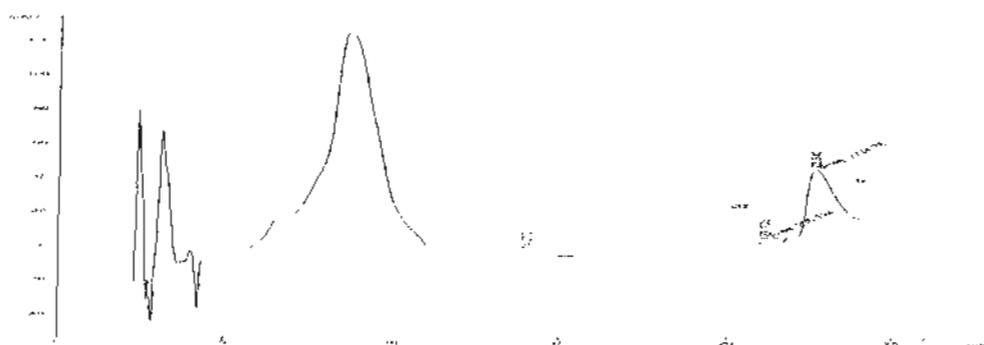


Figura No. 14. Cromatograma que muestra el límite de detección de clozapina en plasma 7.5 ng/mL.

## Selectividad

En las figura No. 15, se muestra el cromatograma representativo de una muestra de plasma sin clozapina; la figura No. 16 presenta una muestra de plasma adicionada con clozapina, N – desmetil clozapina, N – óxido clozapina y Loxapina como estándar interno y la figura No. 17 presenta el cromatograma de una muestra de paciente bajo tratamiento con clozapina. Debido a que no se observaron interferencias con los picos de interés, el método se consideró selectivo para la cuantificación de clozapina y N – desmetil clozapina en plasma.

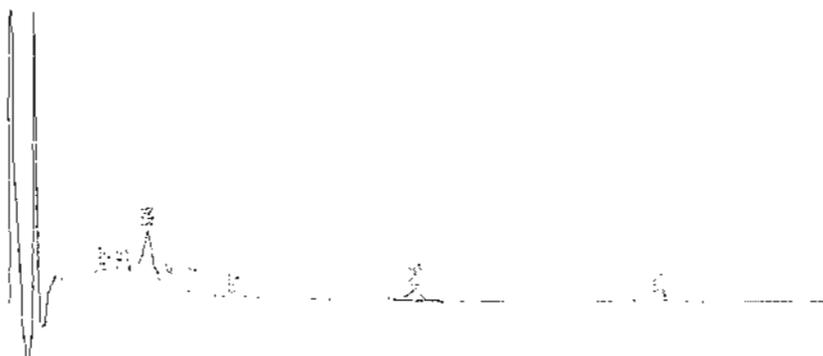


Figura No. 15. Cromatograma de una muestra de plasma sin clozapina.

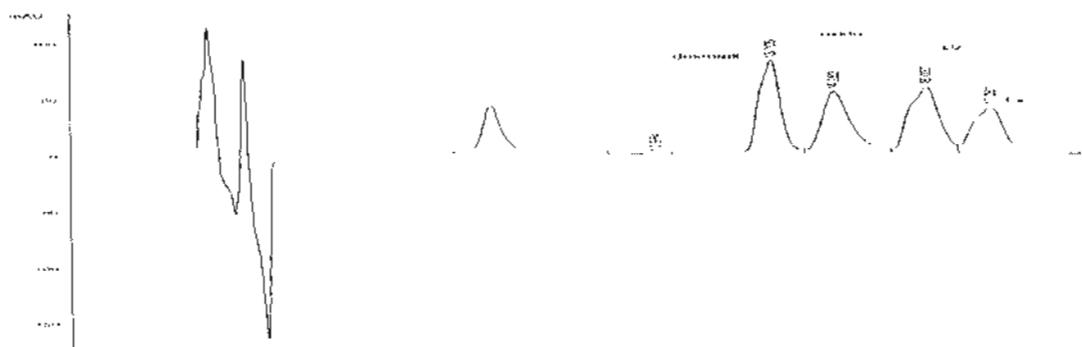


Figura 16. Cromatograma representativo de plasma adicionado con clozapina (500 ng/mL), N – desmetil clozapina (400 ng/mL), N- óxido clozapina (400 ng/mL) y Loxapina (500 ng mL) como estándar interno.



Figura No. 17. Cromatograma de la muestra de plasma de un paciente bajo tratamiento con clozapina (clozapina 660.9 ng/mL, desmetil clozapina 209.8 ng/mL)

#### Estabilidad de la muestra analítica.

#### Estabilidad a temperatura ambiente.

En las tablas No. 14 y No. 15 se presentan los resultados del análisis de las muestras de clozapina y N- desmetil clozapina mantenidas a temperatura ambiente: El valor de la desviación absoluta fue menor al 15 % con respecto al valor original, por lo que se concluye que la clozapina y su metabolito son estables a temperatura ambiente durante 24 horas después de su preparación.

Tabla No. 14. Estabilidad de la muestra de clozapina a temperatura ambiente.

	Control bajo 80 ng/mL	Control medio 400 ng/mL	Control alto 800 ng/mL
Conc. Recuperada	82.38	422.83	802.28
Conc. Recuperada	74.71	413.58	793.73
Promedio	78.54	418.20	798.00
% de Desviación Absoluta	1.82	4.55	0.25

**Tabla No. 15. Estabilidad de la muestra de N – desmetil clozapina a temperatura ambiente.**

	<b>Control bajo 64 ng/mL</b>	<b>Control medio 320 ng/mL</b>	<b>Control alto 640 ng/mL</b>
<b>Conc. Recuperada</b>	71.29	291.47	596.08
<b>Conc. Recuperada</b>	53.51	303.05	579.79
<b>Promedio</b>	62.4	297.26	587.93
<b>% de Desviación Absoluta</b>	2.5	7.10	8.13

**Estabilidad de la muestra procesada.**

En las tablas No. 16 y No. 17 se muestran los resultados obtenidos al analizar las muestras procesadas con clozapina y N – desmetil clozapina a las 24 y 48 horas después de su preparación. Considerando que la desviación absoluta fue menor al 15 % con respecto al valor original, se demuestra que son estables al menos durante 48 horas después de su procesamiento.

**Tabla No. 16. Estabilidad de la muestra procesada de clozapina.**

	<b>Control Bajo 80 ng/mL</b>		<b>Control Medio 400 ng/mL</b>		<b>Control Alto 800 ng/mL</b>	
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Conc. Recuperada</b>	86.35	80.77	387.28	382.64	785.82	753.99
<b>Conc. Recuperada</b>	76.84	75.78	417.66	331.63	738.17	683.5
<b>Promedio</b>	81.59	78.27	402.47	357.13	761.99	718.74
<b>% de Desviación Absoluta</b>	1.99	2.16	0.61	10.71	4.75	10.15

**Tabla No. 17. Estabilidad de la muestra procesada de N – desmetil clozapina**

	<b>Control Bajo 64 ng/mL</b>		<b>Control Medio 320 ng/mL</b>		<b>Control Alto 640 ng/mL</b>	
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Conc. Recuperada</b>	64.5	58.17	305.02	287.37	626.71	554.96
<b>Conc. Recuperada</b>	63.06	58.38	298.32	284.7	617.91	592.29
<b>Promedio</b>	63.78	58.27	301.67	286.03	622.31	573.62
<b>% de Desviación Absoluta</b>	0.34	8.94	5.72	10.61	2.76	10.37

### Estabilidad en refrigeración (4.0° C).

En las tablas No. 18 y No. 19 se muestran los resultados de estabilidad para las muestras plasmáticas de clozapina y N – desmetil clozapina almacenadas bajo condiciones de refrigeración a 4° 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 bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración.

**Tabla No. 18. Estabilidad de las muestras de clozapina en refrigeración**

	Control Bajo 80 ng/mL		Control Medio 400 ng/mL		Control Alto 800 ng/mL	
	Día 8	Día 15	Día 8	Día 15	Día 8	Día 15
Conc. Recuperada	82.4	78.71	406.24	393.32	796.64	795.2
Conc. Recuperada	78.8	77.16	395.96	389.12	833.6	828.8
Promedio	80.6	77.93	401.1	391.22	815.12	812
% de Desviación Absoluta	0.75	2.58	0.27	2.19	1.89	1.5

**Tabla No. 19. Estabilidad de las muestras de N – desmetil clozapina en refrigeración**

	Control Bajo 64 ng/mL		Control Medio 320 ng/mL		Control Alto 640 ng/mL	
	Día 8	Día 15	Día 8	Día 15	Día 8	Día 15
Conc. Recuperada	70.86	61.31	337.59	298.66	621.45	597.26
Conc. Recuperada	62.86	56.39	307.95	305.28	597.89	572.43
Promedio	66.86	58.85	322.77	301.97	609.67	584.84
% de Desviación Absoluta	4.46	8.04	0.86	5.63	4.73	8.61

### Estabilidad en congelación (-20°C).

En las tablas No. 20 y No. 21 se muestran los resultados de la estabilidad para las muestras plasmáticas de clozapina y N – desmetil clozapina mantenidas 30 días en congelación. El porcentaje de desviación absoluta fue menor al 15 %, lo cual indica que las muestras pueden almacenarse durante 30 días a – 20 °C sin presentar degradación.

**Tabla No. 20. Estabilidad de las muestras plasmáticas de clozapina en congelación**

	Control Bajo 80 ng/mL		Control Medio 400 ng/mL		Control Alto 800 ng/mL	
	Día 15	Día 30	Día 15	Día 30	Día 15	Día 30
Conc. Recuperada	80.31	80.21	394.22	391.08	823.53	821.56
Conc. Recuperada	79.23	77.17	403.6	401.54	813.75	796.17
Promedio	79.77	78.69	398.91	396.31	818.64	808.86
% de Desviación Absoluta	0.28	1.63	0.72	0.92	2.33	1.10

**Tabla No. 21. Estabilidad de las muestras plasmáticas de N – desmetil clozapina en congelación**

	Control Bajo 64 ng/mL		Control Medio 320 ng/mL		Control Alto 640 ng/mL	
	Día 15	Día 30	Día 15	Día 30	Día 15	Día 30
Conc. Recuperada	59.68	58.47	302.08	256.96	577.1	547.94
Conc. Recuperada	63.66	61.1	305.28	294.08	604.08	555.16
Promedio	61.67	59.78	303.68	275.52	590.59	551.55
% de Desviación Absoluta	3.64	6.59	5.1	13.9	7.72	13.82

## MONITOREO DE CLOZAPINA EN PLASMA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA.

Una vez validado el método analítico para la cuantificación de clozapina y sus metabolitos en plasma, se procedió a realizar el estudio de monitoreo en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia, quienes se encontraban bajo tratamiento con clozapina al menos 4 semanas previas a su inclusión en el estudio. Previo a la inclusión en el estudio de cada uno de los pacientes, se obtuvo el consentimiento informado.

La tabla No. 22 presenta las características generales promedio de los 66 pacientes incluidos en el estudio:

**Tabla No. 22 Características promedio de los pacientes incluidos en el estudio.**

	TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
	PROMEDIO	DE	PROMEDIO	DE	PROMEDIO	DE
EDAD (años)	36.3	± 9.5	34.6	± 9.5	38.7	± 10.2
PESO (kg)	78.4	± 14.6	83.5	± 14.6	65.6	± 7.0
DOSIS (mg/día)	261.5	± 162.2	261.6	± 174.4	247.5	± 127.1
TIEMPO BAJO TRATAMIENTO CON CLOZAPINA (años)	4.9	± 4.5	4.4	± 4.7	5.0	± 3.0

El diagnóstico de los pacientes se realizó siguiendo los lineamientos del DMS –IV. Los resultados obtenidos se presentan en la figura No. 18. El tipo de esquizofrenia que prevalece en este grupo de pacientes es del tipo paranoide en un 46.96%.

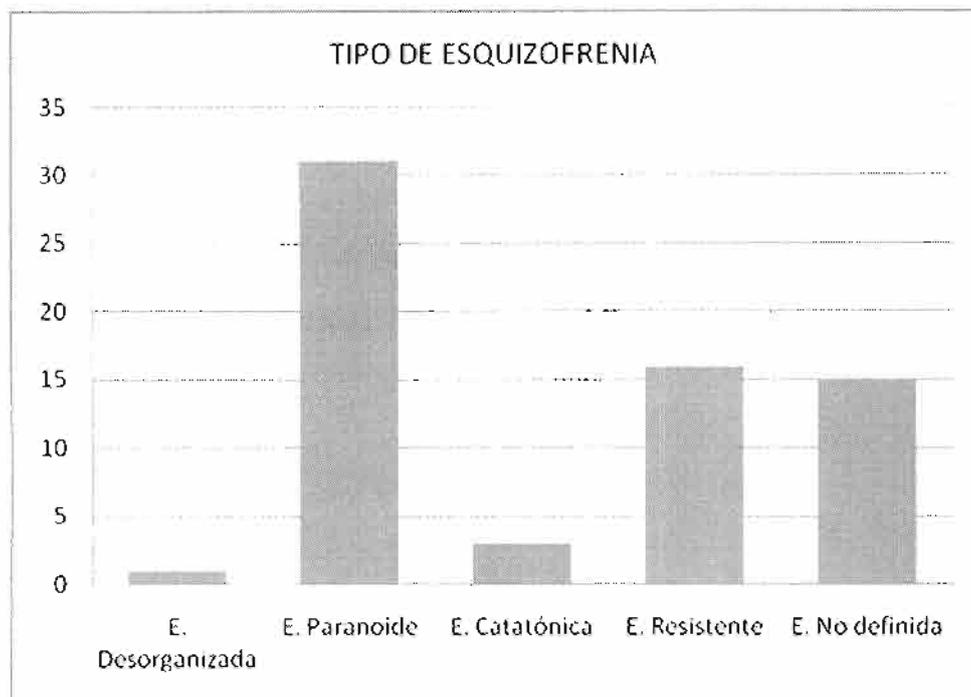


Figura No. 18 Diagnóstico de la frecuencia del tipo de esquizofrenia en los pacientes que participaron en el estudio.

### Niveles de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina en plasma.

En la tabla No. 23 se observan los rangos de dosis administrada a los pacientes que participaron en el estudio así como la relación de N-desmetil clozapina/clozapina cuyo valor promedio fue de 0.50 (DE = 0.14). Este valor es menor al reportado en pacientes Norteamericanos, el cual se ha observado de 0.63 (DE = 0.08) (Aravagari y Marder, 2001).

Tabla No. 23. Rangos de las dosis administradas en los pacientes y la relación N-desmetil clozapina/clozapina.

Rango de dosis (mg/kg)	Número de pacientes	Dosis (mg/kg)		Clozapina (ng/mL)		N-desmetil clozapina (ng/mL)		N-desmetil clozapina/clozapina	
		PROMEDIO	D.E.	PROMEDIO	D. E.	PROMEDIO	D. E.	PROMEDIO	D. E.
37.5-150	17	1.3	0.4	169.3	146.3	127.1	192.5	0.63	0.78
150-250	21	2.6	0.6	363.5	310.6	118.7	132.7	0.29	0.33
300-350	14	4.0	0.7	397.2	223.9	209.1	169.9	0.66	0.74
400-450	9	5.3	0.6	717.7	332.8	284.4	186.1	0.43	0.42
500-900	5	9.3	1.5	810.5	323.8	314.7	354.4	0.47	0.54
	PROMEDIO	4.5	0.8	491.6	267.5	210.8	207.1	0.5	0.6
	D. E.	2.7	0.4	237.5	71.9	79.6	76.5	0.14	0.1

Tabla No. 24. Características demográficas y niveles plasmáticos individuales de CLZ y N-desmetil clozapina en los pacientes que participaron en el estudio (n=66).

PACIENTE	GENERO	EDAD (años)	PESO (kg)	DOSIS (mg/día)	DOSIS (mg/kg)	CLOZAPINA ng/mL	N-desm clz ng/mL	N-desm/clz
1	H	39	80	350	4.38	109.1	0.0	0
2	H	39	80	350	4.38	130.1	357.5	2.7474
3	H	46	70	400	5.71	622.7	192.0	0.3084
4	H	46		400		348.4	550.7	1.5807
5	H	42	112	200	1.79	400.0	103.6	0.2590
6	H	42	112	200	1.79	374.7	0.0	0.0000
7	H	42	112	200	1.79	515.2	190.0	0.3688
8	M	46	64.8	150	2.31	191.5	0.0	0
9	H	48	74	200	2.70	177.3	0.0	0
10	H	30	96	100	1.04	192.3	99.7	0.5186
11	H		91.5	300	3.28	384.7	245.7	0.6387
12	H		99	300	3.03	655.9	259.4	0.3955
13	H		84	100	1.19	487.1	639.7	1.3132
14	H	27	92	100	1.09	0.0	0.0	0
15	H	27	92	100	1.09	339.4	242.4	0.7142
16	H	25	65.4	200	3.06	1101.2	402.0	0.3651
17	M	32	78.7	200	2.54	421.0	281.3	0.6681
18	H	40	78.5	200	2.55	268.8	0.0	0
19	H			50		62.5	0.0	0
20	H	31	78.7	100	1.27	434.5	0.0	0
21	H	43	80.5	900	11.18	1170.6	250.5	0.2140
22	M	29		250		289.2	140.3	0.4852
23	H	37	89	400	4.49	753.2	204.3	0.2712
24	H	29	88	300	3.41	505.6	166.3	0.3288
25	H	23	75	400	5.33	504.3	115.1	0.2283
26	H	30	84	100	1.19	37.1	0.0	0
27	M	23	74.8	350	4.68	340.6	44.8	0.1316
28	H	34	66.5	150	2.26	259.1	71.3	0.2753
29	H	35	72.7	400	5.50	603.6	203.4	0.3370
30	H	34	85	100	1.18	53.2	151.2	2.8455
31	H	21	106	800	7.55	1049.6	199.8	0.1904
32	H	39		200		484.2	110.0	0.2271
33	M	28	59.7	200	3.35	265.0	315.9	1.1918
34	M	36	68	300	4.41	207.7	92.7	0.4461
35	H			300		208.6	54.8	0.2629
36	M	31	65.7	250	3.81	1361.7	407.2	0.2990
37	M	58	60	150	2.50	0.0	0.0	0
38	H	34	100.5	300	2.99	412.4	394.2	0.9560
39	M	60	56	600	10.71	259.4	120.3	0.4639
40	M	46	64.8	150	2.31	191.5	0.0	0
41	H	48	74	200	2.70	177.3	0.0	0
42	H			300		836.3	17.0	0.0203
43	M	35	62	200	3.23	335.1	127.4	0.3803

PACIENTE	GENERO	EDAD (años)	PESO (kg)	DOSIS (mg/día)	DOSIS (mg/kg)	CLOZAPINA ng/mL	N-desm clz ng/mL	N-desm/clz
44	M	36	59.3	200	3.37	378.2	152.1	0.4021
45	H	34	76.3	37.5	0.49	77.3	0.0	0
46	H	23	94	100	1.06	248.8	104.5	0.4202
47	H	66		500		658.4	1003.3	1.5238
48	H	28	55.5	225	4.05	81.9	0.0	0
49	M	37	70	300	4.29	781.5	373.5	0.4779
50	H	30	96	100	1.04	192.3	99.7	0.5186
51	M	45	69	450	6.52	1371.1	554.5	0.4044
52	H	32	75.9	400	5.27	261.2	0.0	0
53	M	43	53.7	300	5.59	477.7	227.6	0.4763
54	M	36	61.5	150	2.44	197.1	35.5	0.1803
55	H	29	79.2	300	3.79	197.7	90.8	0.4592
56	M	52	61	150	2.46	109.0	83.4	0.7658
57	H	25	68	550	8.09	914.5	0.0	0
58	H	46	79.5	100	1.26	0.0	0.0	0
59	H	38	89.8	400	4.45	987.2	265.0	0.2685
60	H	44	64	200	3.13	180.7	0.0	0
61	H	25	80	350	4.38	312.9	604.1	1.9310
62	M	31	67	100	1.49	102.8	100.4	0.9766
63	M	26	75.3	400	5.31	1007.7	475.2	0.4716
64	H	30	98	200	2.04	180.0	191.7	1.0655
65	M	44	75.9	100	1.32	31.9	0.0	0
66	H	25	87	150	1.72	312.9	604.1	1.9310
Promedio		36.33	78.45	261.55	3.41	402.7	177.51	0.50
D. E.		9.55	14.66	162.23	2.21	335.0	202.7	0.62

En la tabla No. 24 se presentan los valores obtenidos de los niveles de clozapina y N-desmetil clozapina en estado estacionario; así como los datos individuales de los 66 pacientes que participaron en el estudio. Se puede observar que el valor de la concentración de N-desmetil clozapina en promedio fue menor a la concentración de clozapina encontrada.

Al realizar un análisis de correlación con la prueba de Spearman se encontró correlación significativa entre la concentración plasmática de clozapina y la concentración de N-desmetil clozapina ( $p=0.01$ ), figura No. 19.

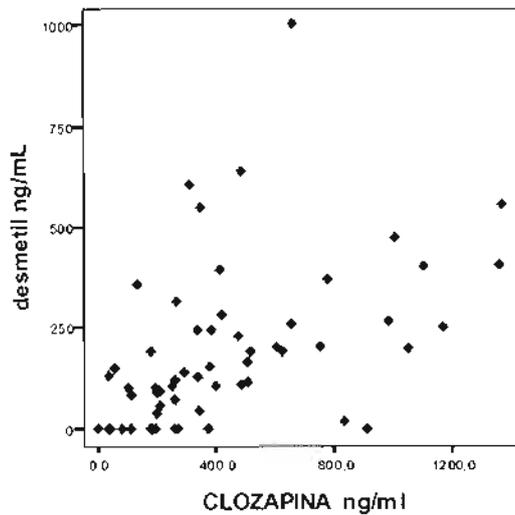


Figura No. 19 Relación entre la concentración plasmática de clozapina y la concentración de N-desmetil clozapina. (Spearman  $r=0.60$ )

De la misma manera, al analizar los datos de la relación clozapina/N-desmetil y los datos de la relación dosis/peso se encontró una correlación significativa ( $p=0.05$ ) con la prueba de Spearman, figura No. 20.

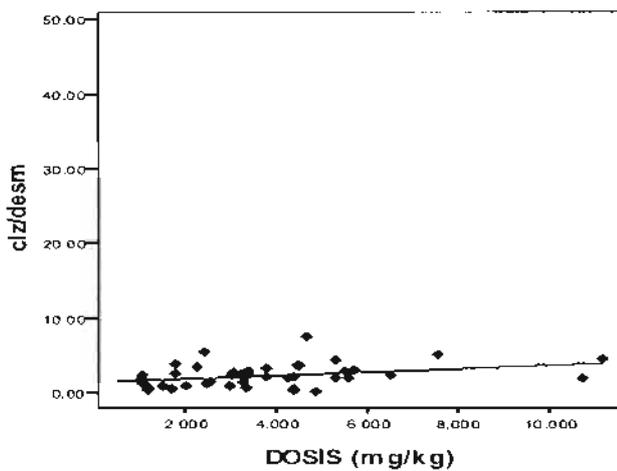


Figura No. 20 Relación entre la relación dosis/peso de los pacientes y la relación clozapin/N-desmetil clozapina. ( $r=0.37$ )

La figura No. 21 muestra la amplia variabilidad en concentración plasmática de clozapina; con un promedio de 402.7 ng/mL (D. E. = 335.0 ng/mL); la variabilidad

interindividual que se observó en el estudio es similar a lo reportado en otros estudios (Guitton y cols. 1998; Paz y cols. 2007; Fabrazzo y cols. 2002; Khan y Preskorn. 2005).

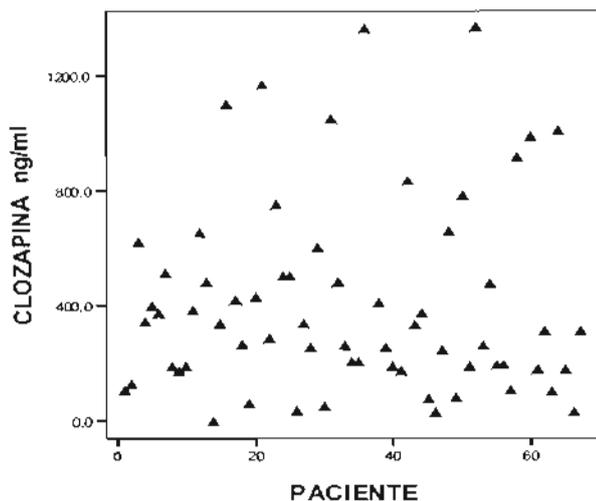


Figura No. 21 Variabilidad interindividual en la concentración plasmática de CLZ en pacientes con diagnóstico de esquizofrenia.

En la figura No. 22 se presenta la variabilidad en la concentración plasmática de N-desmetil clozapina en pacientes. (n=66).

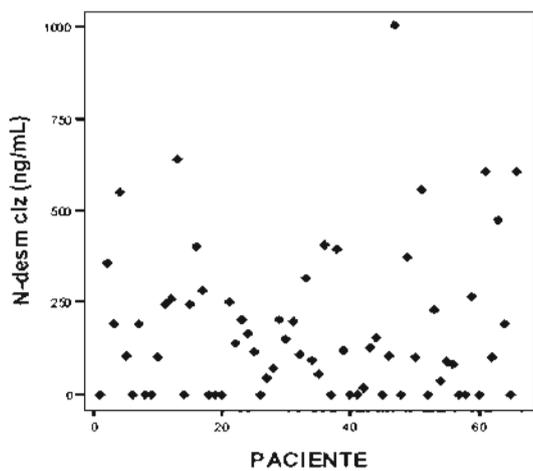


Figura No. 22 Variabilidad en la concentración de N-desmetil clozapina en plasma.

Con los datos obtenidos se analizó la posible influencia de diferentes factores como edad, dosis, peso, género y fármacos concomitantes sobre los niveles plasmáticos de clozapina y su metabolito N-desmetil clozapina.

### Relación entre la edad y los niveles de clozapina en plasma

En algunos estudios se han reportado diferencias en los niveles de CLZ relacionadas con la edad, principalmente en pacientes adultos mayores, con quienes se asocian mayores concentraciones plasmáticas (Schulte, 2003; Tang y cols. 2007). La figura No. 23 muestra la relación encontrada entre la concentración de clozapina y la edad de los pacientes, observándose, a diferencia de lo reportado, ligera disminución de los niveles respecto al aumento de la edad, sin embargo la relación no fue significativa ( $p > 0.3$ ) utilizando la prueba de Spearman.

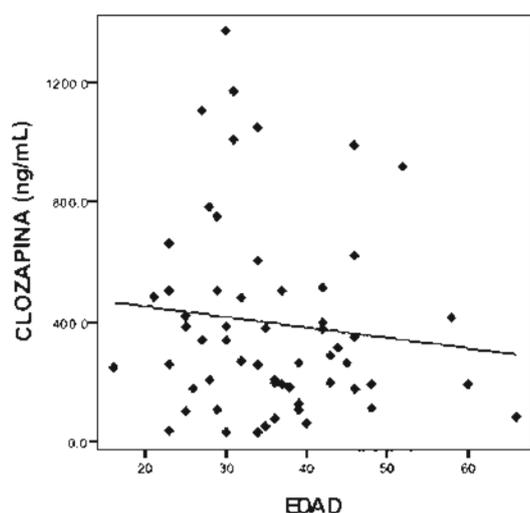


Figura No. 23 Relación entre la edad de los pacientes y la concentración de clozapina en plasma. ( $r = -0.1$ )

### **Relación entre la dosis y los niveles de clozapina en plasma**

Los estudios realizados en diferentes poblaciones muestran que las mujeres presentan mejor respuesta a dosis menores en comparación con los hombres.

La dosis promedio de clozapina utilizada por los pacientes de este estudio fue de 261.55 mg/día (D.E.= 162.23) y es semejante a la dosis del medicamento utilizada en Europa en pacientes con esquizofrenia resistente (Bondolfi y cols. 1998), así como semejante a la publicada en un estudio en pacientes chinos la cual fue de 250 mg/día (Tang y cols. 2007) pero menor a la utilizada en poblaciones de Estados Unidos la cual se encuentra en un rango de 300 – 600 mg/día (Simpson y cols. 1999; Spina y cols. 2000), y se encuentra establecida y recomendada en las guías terapéuticas.

El rango de dosis administrada en los pacientes incluidos en este estudio fue muy variable, entre 37.5 y 900 mg/día (promedio =  $261 \pm 161$  mg/día), con una ligera tendencia a prescribir dosis de 100 y 200 mg/día (18 y 21 % respectivamente).

En la figura No. 24 se muestran los niveles plasmáticos de clozapina de todos los pacientes en relación a la dosis administrada ajustada por peso. Se puede observar la gran variabilidad interindividual de los niveles plasmáticos que oscilan entre 37.14 y 1371.14 ng/mL. Existe una correlación significativa entre la relación dosis/peso (mg/kg) y la concentración plasmática de clozapina ( $p=0.01$ ) realizando la prueba de Spearman.

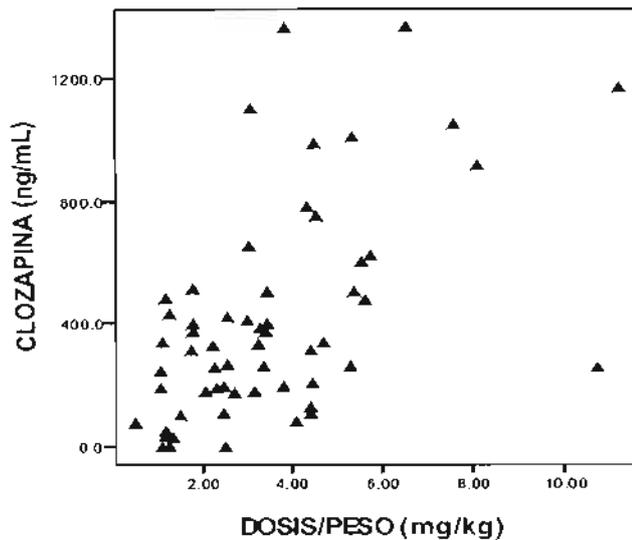


Figura No. 24 Relación entre la dosis diaria (mg/kg de peso) de clozapina y la concentración plasmática en estado estacionario, en los pacientes incluidos en el estudio. ( $r=0.5$  Spearman)

### Relación entre los niveles de clozapina en plasma y el género

Existen estudios que soportan que existe incremento en la actividad de CYP 3 A4 y disminución en la actividad en CYP 1 A2 en mujeres lo cual conduce a que se observen mayores concentraciones de clozapina en las mujeres (Aichhorn y cols. 2006; Buur-Rasmussen y Brøsen, 1999). También se ha observado que una concentración plasmática de clozapina entre 240 y 500 ng/mL es asociada con una buena respuesta clínica, el riesgo de intoxicación se incrementa cuando los niveles plasmáticos de clozapina son mayores a 750 ng/mL (Paz y cols., 2008; Tang y cols. 2007; Spina y cols. 2000); Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los niveles de clozapina son mayores en mujeres que en hombres; la figura No. 25 muestra las concentraciones plasmáticas de clozapina en hombres y mujeres, al comparar mediante la prueba de t student no se encuentra diferencia significativa entre las concentraciones plasmáticas analizadas por género ( $p=0.2$ ). En hombres la concentración media de clozapina fue de 391.694 ng/mL (D.E.=304.7ng/mL) con una relación dosis/peso de 2.9 mg/kg (D.E.= 2.1 ng/mL) mientras que el valor medio de concentración de clozapina observado en mujeres fue de 437.8 ng/mL (D.E.=400.9 ng/mL) con una relación dosis/peso de 3.8 mg/kg (D.E.= 2.2).

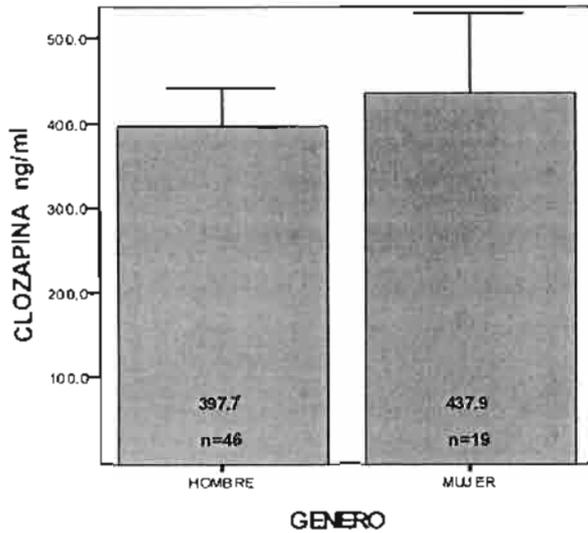


Figura No. 25 Concentración plasmática de clozapina de acuerdo al género (p =0.2).

**Relación entre niveles plasmáticos de clozapina y tiempo de tratamiento.**

Con la finalidad de analizar los datos de concentración de clozapina en relación al tiempo bajo tratamiento en que se encontraban los pacientes, se realizó un análisis estadístico con la prueba de "t student". Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones entre las fases analizadas (p>0.06). Cabe aclarar que las fases comprenden diferentes tiempos de tratamiento: Fase I comprende de 4 semanas hasta 6 meses bajo tratamiento con clozapina y la Fase II es un periodo bajo tratamiento mayor a 6 meses. En la fase I se obtuvo un valor medio de 384.8 ng/mL (D.E.=256.4 ng/mL) y en la Fase II la concentración plasmática de clozapina fue de 418.2 ng/mL (D.E.=358.5 ng/mL), figura No. 26.

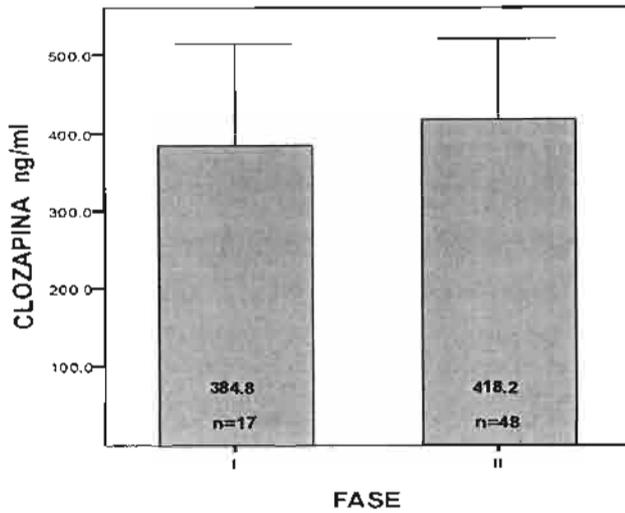


Figura No. 26 Concentración plasmática de clozapina en relación a la fase de tratamiento con clozapina. ( $p > 0.06$ )

En la figura No. 27 se puede observar que conforme aumenta el tiempo de tratamiento con clozapina la concentración plasmática del fármaco disminuye; obteniendo una correlación significativa entre estas variables ( $p = 0.03$ ) realizando la prueba de Spearman.

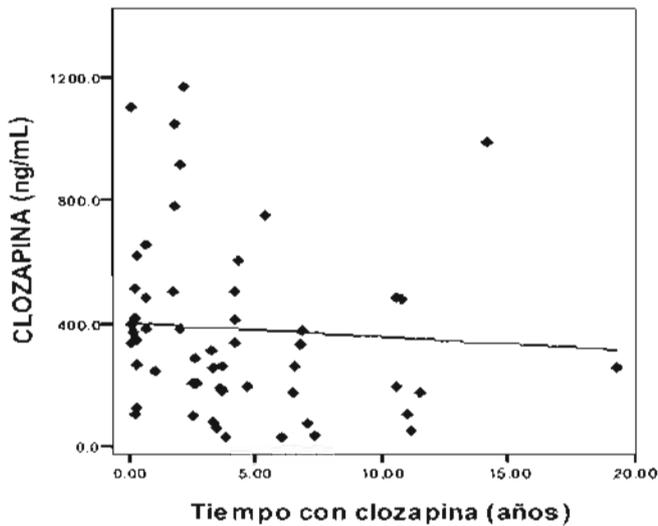


Figura No. 27 Relación del tiempo que tiene el paciente bajo tratamiento con clozapina y la concentración en plasma de clozapina. ( $r = -0.32$ )

## Relación entre los niveles plasmáticos de clozapina y el número de neutrófilos absolutos.

En 1974 la clozapina fue retirada del mercado internacional, debido al desarrollo de agranulocitosis en algunos pacientes; efecto secundario que se presenta en el 1 % de la población. Después de diversos estudios y bajo un monitoreo estricto, la CLZ se introdujo nuevamente en 1990 en los Estados Unidos de Norteamérica (Alvir y cols. 1993; Iqbal y cols. 2003). Los pacientes que participaron en el presente estudio no presentaron agranulocitosis ni neutropenia; se ha observado que el riesgo mayor ocurre en las primeras 12 semanas de iniciado el tratamiento y es reversible sin secuelas hematológicas persistentes (Alvir y cols. 1993; Guest y cols. 1998). En el presente estudio, 26.2 % de los pacientes que participaron se encontraban en fase I y el 73.8 % se encontraban en fase II. No se observaron alteraciones hematológicas probablemente por el tamaño de muestra, considerando que la agranulocitosis se presenta en el 1% de los pacientes.

En la tabla No. 25 se puede observar que el valor promedio del número de neutrófilos absolutos en hombres y mujeres es mayor a  $1.5 \times 10^9/L$ , valor mínimo permitido, dentro de la guía terapéutica de clozapina, para que los pacientes continúen bajo tratamiento sin riesgo de leucopenia. Al comparar los valores de neutrófilos absolutos entre hombres y mujeres no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.1$ ) con la prueba de "t student".

**Tabla No. 25 Concentraciones plasmáticas de clozapina y N-desmetil clozapina, número de neutrófilos y relación N-desmetil-clz/clozapina.**

	TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
	PROMEDIO	D.E.	PROMEDIO	D.E.	PROMEDIO	D.E.
DOSIS (mg/día)	261.55	±162.23	261.6	± 174.4	247.5	± 127.1
Clozapina (ng/mL)	402.7	± 335.0	397.7	± 305.22	437.8	± 400.9
N-desmetil clozapina (ng/mL)	177.51	± 202.7	193.3	± 217.6	185.9	± 169.1
N-desmetil clz/clozapina	0.50	± 0.62	0.60	± 0.8	0.43	± 0.31
Neutrófilos abs. $\times 10^9/L$	4.246	± 1.4267	4.8	± 1.5	3.75	± 1.0
DOSIS/peso (mg/kg)	3.41	± 2.21	3.2	± 2.2	3.8	± 2.1

Al analizar los valores de concentración plasmática de clozapina (ng/ml) y la cantidad de neutrófilos absolutos se encontró una correlación significativa entre ambas variables ( $p=0.01$ ) con la prueba de Spearman. La gráfica No 28 permite observar que el incremento en la concentración de clozapina en plasma produce un incremento de neutrófilos absolutos.

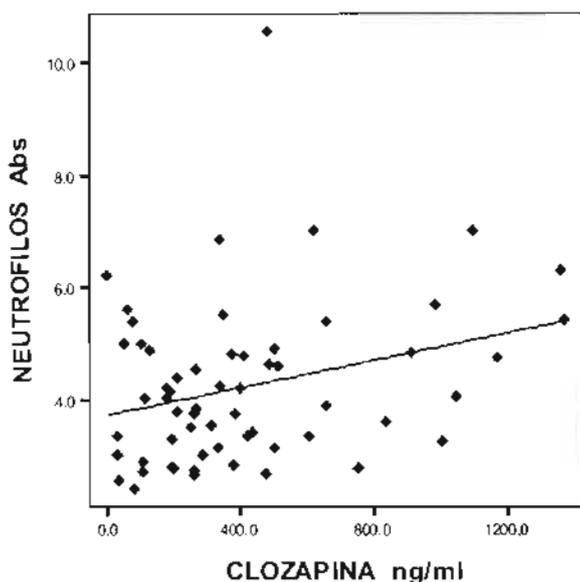


Figura No. 28 Relación entre la concentración plasmática de clozapina y la cuenta de neutrófilos absolutos. ( $r=0.36$  Spearman)

Por otro lado al analizar los datos de cuenta de neutrófilos con respecto al tiempo bajo tratamiento con CLZ, se observa una ligera disminución de los neutrófilos absolutos sin embargo al realizar la prueba de Spearman se observa que no es significativa ( $p=0.06$ ), figura No. 29.

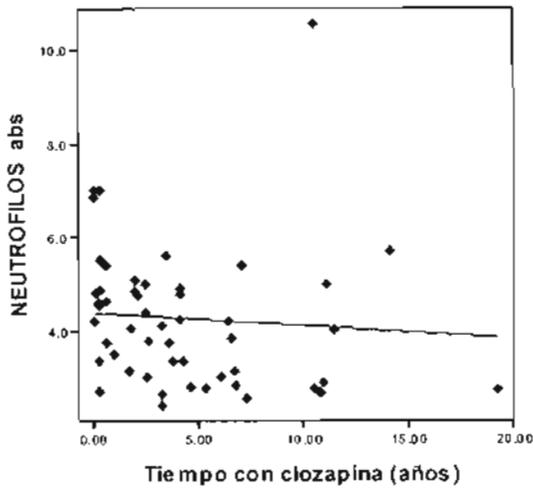


Figura No. 29. Relación entre el tiempo bajo tratamiento con CLZ y la cuenta de neutrófilos absolutos. ( $r = -0.26$ ).

En la figura No. 30 se muestra que al analizar la cuenta de neutrófilos absolutos de acuerdo al género, el valor es menor en mujeres que en hombres, sin embargo la diferencia no es significativa ( $p=0.04$ ) al realizar la prueba de "t student". Estos resultados no son consistentes con reportes previos en pacientes norteamericanos que asocian al sexo femenino con un riesgo mayor de neutropenia y agranulocitosis inducidas por clozapina. (Alvir y cols. 1993)

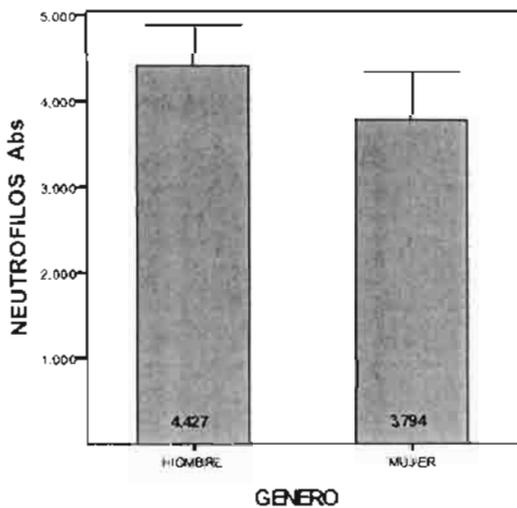


Figura No. 30. Valores medios de la cuenta de neutrófilos absolutos presentes en los pacientes ( $n=45$ ) divididos por género.

### **Relación entre los niveles de N-desmetil clozapina en plasma.**

La N-desmetil clozapina es el metabolito principal de la clozapina, que se forma en mayor proporción en el organismo humano; es un potente agonista del receptor muscarínico M1; este receptor muscarínico es el más abundante en la corteza y el hipocampo, regiones del cerebro cruciales para la función cognitiva normal. (Li y cols. 2005)

Existen algunos estudios en los cuales se ha observado que al incrementarse la concentración plasmática de N-desmetil clozapina los pacientes requieren mayor dosis de clozapina para obtener una mejoría clínica (Fabrazzo y cols. 2002; (Mauri y cols. 2007).

Los niveles plasmáticos de N-desmetil clozapina obtenidos fueron menores que los niveles de clozapina en los mismos pacientes. El valor promedio de la relación N-desmetil/clozapina fue de 0.55 (D.E. = 0.76), lo cual es considerado como un índice del metabolismo de clozapina que nos indica que los pacientes son respondedores a al tratamiento con clozapina. Cuando este índice es mayor a uno indica que se metaboliza el fármaco formando el metabolito N-desmetil clozapina y que el paciente responderá parcialmente al tratamiento con dosis dentro del rango terapéutico (Mauri y cols. 2007). La determinación de este índice podría relacionarse con la gran variabilidad interindividual de niveles plasmáticos observada en los pacientes.

No existe evidencia que soporte que la concentración plasmática de N-desmetil clozapina tenga relación con la incidencia de agranulocitosis como efecto secundario. Aunado a esto se ha reportado que el metabolito N-óxido clozapina puede convertirse nuevamente en clozapina (Khan y cols. 2005).

En el presente estudio se observó que la concentración en plasma de N-desmetil clozapina es mayor en hombres, 234.9 ng/mL (DE=203.7 ng/mL) que en mujeres, 109.5 ng/mL (DE= 140.2 ng/mL); al realizar la comparación de niveles por género, se encontró que la diferencia es significativa ( $p=0.01$  prueba de t student). La gráfica se muestra en la figura No. 31.

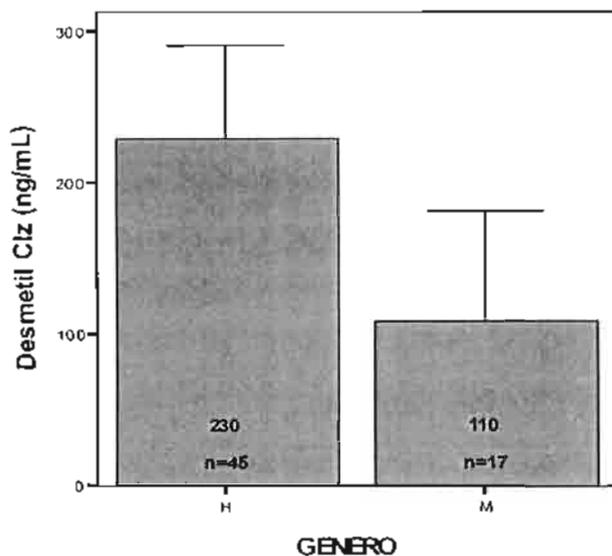


Figura No. 31 Valores medios de la concentración plasmática de N – desmetil clozapina en los pacientes de acuerdo al género (n= 62).

En la figura No. 32 se observa la gráfica que relaciona la concentración de N-desmetil clozapina y el número de neutrófilos absolutos encontrando una correlación significativa ( $p=0.01$ ) al realizar la prueba de Spearman.

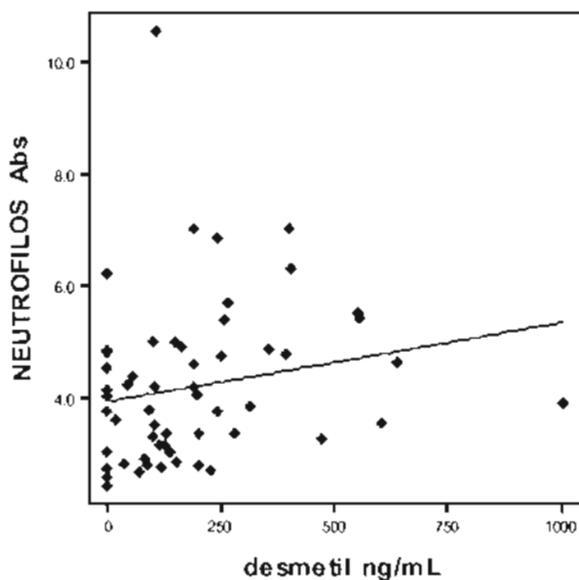


Figura No. 32 Concentración plasmática de N- desmetil clozapina en relación al número de neutrófilos presentes ( $r = 0.46$ )

La figura No. 33 muestra el aumento observado de la concentración de N-desmetil clozapina en pacientes que se encontraban en la primera fase del tratamiento, al realizar la comparación estadísticas con la prueba de "t student" no se encontró diferencia significativa entre fases ( $p=0.08$ ). En la Fase I se obtuvo un valor medio para N-desmetil clozapina de 210 ng/mL (D.S.=195.8) y para los pacientes que se encontraban en la Fase II, La concentración media de N-desmetil clozapina fue de 184 ng/mL (D.S.=206.8).

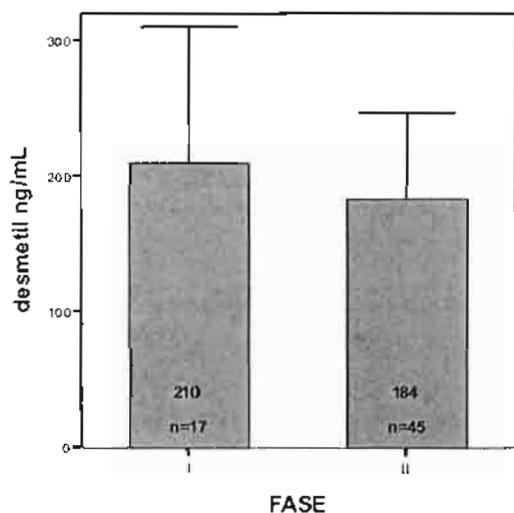


Figura No. 33 Concentración plasmática de N-desmetil clozapina de acuerdo a la fase de tratamiento con clozapina en que se encontraban los pacientes (n=62).

La figura 34 muestra la gráfica de la concentración plasmática de clozapina y la relación N-desmetil clozapina/clozapina, al realizar la prueba de Pearson no se encontró correlación significativa ( $p=0.1$ ).

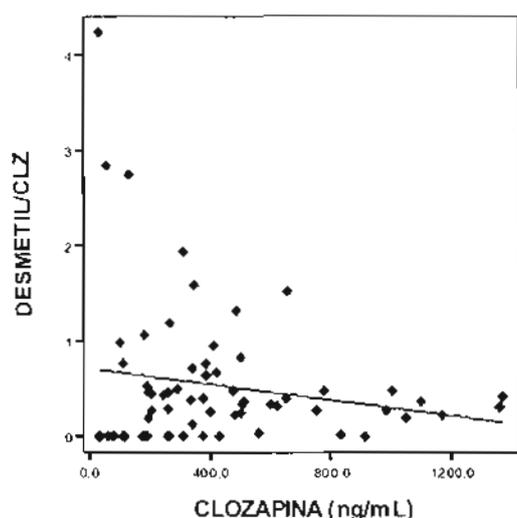


Figura No. 34 Concentración de clozapina en plasma respecto a la relación de N-desmetil clozapina/clozapina ( $r=0.08$ )

La gran variabilidad en las concentraciones plasmáticas de los pacientes observada en los diferentes estudios (Besag y Berry, 2006; Guillon y cols. 1998; Paz y cols. 2007; Fabrazzo y cols. 2002; Khan y Preskorn, 2005) se relaciona probablemente a diferencias metabólicas generadas por influencia genética (respondedores y no respondedores), por el género de los pacientes, administración de medicamentos concomitantes así como el hábito de consumo de tabaco. Es muy importante tener en cuenta los factores mencionados ya que el tratamiento con clozapina tiene un alto riesgo de toxicidad si estos no son considerados.

Es importante mencionar que el 98.5% de los pacientes incluidos en el estudio son fumadores de tabaco por lo que no fue posible realizar una comparación con los no fumadores. Algunos estudios han reportado que las concentraciones plasmáticas de Clozapina y N-desmetil clozapina se encuentran disminuidas en los fumadores; (Buur-Rasmussen y Brøsen, 1999; Tang Y. y col 2007; Schulte P. 2003; Perry P. y col. 1998) lo cual se debe a que el tabaco es una sustancia inductora de las enzimas de los citocromos CYP1A2, el cual participa en el metabolismo de la clozapina, disminuyendo su concentración plasmática en un 20%; (Khan A. y Preskorn S. 2005; Besag F. y Berry D. 2006) como consecuencia se alteran no sólo los niveles de clozapina en plasma sino

también el efecto terapéutico. Este es uno de los factores que influyen en la gran variabilidad interindividual. (Tang y cols. 2007)

### **Relación entre los niveles de clozapina y terapia concomitante.**

En las tablas No. 26 y 27 se presentan los datos de los pacientes que estuvieron bajo terapia concomitante y los pacientes que recibieron solamente clozapina durante el estudio. De los 66 pacientes que participaron en el estudio 35 se encontraban bajo politerapia, lo que corresponde al 53.8%.

**Tabla No. 26 Pacientes bajo monoterapia con clozapina y pacientes bajo terapia concomitante.**

	Hombres	Mujeres	Total
MONOTERAPIA	23 (34.3%)	8 (11.9%)	31 (46.2%)
POLITERAPIA	24 (37.3%)	11 (16.5%)	35 (53.8%)
TOTAL DE PACIENTES	47 (71.6% )	19 (28.4% )	66 (100%)

**Tabla No. 27 Concentración de clozapina en plasma en pacientes bajo monoterapia y pacientes bajo terapia concomitante.**

	Hombres Clozapina ng/mL	Mujeres Clozapina ng/mL	Total Clozapina ng/mL
MONOTERAPIA	399.4 (DE=340.4)	460.62 (DE=460.4)	415.2 (DE= 367.7)
POLITERAPIA	380.8 (DE= 277.3)	418.4 (DE=378.0)	392.6 (DE= 307.1)

Al realizar la comparación por género en los pacientes que estuvieron bajo monoterapia se observaron concentraciones plasmáticas de clozapina más altas en las mujeres, con un valor promedio de 460.62 ng/mL (D.E. = 460.4 ng/mL); la figura No. 35 muestra las concentraciones plasmáticas de clozapina en pacientes bajo monoterapia; estadísticamente no existe diferencia significativa entre géneros, realizando la prueba la prueba de "t student" ( $p=0.6$ ).

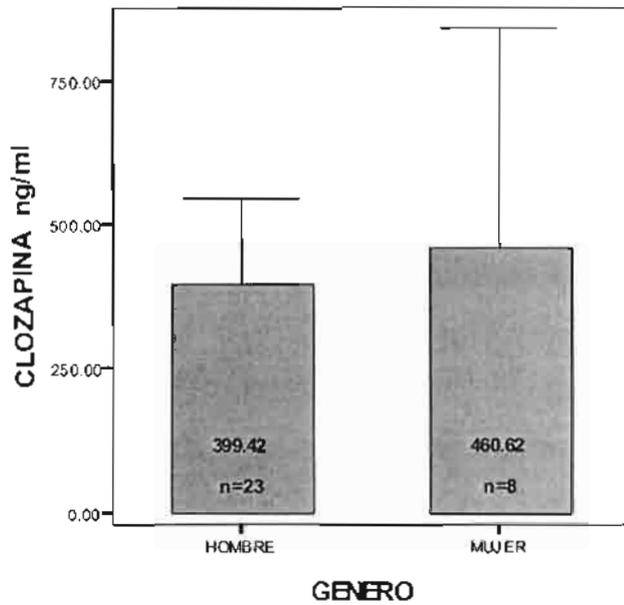


Figura No. 35. Concentración de clozapina en plasma en pacientes bajo monoterapia en relación al género. (n=31)

En los pacientes que participaron en el estudio había 35 que estaban bajo politerapia además de clozapina; en la figura No. 36 se muestra la concentración plasmática de clozapina en mujeres con un valor promedio de 418.44 ng/mL (DE = 378.0 ng/mL) y de 381.0 ng/mL (DE=277.3 ng/mL) en los hombres; no encontrando diferencia significativa al hacer la comparación por género con la prueba de "t student" ( $p=0.7$ ).

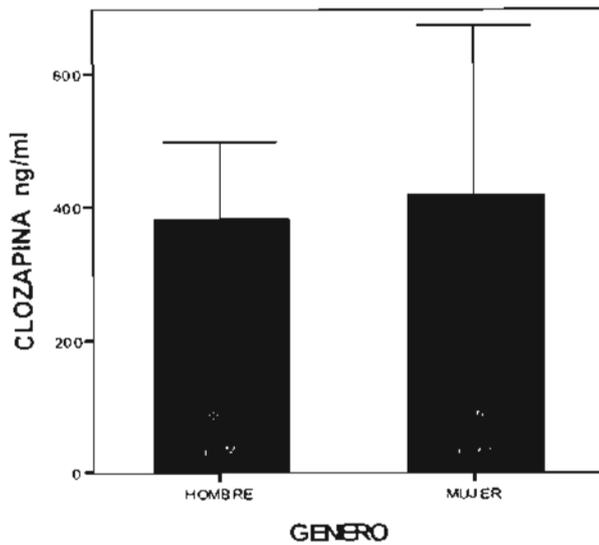


Figura No. 36. Concentración de clozapina en plasma en pacientes bajo politerapia haciendo la comparación por género. (n = 35)

La concentración plasmática de clozapina en pacientes bajo monoterapia es mayor que en los pacientes bajo politerapia, al realizar la prueba de "t student" no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos ( $p = 0.7$ ), figura No. 37.

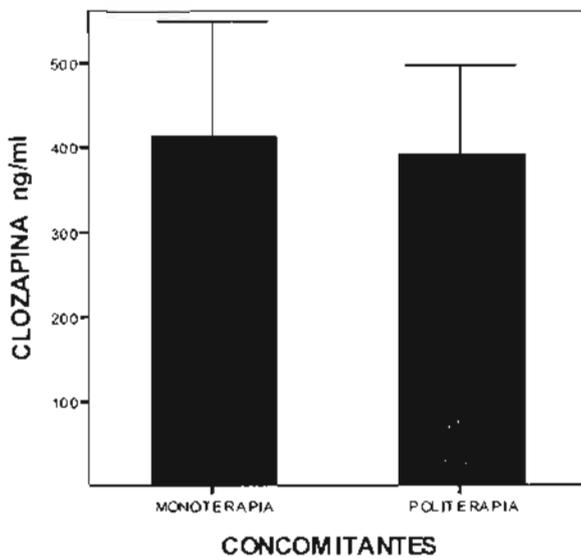


Figura No. 37. Concentración plasmática de clozapina en pacientes bajo monoterapia y politerapia. (n=66)

## Relación entre los niveles de N-desmetil clozapina y terapia concomitante.

Al analizar los datos de la concentración de N-desmetil clozapina por género en pacientes bajo politerapia, estadísticamente no hay una diferencia significativa entre los dos grupos haciendo la comparación con la prueba de "t student" ( $p=0.4$ ). En la figura No. 38 se muestra que la concentración promedio de N-desmetil clozapina en hombres es de 240.8 ng/mL (DE= 264.2 ng/mL) y en mujeres de 170.9 ng/mL (DE= 174.9 ng/mL),

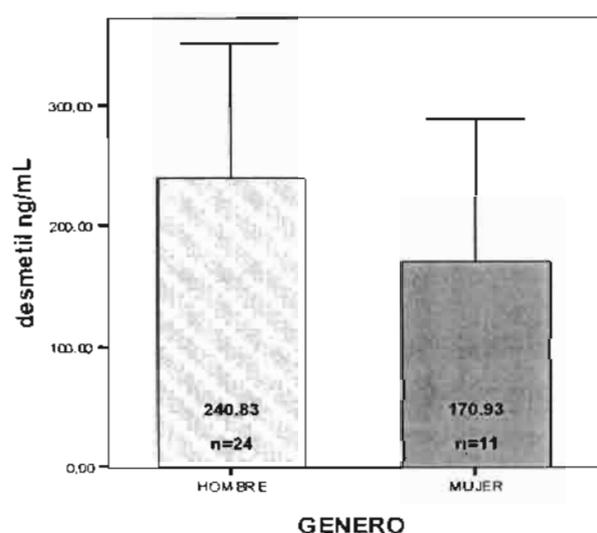


Figura No. 38. Concentración de N-desmetil clozapina en plasma metabolito principal de clozapina, en pacientes bajo terapia con clozapina y otros fármacos concomitantes de acuerdo al género. (n=35)

Al realizar una comparación por género de la concentración del metabolito principal de clozapina en pacientes bajo monoterapia se obtuvieron concentraciones mayores en mujeres. La figura No. 39 muestra la gráfica de la concentración de N-desmetil clozapina por género en pacientes bajo monoterapia, la concentración promedio del metabolito en plasma en hombres fue de 110.2 ng/mL (DS= 120.5 ng/mL) y en mujeres de 206.4 ng/mL (DS= 170.3 ng/mL), no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos ( $p=0.9$ ) realizando la comparación con la prueba de "t student".

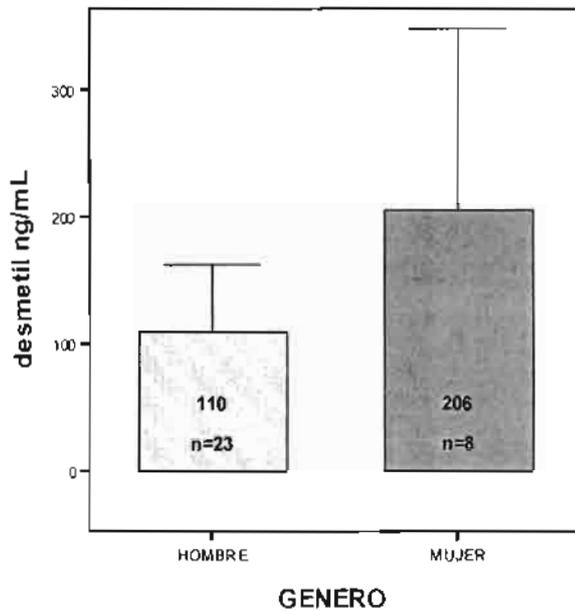


Figura No. 39. Concentración plasmática de N-desmetil clozapina en pacientes bajo monoterapia con clozapina de acuerdo al género. (n=31)

La concentración promedio de N-desmetil clozapina de los pacientes que estuvieron bajo monoterapia fue de 135.0 ng/mL (DS= 138.7 ng/mL), la concentración plasmática promedio del metabolito en los pacientes que estuvieron bajo terapia concomitante fue de 218.8 ng/mL (DS= 239.4 ng/mL), al realizar la prueba de "t student" no se encontró diferencia significativa entre las dos formas de terapia (p=0.09).

Los pacientes a quienes se les administró clozapina en conjunto a otro antipsicótico atípico como Olanzapina, Ziprazidona, Amisulpirida; Risperidona o Quetapina mostraron concentraciones plasmáticas de clozapina mayores a las observadas en pacientes bajo monoterapia, 742.5 ng/mL en promedio, lo cual se muestra en la figura No. 40. Esta combinación de antipsicóticos generalmente se realiza cuando no se observa mejoría en el paciente, la combinación de antipsicóticos permite que se disminuya la dosis de clozapina administrada a los pacientes y se aumentan los niveles plasmáticos de clozapina, de esta forma se obtiene el efecto terapéutico deseado sin presencia de efectos secundarios. Estos resultados son similares a los encontrados por Henderson 1996, McCarthy 1995 y Tyson 1995 en estudios

realizados con pacientes bajo administración conjunta de clozapina y risperidona. (Chong y Remington, 2000)

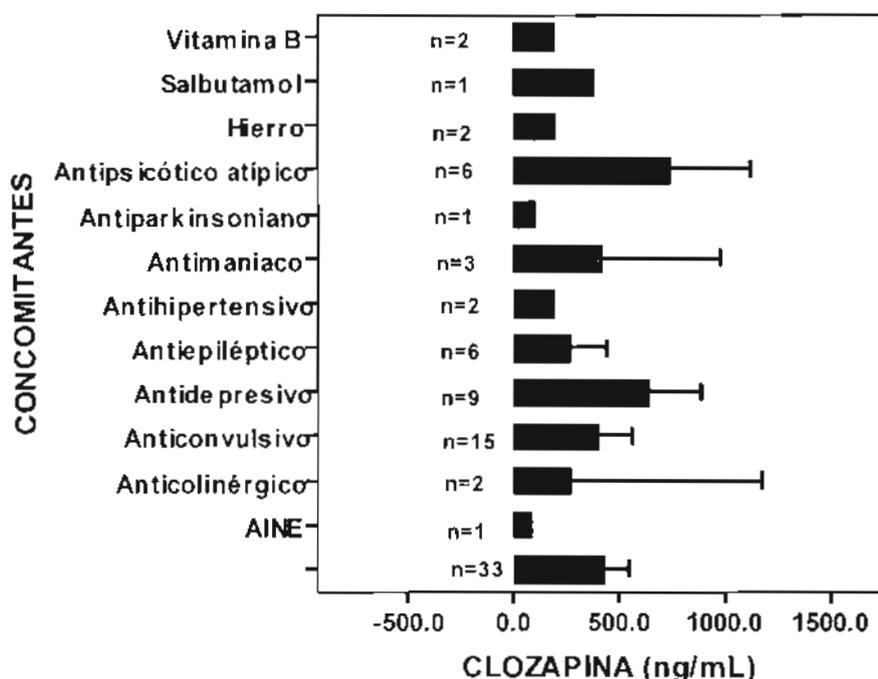


Figura No. 40. Concentración plasmática de clozapina en pacientes bajo terapia concomitante.

Las enzimas más importantes en el metabolismo hepático de los antipsicóticos atípicos son CYP 1 A2, CYP 3 A4 y CYP 2 D6, Risperidona es metabolizada en mayor proporción por CYP 2 D6 y en menor proporción por CYP 3 A4; Olanzapina se oxida por CYP 1 A2, Quetiapina es metabolizada por CYP 3 A4, (McEvoy y cols. 2006) Ziprazidona es metabolizada por CYP 3 A4 mediante oxidación y Amisulprida se excreta, principalmente en orina, casi sin metabolizar (Spina y De León, 2007). Estos mismos CYPs participan en el metabolismo de la clozapina lo cual posibilita las interacciones afectando los niveles plasmáticos de CLZ.

Resultados similares se obtuvieron en los pacientes que se encontraban bajo tratamiento con antidepresivos como Amitriptilina, Clomipramina y Fluoxetina cuyo valor promedio de niveles de clozapina fue de 639.1ng/mL

La fluoxetina es un inhibidor de CYP 3A4 por lo que al interaccionar con CLZ causa un aumento en su concentración plasmática (Aichhorn y cols. 2006).

En los pacientes que participaron en el presente estudio no hubo desarrollo de neutropenia ni de agranulocitosis, pero es importante resaltar que el monitoreo clínico en pacientes bajo tratamiento con clozapina es necesario para obtener la respuesta clínica esperada con la dosis que requiere cada uno y así evitar la aparición de efectos secundarios por altas concentraciones plasmáticas del fármaco. Considerando los factores de metabolismo característicos en cada uno de ellos, muchos pacientes se encuentran bajo politerapia y aunado a esto, la mayoría tiene el hábito del consumo de tabaco; se altera el metabolismo de la clozapina provocando efectos indeseados así como niveles subterapéuticos que finalmente influyen en el efecto y la respuesta terapéutica

## CONCLUSIONES

- El método analítico para cuantificar clozapina y N-desmetil clozapina en plasma es confiable, rápido, sencillo y de menor costo al compararlo con otros métodos reportados, ya que el tipo de extracción que se realiza es líquido-líquido y el tiempo de corrida es menor a los 20 minutos, por lo cual se utiliza menor cantidad de fase móvil en comparación con otros métodos lo cual permite utilizar el método de forma cotidiana disminuyendo costos.
- Existe gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos de clozapina en estado estacionario, los cuales no se ven influenciados por el peso ni la edad.
- Se observó una disminución de la concentración de clozapina en plasma en relación al tiempo que tiene el paciente bajo tratamiento con este fármaco.
- Se observó mayor concentración de N-desmetil clozapina en hombres que en mujeres, lo cual podría permitir que este grupo de pacientes mejore su déficit cognitivo más rápidamente que las mujeres.
- El promedio de dosis utilizada en este grupo de pacientes bajo estudio es similar a los valores obtenidos con otras poblaciones: pacientes europeos y pacientes chinos, pero menor a las dosis utilizadas en poblaciones de Estados Unidos de Norteamérica.
- No se encontró influencia de otros medicamentos sobre la concentración de clozapina.
- El monitoreo de clozapina en pacientes con esquizofrenia refractaria se justifica cuando:
  - A dosis terapéuticas se presenta una baja respuesta clínica.
  - Se presentan señales de toxicidad y efectos adversos.
  - El uso de fármacos concomitantes que sean inhibidores de los CYP 1 A2 y CYP 3 A 4 ya que esto producirá un incremento en los niveles plasmáticos de clozapina; así como con fármacos inductores de estos sistemas enzimáticos ya que producirán una disminución de la concentración plasmática de clozapina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aichhorn W., Whitworth a., Weiss E. Marksteiner J.** Second generation antipsychotics. Is there evidence for sex differences in pharmacokinetic and adverse effect profiles? *Drug safety*. 2006; 29 : 587-598.
- Alphs L., Anand R.** Clozapine: The commitment to patient safety. *Journal of Clinical Psychiatry*. 1999; 12:39–42.
- Alvir J., Lieberman J., Safferman A., Schwimmer J.** Agranulocitosis inducida por Clozapina. Incidencia y factores de riesgo en los Estados Unidos. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 329:162 –167.
- Alvir J., Lieberman J., Safferman A.** Do white-cell count spikes predict agranulocytosis in clozapine recipients? *Psychopharmacology Bulletin*. 1995; 31:311-314.
- Andreasen N., Olsen S.** Negative vs positive schizophrenia: Definition and validation. *Archives of General Psychiatry*. 1982; 39:789-794.
- Arredondo A., Ramos R., Zúñiga A.** Evaluación económica de la demanda de atención médica para salud mental en México: esquizofrenia y depresión. 1996-2000 *Revista de Investigación Clínica*. 2003; 55:43 – 50.
- Aravagiri M., Marder S.** Simultaneous determination of clozapine and its N-desmethyl and N-oxide metabolites in plasma by liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry and its application to plasma level monitoring in schizophrenic patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001; 26: 301-311.
- Baldessarini R., Tarazi F.** Fármacos y tratamiento de los trastornos psiquiátricos. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Goodman y Gilman. (Hardman J. G., Limbird LE., ed.) 10ª ed. Vol. 1, Mc Graw - Hill Interamericana; México, 2001; pp. 493 – 522.
- Baldessarini R., Frankenburg F.** Clozapine a novel antipsychotic agent.. *The New England Journal of Medicine*. 1991; 324:746 – 754.

- Baldessarini R., Cohen B., Teicher M.** Significance of neuroleptic dose and plasma level in the pharmacological treatment of psychosis. *Archives of General Psychiatry*. 1988; 45:79 – 91.
- Besag F., Berry D.** Interactions between antiepileptic and antipsychotic drugs. *Drug Safety*. 2006; 29 :95-118.
- Blin O.** A comparative review of antipsychotics. *Canadian Journal of Psychiatry*. 1999; 44:235– 244.
- Bondolfi G., Dufor H., Patris M., May J., Billeter U., Eap C. y Baumann P.** Risperidone versus clozapine in treatment-resistant chronic schizophrenia: A randomized double-blind study. *The American Journal of Psychiatry*. 1998; 155:499-504.
- Budavari S.** (ed.). The Merck Index – Enciclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Rahway, New Jersey; Merck and Co., Inc., 1989; pag. 344.
- Buur-Rasmussen B., Brøsen K.** Cytochrome P450 and therapeutic drug monitoring with respect to clozapine. *European Neuropsychopharmacology*. 1999; 9:453-459.
- Caldwell C., Gottesman I.** Schizophrenics kill themselves too: A review of risk factors for suicide. *Schizophrenia Bulletin*. 1990; 16:571-589.
- Casey D.** Extrapyramidal syndromes: Epidemiology, pathophysiology and the diagnostic dilemma. *CNS Drugs*. 1996; 5:1-12.
- Chong S., Tan Ch., Khoo Y., Lee H., Wong K., Ngui F., Winslow M.** Clinical evaluation and plasma clozapine concentrations in Chinese patients with schizophrenia. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1997; 19:219 -223.
- Chong S., Remington G.** Clozapine augmentation: Safety and efficacy. *Schizophrenia Bulletin*. 2000; 26:421 -440.
- Conley R. Kelly D.** Drug- Drug interactions associated with second generation antipsychotics: considerations for clinicians and patients. *Psychopharmacology Bulletin*. 2007; 40:77-79.

- Cooper B.** Epidemiology, in *Schizophrenia: Towards a new synthesis*, Wing J.K. (Ed.). New York, 1978; Grune and Stratton
- Crow T.** Molecular pathology of schizophrenia. More than one disease process? *British Medical Journal*. 1980; 280:66-68.
- Cuffel B., Shumway M., Chouljian T., Macdonald T.** A longitudinal study of substance use and community violence in schizophrenia. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1994; 182:704-708.
- Declaration of Helsinki.** 2004. [http://www.wma.net/e/policy/17-c\\_e.html](http://www.wma.net/e/policy/17-c_e.html).
- Davis J., Matalon L., Watanabe M.** Depot antipsychotic drugs. *Place in therapy Drugs*. 1994; 47:741-773.
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV.** American Psychiatric Association de Washington. Washington 1994.
- Eaton W., Badawi M., Melton B.** Prodromes and precursors: Epidemiological data for primary prevention of disorders with slow onset. *American Journal of Psychiatry*. 1995; 152:967-972.
- Fabrazzo M., La Pia S., Monteleone P., Esposito G., Pinto A., De Simone L., Bencivenga R., Maj M.** 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*. 2002; 27: 1050-1055.
- Frahner C., Rao M., Grasmader K.** Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *Journal of Chromatography. B*. 2003; 794:35-47
- Freedman R., Adler L., Bickford P.** Schizophrenia and nicotine receptors. *Harvard Review of Psychiatry*. 1994; 2:179-192.
- Gaceta Parlamentaria No. 16.** Propuesta con punto de acuerdo para exhortar a la Secretaría de Salud que contemple en los recursos asignados para el ejercicio fiscal

2006, por lo menos el 2.5% del presupuesto global asignado al sector salud para la atención de enfermedades mentales. 17 de agosto, 2005.

**Garay L., Forfar I., Pehourcq F., Jarry C.** Simultaneous determination of four antipsychotic drugs in plasma by high-performance liquid chromatography. Application to management of acute intoxications. *Journal of Chromatography B*. 2003; 795: 257-264.

**Gaudoneix M., Beauverie P., Poisson N.** Tabaco y medicamentos ¿amistades peligrosas? *Adicciones*. 2001; 13:229-234.

**Guest I., Sokoluk B., MacCrimmon J., Uetrech J.** Examination of possible toxic and immune mechanisms of clozapine induced agranulocytosis. *Toxicology*. 1998; 131:53 – 65.

**Guitton C., Kinowsk J., Gomeni R., Bressolle F.** A kinetic model for simultaneous fit of Clozapine and Norclozapine concentrations in chronic schizophrenic patients during long-term treatment. *Clinical Drug Investigation*. 1998; 16 : 35-43.

**Guitton C., Kinowsk J., Chabrand P., Bressolle F.** Multiple –dose pharmacokinetics of clozapine in patients with chronic schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1998; 18: 470-476.

**International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects.** Geneva, Switzerland. [www.fhi.org/training/fr/retc/pdf files/cioms.pdf](http://www.fhi.org/training/fr/retc/pdf_files/cioms.pdf). Agosto, 2009.

**Iqbal M., Rahman A., Husain Z., Mahmud S, Ryan W., Feldman J.** CLOZAPINE: a clinical review of adverse effects and management. *Annals of Clinical Psychiatry*. 2003; 15:33-48.

**Jablensky A, Sartorius N, Ernberg G.** Schizophrenia: Manifestations, incidence and course in different cultures: A World Health Organization ten-country study. *Psychological Medicine*. 1992; 22:1-97.

**Josiassen R., Joseph A., Stokes S., Shaughnessy R.** Clozapine augmented with Risperidone in the Treatment of Schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *American Journal Psychiatry*. 2005; 162:130136.

- Kane J., Honigfeld G., Singer J., Meltzer H.** Clozapine for the treatment – resistant schizophrenic. *Archives of General Psychiatry*. 1988; 45:789 – 796.
- Kane J., Woerner M., Lieberman J.** Tardive dyskinesia: Prevalence, incidence and risk factors. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1988 b; 8:52-56.
- Karagianis J., Phillips L., Hogan K., LeDrew K.** Clozapine associated neuroleptic malignant syndrome : two new cases and a review of the literature. *The Annals of Pharmacotherapy*. 1999; 33:623-630.
- Kasai K., Iwanami A., Yamasue H., Kuroki N., Nakagome K., Fukuda M.** Neuroanatomy and neurophysiology in schizophrenia. *Neuroscience Research*. 2002; 43:93-110
- Kendler K., Diehl S.** The genetics of schizophrenia: a current genetic-epidemiologic perspective. *Schizophrenia Bulletin*. 1993; 19:261-185.
- Kendler K., Karkowski-Shuman L., Walsh D.** Age at onset in schizophrenia and risk of illness in relatives. Results from the Roscommon family study. *The British Journal of Psychiatry*. 1996; 169:213-218.
- Kerwin R.** When should Clozapina be initiated in schizophrenia? Some arguments for and against earlier use of Clozapina. *CNS Drugs*. 2007; 21:267-278.
- Khan A. y Preskorn S.** Examining concentration-dependent toxicity of Clozapine: Role of therapeutic drug monitoring. *Journal of Psychiatric Practice*. 2005; 11:289-301.
- Lazcano E., Salazar E., Gutiérrez P., Angeles A., Hernández A., Viramontes J.** Ensayos clínicos aleatorizados: variantes, métodos de aleatorización, análisis, consideraciones éticas y regulación. *Salud pública de México*. 2004; 46:559-584.
- Ley General de salud.** <http://www.cddhcu.qob.mx/LeyesBiblio/pdf/142.pdf>. Agosto, 2009
- Li Z., Huang M., Ichikawa J., Dai J., Meltzer H.** N-desmethylozapine, a major metabolite of clozapine, increases cortical acetylcholine and dopamine release in vivo via stimulation M<sub>1</sub> of muscarinic receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30:1986-1995.

- Llerena A., Berecz R., Norberto M., De la Rubia A.** Determination of clozapine and its *N*-desmethyl metabolite by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*. 2001; 755:349-354.
- Llorca P., Lancon C., Disdier B., Farisse J., Sapin C.** Effectiveness of clozapine in neuroleptic – resistant schizophrenia : clinical response and plasma concentrations. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2002; 27:30 – 37
- Lohr J., Flynn K.** Smoking and schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 1992; 8:93-102.
- Mauri M.** Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics. *Clinical Pharmacokinetics*. 2007; 46:361-368.
- Mauri M., Volonteri L., Colasanti A., Fiorentini A.** A critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clinical Pharmacokinetics* . 2007; 46:359-388.
- Mauri M., Volonteri L., Colasanti A., Fiorentini A.** Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2007; 33:1158–1166.
- McEvoy J., Lieberman J., Sctt T., Davis S., Rosenheck R., Swartz M., Meltzer H., Perkins D., Keefe R., Hsiao J.** Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine y risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment. *The American Journal of Psychiatry*. 2006; 163: 600-610.
- McNeil T.** Perinatal risk factors and schizophrenia: selective review and methodological concerns. *Epidemiologic Reviews*. 1995; 17:107-112.
- Meltzer H.** Duration of a clozapine trial in neuroleptic-resistant schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 1989; 46:672.
- Miklowitz D.** Family risk indicators in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 1994; 20:137- 149.
- Mosier E., Song J., McKay G., Hubbard J., Fang J.** Determination of clozapine and its metabolites, *N* – desmethylclozapine and clozapine *N* – oxide in dog plasma using

high – performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2003; 783:377 – 382

**NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.** Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.

**Organización Mundial de la Salud:** Informe sobre la salud mental en el mundo. OMS, Ginebra, 2001.

**Oyewumi L., Cernovsky Z., Freeman D.** Autonomic signs and dosing during the initial stages of clozapine therapy. *Medical Science Monitor*. 2004; 10:19-23

**Palego L., Dell'Osso L., Marazziti D., Biondi L., Sarno N., Ciapparelli A., Giromella A., Giannaccini G., Lucacchini A., Cassano G.** Simultaneous analysis of Clozapine, Clomipramine and their metabolites by reversed – phase liquid chromatography. *Progress in. Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2001; 25:519-533.

**Paz E., Bouzas L., Hermida J., Brenlla J., Tutor C.** Evaluation of three dosing models for the prediction of steady-state trough clozapine concentrations. *Clinical Biochemistry*. 2008; 41:603-606.

**Perry P., Bever K., Arndt S., Combs M.** Relationship between patient variables and plasma clozapine concentrations: A doping Nomogram. *Biological Psychiatry*. 1998; 44:733-738.

**Primera Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica, (ENEP, UNAM).** México, 2003.

**Redding S., Minnema A., Tandon R.** Neuroleptic malignant syndrome and clozapine. *Annals of Clinical Psychiatry*. 1993; 5: 25-27.

**Regier D., Farmer M., Rae D., Locke B., Keith S., Judd L., Goodwin K.** Comorbidity of mental disorders with alcohol and other substance abuse: Results of the Epidemiologic Catchment Area (ECA) survey. *Journal of the American Medical Association*. 1990; 246:2511-2518

**Remington G.** Understanding antipsychotic atypicality: a clinical and pharmacological moving target. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2003; 28:275-284.

- Sabri O., Erkwoh R., Schreckenberger M.** Regional cerebral blood flow and negative/positive symptoms in drug-naive schizophrenics. *Journal of Nuclear Medicine*. 1997; 38:181-188
- Schulte P.** What is an adequate trial with Clozapine? Therapeutic drug monitoring and time to response in treatment-refractory schizophrenia. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003; 42 :607-618.
- Sewell D.** Schizophrenia and HIV. *Schizophrenia Bulletin*. 1996; 22:465-473.
- Simpson G., Josiassen R., Stanilla J., De León J., Nair Ch. Abraham G., Odom-White A., Turner R.** Double – Blind study of clozapine dose response in chronic schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*. 1999; 156: 1744-1750.
- Sistema Nacional de Salud.** Boletín de Información Estadística. 2003; 21:39 – 43.
- Spina E., Avenoso A., Facciosa M., Ancione M., Madia A., Ventimiglia A., Perucca.** Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology*. 2000; 148: 83-89.
- Spina E., Avenoso A., Facciola G., Scordo M., Ancione M., Madia A., Ventimiglia A., Perucca E.** Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics. *Psychopharmacology*. 2000; 148:83-89.
- Spina E., De León J.** Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2007; 100 : 4-22.
- Stanniland C., Taylor D.** Tolerability of atypical antipsychotics. *Drug Safety*. 2000; 22:195-213.
- Steinberg J., Devous M., Paulman R.** Regional cerebral blood flow in first break and chronic schizophrenic patients and normal controls. *Schizophrenia Research*. 1995; 17:229-240.

- Tang Y., Mao P., Li F., Li W., Chen Q., Jiang F., Cai Z., Mitchell P.** Gender, age, smoking haviour and plasma clozapine concentrations in 193 chinese inpatients with schizophrenia. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2007; 64: 49-56.
- Titier K., Bouchet S., Péhourcq F., Moore N., Molimard M.** High-performance liquid chromatographic method with diode array detection to identify and quantify atypical antipsychotics and haloperidol in plasma after overdose. *Journal of chromatography*. 2003; 788:179 – 185.
- Torrey E., Rawlings R., Waldman I.** Schizophrenic births and viral disease in two States. *Schizophrenia research*. 1988; 1:73-77.
- Turetsky B., Cowell P., Gur R.** Frontal and temporal lobe brain volumes in schizophrenia: Relationship to symptoms and clinical subtype. *Archives of general psychiatry*. 1995; 52:1061-1070.
- Vita A., Dieci M., Giobbio G.** Time course of cerebral ventricular enlargement in schizophrenia supports the hypothesis of its neurodevelopmental nature. *Schizophrenia research*. 1997; 23:25-30.
- WHO.** The International Pilot Study of Schizophrenia. Geneva, World Health Organization, 1973.
- WHO.** The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. Clinical description and diagnostic guidelines. Geneva, World Health Organization, 1992.
- WHO.** Schizophrenia and public health. Geneva. World Health Organization, 1996.
- Wong A., Van Tol H.** The dopamine D4 receptors and mechanisms of antipsychotic atypicality. *Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2003; 27: 1091-1099
- Worrell J., Marken P., Beckman E., Ruehter V.** The atypical antipsychotic agents. *American journal of health-system pharmacy*. 2000; 57:238 – 255.

## ANEXO I

### FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: "ESTUDIO PILOTO DE MONITOREO DE CLOZAPINA EN PLASMA DE PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA".

#### INTRODUCCIÓN

Se le pide que participe en un estudio de investigación clínica financiado por los laboratorios Psicofarma S. A. de C. V., quien es el patrocinador.

Antes de que tome una decisión, es importante que entienda el motivo por el cual se va a realizar el estudio y lo que implica. Esta hoja de información tiene como fin proporcionarle la información esencial sobre este estudio y sus derechos como paciente en la investigación clínica para que pueda tomar una decisión informada sobre su participación.

Su decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria. Si usted acepta participar, durante el tiempo que dure el estudio, será evaluado por un psiquiatra del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" y el medicamento clozapina le será entregado sin costo alguno en la dosis que lo requiera. Usted puede retirarse del estudio en el momento que usted decida o bien si a juicio del médico fuera necesario. En todo caso, usted no perderá el derecho a recibir atención y tratamiento médico.

La clozapina es un medicamento muy efectivo ya que no genera efectos sobre alteraciones del movimiento como los otros medicamentos, de modo que el paciente puede vivir con su familia y puede realizar sus actividades cotidianas. Como todo medicamento la clozapina tiene efectos secundarios, los más frecuentes son: somnolencia, aumento de peso, cefalea (dolor de cabeza), insomnio, náusea, vómito, fiebre, hipotensión (presión baja), taquicardia, resequedad de boca y en ocasiones al incrementar la dosis pueden presentar convulsiones; éstos síntomas generalmente no llegan a ser severos y algunos desaparecen al poco tiempo de haber iniciado el tratamiento.

Un efecto secundario serio, que algunos pacientes pueden presentar, es la disminución en la cuenta de glóbulos blancos (agranulocitosis), evento que debe ser monitoreado; en caso de presentarse podría ser causa de que el paciente adquiera infecciones fácilmente por lo cual se deberá disminuir la dosis y/o retirar el medicamento.

Además del tratamiento con medicamentos, las personas con esquizofrenia, deben ser evaluadas periódicamente para que puedan continuar con sus actividades. Los familiares de los pacientes deben de ayudar a que el paciente siga las indicaciones del médico para que el tratamiento sea exitoso.

## 1. PROPÓSITO

El propósito de este estudio es, relacionar las concentraciones en sangre de clozapina con la disminución de glóbulos blancos como efecto secundario.

Se le está pidiendo que participe en este estudio de investigación clínica porque ha sido diagnosticado con esquizofrenia y ya se le está tratando con clozapina.

Este estudio involucra a un total de 50 pacientes y será realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Cada paciente participará en el estudio durante 3 meses.

Para ser incluido en el estudio existen ciertos criterios que el médico especialista revisará por medio de un examen médico y algunas pruebas de laboratorio. Antes de cualquier procedimiento del estudio, necesitará dar su consentimiento por escrito para su participación.

## 2. PROCEDIMIENTO

A continuación se indican los criterios bajo los cuales se seleccionarán los pacientes:

- a) Criterios de inclusión
  - Pacientes adultos entre 18 y 60 años, sin distinción de género.
  - Pacientes con diagnóstico de esquizofrenia que hayan estado bajo tratamiento con antipsicóticos clásicos como: haloperidol, flufenacina o

clorpromacina entre otros, con los cuales no se haya observado mejoría o que se haya observado intolerancia.

- Pacientes que actualmente se encuentren bajo tratamiento con Clozapina al menos 4 semanas previas a su inclusión al estudio.

#### b) Criterios de exclusión

- Mujeres embarazadas o que están lactando.
- Mujeres que planean embarazarse.
- Pacientes menores de 18 años o mayores de 60.
- Pacientes con alteraciones en el hígado.
- Pacientes con alteraciones en los riñones.
- Pacientes con alteraciones en sangre.
- Pacientes con adicciones (excepto los fumadores).
- Pacientes que estén bajo tratamiento con los siguientes medicamentos:  
Eritromicina o Rifampicina
- Paciente cuya cuenta de glóbulos blancos esté fuera del rango normal.

En este estudio usted será evaluado por un psiquiatra quien le indicará la dosis de clozapina y el horario en el cual debe tomarla. También le explicará los beneficios del tratamiento y los efectos secundarios que podría presentar.

Su médico del estudio le suministrará mensualmente el medicamento clozapina en forma de tabletas durante un período de 4 meses.

Durante las primeras 8 semanas (dos meses) el paciente asistirá al lugar que su médico le indique para que le tome una muestra de sangre de 5 ml; este procedimiento puede producir un poco de dolor, puede ponerse morada la zona en la cual se efectúe la punción, sangrado, mareo, desmayo y rara vez infección en el sitio o bien puede no ocurrir ninguno de estos eventos; después de este tiempo la toma de muestra sanguínea será mensual.

En cada una de sus visitas mensuales además de la toma de muestra de sangre, se medirá la presión arterial y el peso; se realizará la evaluación psiquiátrica por el médico del estudio, se asegurará de que cumple con la administración de su

medicamento y se le aplicará un cuestionario el cual contestará en un tiempo aproximado de 30 minutos.

### 3. RECOMENDACIONES

Para que los resultados de este estudio sean de calidad y proporcionen beneficios en su tratamiento es importante que usted:

- . Asista con puntualidad a sus citas
- . Tome el medicamento según las indicaciones de su médico del estudio.
- . Notifique al médico antes de tomar cualquier medicamento nuevo
- . Regresar el empaque del medicamento utilizado en cada visita mensual.
- . Asista en ayunas para la toma de muestra sanguínea y sin tomar la dosis del medicamento en estudio.

Por favor no suspenda el medicamento sin ponerse en contacto con el médico; él le explicará la forma correcta en la cual usted puede suspender el medicamento sin alteraciones a su organismo.

### 4. CONTACTOS

En caso de cualquier emergencia médica, o si tiene cualquier pregunta urgente al respecto de su participación durante el estudio, por favor póngase en contacto con el médico del estudio o con el personal del estudio.

Dr. Jesús Ramírez Bermúdez

Neuropsiquiatría

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Tel. 56 06 38 22 ext. 1034

Usted paciente, familiar o representante legal, estará permanentemente informado. La información sobre su paciente se registrará en un archivo clínico que será manejado con la debida confidencialidad. Se requiere que usted firme el presente consentimiento informado.

Nombre del paciente:

\_\_\_\_\_

Edad del paciente: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Hace cuanto tiempo se le diagnosticó con esquizofrenia:

\_\_\_\_\_

Cuántas veces ha sido hospitalizado:

\_\_\_\_\_

Nombre del familiar o representante legal:

\_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Datos a ser llenados por el paciente o bien por el representante legal:

Nombre:

\_\_\_\_\_ Parentesco \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Teléfono del paciente: \_\_\_\_\_

Teléfono del Responsable legal: \_\_\_\_\_

Persona que obtiene el consentimiento:

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

## TESTIGOS

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

**W15 PLASMA LEVEL MONITORING OF CLOZAPINE IN SCHIZOPHRENIA PATIENTS**

Alanís-Medina, L.<sup>1</sup>, González-Esquivel, D.F.<sup>2</sup>, and \*Ríos-Castañeda, C.<sup>2</sup> <sup>1</sup>UAM-Xochimilco, <sup>2</sup>Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, México DF, México. ([crios@correo.xoc.uam.mx](mailto:crios@correo.xoc.uam.mx))

**Introduction.** Clozapine (CLZ) is an atypical antipsychotic drug used successfully in refractory schizophrenia; has been considered that plasma levels of CLZ can be predictor of treatment and side effects but also several factors as sex, dose, smoking, can influence plasma levels and clinical response. **Purpose.** The aim of this study was monitoring plasma steady-state levels of CLZ in patients with schizophrenia and evaluates its relationship with toxicity and clinical effect as well as to determine the influence of some factors on plasma levels. **Methods.** The study included 87 ambulatory patients, 64 males and 23 females, who met the DSM-IV for schizophrenia. Mean age was 36.73 ((8.80) years and mean weight was 77.16 ((16.02) Kg. 40 patients were under polytherapy with other drugs. Blood samples were collected at steady-state, immediately before the first morning daily dose. Plasma levels of CLZ and its active metabolite, Desmetilclozapine, were determined by HPLC. Factors screened for influence on plasma levels were body weight (WT), age, gender, CLZ dose, leukocytes, and polytherapy. All patients were smoking.

**Results.** Plasma CLZ concentrations demonstrated large interindividual variability; mean levels of CLZ were 427.77 ng/ml (( 351.05) and for DesmetilCLZ were 171.36 ng/ml (( 195.02). 30 patients were in therapeutic range; 35 were in subtherapeutic levels, and 22 patients were above therapeutic range. The CLZ/Desmetil mean ratio (MR) was 13.33 ((63.57). It was found a good correlation between observed and predicted concentration of CLZ and also between dose/weight versus CLZ concentration. (0.40). There were not significant differences in plasma concentrations between female and male patients ( $p < 0.257$ ), however female were higher 565.98 vs. 264.94 ng/ml.



---

List of abstracts : 1 - 1 / 1

---

Monday 05/07/2010

1. 05/07 079.1 Poster board C122 - Mon 05/07/2010, 11:15 - Hall 1  
11:15 **Alcaraz-Zubeldia M., Alanis-Medina L., Gonzalez-Esquivel D. & Rios C.**  
Natl. Inst. Neurol. Neurosurg., Mexico City, Mexico  
- Role of reduced glutathione in the efficacy and safety of clozapine treatment in patients with schizophrenia  
Recently, depletion of monomeric glutathione (GSH; 52% within the medial prefrontal cortex by Magnetic Resonance Imaging) was reported for drug-free schizophrenic patients. Moreover, several polymorphisms of glutamate cysteine ligase (GSH rate-limiting enzyme) are considered as risk factors for schizophrenia. Clozapine (CLZ) is considered highly effective in the treatment of schizophrenia, being not only capable of controlling the negative and positive symptoms of schizophrenia but also controlling cognitive impairment. Its main metabolite is the desmethyl-clozapine (DM-CLZ). At therapeutic doses, another CLZ metabolite, nitronium ion forms adducts with GSH. Administration of a precursor of GSH synthesis diminishes symptom severity and controls the reduction of the mismatch negativity of schizophrenic patients. These results suggest that GSH content could be an adequate indicator of schizophrenia. In the present study, we analyzed the plasma GSH content of 67 patients with schizophrenia diagnosis under CLZ treatment. Levels of plasma CLZ and DM-CLZ were also determined. Patients were grouped into 3 different groups depending of the time of CLZ exposition: I) less of 3 months of CLZ administration, II) among 3 months and 1 year of use and III) more than one year of use. Through one analysis of linear multiple regression, we found a negative correlation ( $R=0.422$ ,  $p=0.001$ ) between GSH and CLZ content in plasma. Along with these results, we also found an increment in GSH content directly related to the phase of treatment. CLZ metabolite DM-CLZ, was found inversely related with the content of GSH ( $R=-0.352$ ,  $p=0.006$ ). In the other hand, the number of neutrophils (neutropenia is an adverse effect of CLZ treatment) also was showed a negative relationship with GSH content. Since GSH content is directly related to the CLZ content, our results suggest not only that CLZ could induce GSH synthesis, but also that adverse effects of CLZ could depend on GSH plasma content. Supported by CONACYT Project No. 118158.