



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD DURANGO**

**“INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL CYP2D6 SOBRE LA
CRONOFARMACOCINÉTICA DEL METROPROLOL EN INDIVIDUOS BAJO
TRATAMIENTO”**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA**

**PRESENTA
SAÚL FLORES UNZUETA**

**DIRECTOR DE TESIS
Dra. en C. MARTHA SOSA MACÍAS
CODIRECTOR DE TESIS
DR. en C. ISMAEL A. LARES ASEF**

**ASESORES EXTERNOS
DR. en C. FRANCISCO FLORES MURRIETA
DRA. en C. MIRIAM CARRASCO**

**UNIDAD DE FARMACOLOGÍA CLÍNICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

Victoria de Durango, Dgo., México Mayo 2010



SIP-13

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 19 de Junio del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 12 del mes de mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

FLORES
Apellido paterno

UNZUETA
Apellido materno

SAÚL
Nombre (s)

Con registro: A 0 8 0 0 2 8

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Biomedicina

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Influencia del Polimorfismo Genético del CYP2D6 sobre la Crono-Farmacocinética del Metoprolol en Individuos Bajo Tratamiento"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías, Dr. Ismael Antonio Lares Asef

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

Dr. Ismael Lares Asef

El Aspirante

Flores Unzueta Saúl

El Presidente del Colegio

Dr. José B. Pineda Nolasco
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:00 horas del día 11 del mes de Junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:
"Influencia del polimorfismo genético del CYP2D6 sobre la crono-farmacocinética del metoprolol en Individuos bajo tratamiento."

Presentada por el alumno:

FLORES

Apellido paterno

UNZUETA

Apellido materno

SAÚL

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	2	8
---	---	---	---	---	---	---

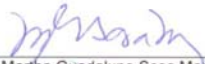
aspirante de:

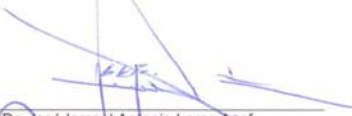
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

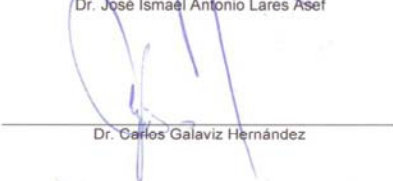
LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

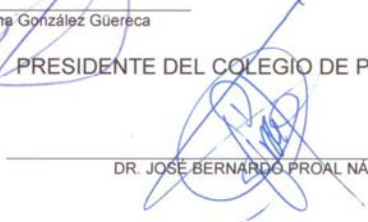

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef


Dr. Ignacio Villanueva Fierro


Dr. Carlos Galaviz Hernández


M. en C. Martha Celina González Güereca

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JOSÉ BERNARDO PROAL NÁJERA


CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **10** del mes **JUNIO** del año **2010**, el (la) que suscribe **SAÚL FLORES UNZUETA** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA** con número de registro **A080028**, adscrito a **CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS** y del **DR. JOSÉ ISMAEL ANTONIO LARES ASEF** y cede los derechos del trabajo intitulado **INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL CYP2D6 SOBRE LA CRONO-FARMACOCINÉTICA DEL METOPROLOL EN INDIVIDUOS BAJO TRATAMIENTO**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **drsaulflores@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

SAÚL FLORES UNZUETA

Nombre y firma

TABLA DE CONTENIDOS

GLOSARIO.....	I
Lista de Figuras.....	V
Lista de Abreviaturas.....	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo General	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1. Población de estudio.....	17
6.2. Criterios de inclusión:.....	17
6.3. Criterios de exclusión.....	18
6.4. Criterio de eliminación.....	18
6.5. Variables	18
6.6. Procedimiento	19
6.7. Reporte de eventos adversos	19
7. ANÁLISIS	20
7.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de metoprolol.	20
7.2. Validación del método analítico.....	20
7.3. Análisis de genotipificación	21
7.4. Análisis farmacocinético.....	24
7.5. Análisis estadístico.....	24
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	25
9. RESULTADOS	25

10. DISCUSIÓN	67
11. CONCLUSIONES.....	70
12. RECOMENDACIONES	71
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
14. ANEXOS	82

GLOSARIO

ADN. Ácido nucleico que contiene la información genética usada en el desarrollo y funcionamiento de los organismo vivos.

Adn genómico. ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de las células o tejidos.

Alelo. Es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Amplificación. Aumento del número de copias de un gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Antihipertensivo. Que reduce la presión arterial alta.

Bradicardia. Disminución de la frecuencia cardiaca por debajo de 60 latidos por minuto.

Betabloqueadores. Son medicamentos que actúan como antagonistas de receptores beta-adrenérgicos con uso clínico en pacientes con presión elevada.

Calcioantagonistas. Son medicamentos que actúan impidiendo la entrada de calcio en las células.

Cronofarmacocinética. Estudia los cambios biológicos dependientes del tiempo en la farmacocinética de un agente.

Cronofarmacología. Estudia las variaciones rítmicas de los efectos de un fármaco (ya sean terapéuticos o adversos) sobre el organismo. Es el resultado de los procesos cronobiológicos de farmacocinética (cronocinética) y farmacodinamia (cronestesia) del medicamento

Cronostesia. Diferencias rítmicas en la susceptibilidad de los blancos biológicos.

Dosis. La cantidad de una sustancia a la que se expone una persona durante un período de tiempo.

Dosis matutina. Dosis administrada en el turno matutino.

Dosis vespertina. Dosis administrada en el turno vespertino.

Farmacocinética. La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo.

Farmacodinamia. Es el estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre un organismo.

Frecuencia Cardíaca (FC). Funciones relacionadas con el número de veces que el corazón se contrae por minuto.

Gen. Secuencia lineal organizada de nucleótidos en la molécula de ADN, que contiene información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica.

Hipertensión arterial sistémica (HAS). Definida como la elevación crónica de la presión arterial sistólica y/o diastólica.

Intervalo terapéutico. Es un concepto empleado en farmacología que incluye las dosis comprendidas entre el nivel mínimo eficaz y el nivel máximo admisible.

Isoenzima. Enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción química.

Medicamento concomitante Tratamiento con dos o más medicamentos.

Metoprolol. Fármaco que antagoniza receptores β -adrenérgicos.

Miocardio. Es el tejido muscular del corazón encargado de bombear la sangre por el sistema circulatorio mediante contracción.

Núcleo supraquiasmático. Es un centro primario de regulación de los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica para amplificar un segmento específico de ADN usando una ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos y oligonucleótidos (“primers”) complementarios a secuencias que flanquean al segmento de ADN que se desea amplificar.

PCR anidada. Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

Presión de Pulso (PP). Diferencia entre TAS y TAD, expresada en mmHg.

Polimorfismo genético. Variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

Primer. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'-hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde

P450. Es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias, arqueobacterias y eucariotas.

Ritmo circadiano. Ritmo biológico de aproximadamente 24 horas necesario en la mayoría de las funciones de los sistemas vivos.

Sincronizador. Señales externas del medio ambiente, capaces de poner en hora los ritmos biológicos del organismo.

Tensión arterial diastólica (TAD). Presión en las arterias cuando el corazón se encuentra en reposo.

Taquicardia. Frecuencia del ritmo de las concentraciones cardíacas superior a 100 latidos por minuto.

Tensión arterial sistólica (TAS). Presión máxima ejercida cuando el corazón se contrae.

Lista de Figuras

- Figura 1** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 1, dosis matutina.
- Figura 2** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 1, Dosis Vespertina.
- Figura 3** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 2, dosis matutina.
- Figura 4** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 2, dosis vespertina.
- Figura 5** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 3, dosis vespertina.
- Figura 6** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 4, dosis matutina.
- Figura 7** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 5, dosis matutina.
- Figura 8** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 5, dosis vespertina.
- Figura 9** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 6, dosis matutina.
- Figura 10** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 6, dosis vespertina.
- Figura 11** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 7, dosis matutina.
- Figura 12** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 7, dosis vespertina.
- Figura 13** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 8, dosis matutina.

- Figura 14** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 8, dosis vespertina.
- Figura 15** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 9, dosis matutina.
- Figura 16** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 9, dosis vespertina.
- Figura 17** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 10, dosis matutina.
- Figura 18** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 10, dosis vespertina.
- Figura 19** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 11, dosis matutina.
- Figura 20** Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 11, dosis vespertina.
- Figura 21** Comparación de la Concentración Plasmática de los Pacientes con Medicamento Concomitante Antihipertensivo con los Pacientes sin Medicamento Concomitante (Dosis Matutina).
- Figura 22** Comparación de la Concentración Plasmática de los Pacientes con Medicamento Concomitante Antihipertensivo con los Pacientes sin Medicamento Concomitante (Dosis Vespertina).
- Figura 23** Comparación de TAS de los Pacientes con Medicamento Concomitante Antihipertensivo con los Pacientes sin Medicamento Concomitante (Dosis Matutina).
- Figura 24** Comparación de TAS de los Pacientes con Medicamento Concomitante Antihipertensivo con los Pacientes sin Medicamento Concomitante (Dosis Vespertina).

Lista de Tablas

Tabla 1	Reacciones de amplificación y reamplificaciones realizadas para determinación de las variantes alélicas del <i>CYP2D6</i>
Tabla 2	Comparación de las Variables Biológicas de los Pacientes Estudiados de acuerdo al género.
Tabla 3	Comparación de las Variables Biológicas TAS, TAD y FC de los Pacientes Estudiados.
Tabla 4	Diagnósticos Clínicos de los Pacientes Estudiados.
Tabla 5	Relación de Terapia Antihipertensiva y Medicamentos Concomitantes de los Pacientes Estudiados.
Tabla 6	Relación de Pacientes de Acuerdo a su Clasificación del Ritmo Circadiano de la TAS.
Tabla 7	Relación de Pacientes de Acuerdo a su Clasificación del Ritmo Circadiano de la TAD.
Tabla 8	Porcentaje de Disminución Nocturna Esperado de la TAS y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano.
Tabla 9	Porcentaje de Disminución Nocturna Esperado de la TAD y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano.
Tabla 10	Porcentaje de Disminución Nocturna Esperado de la Presión Arterial Sistólica y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano de los Pacientes con Edad Mayor a 50.
Tabla 11	Promedio de Presión de Pulso y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano de los Pacientes con edad mayor a 50 años.
Tabla 12	Porcentaje de Disminución Nocturna Esperado de la Presión Arterial Diastólica y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano de los Pacientes con Edad menor a 50 años.
Tabla 13	Clasificación del Rango Terapéutico Alcanzado por la Población del Estudio
Tabla 14	Rango Terapéutico Alcanzado y C _{pm} de Metoprolol de los pacientes en Estudio.

Tabla 15	Disminución de la TAS nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano y la C _p max, T _{max} e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol administrada en el estudio matutino.
Tabla16	Disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano y la C _p max, T _{max} e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol administrada en el estudio vespertino
Tabla17	Disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano y la C _p max, T _{max} e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol administrada en el estudio matutino.
Tabla 18	Disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano y la C _p max, T _{max} e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol administrada en el estudio vespertino.
Tabla 19	Parámetros Farmacocinéticos de Metoprolol Después de la Dosis Matutina.
Tabla 20	Parámetros Farmacocinéticos de Metoprolol Después de la Dosis Vespertina
Tabla 21	Comparación de las Medianas y los Valores Máximos y Mínimos de los Parámetros Farmacocinéticos de Metoprolol, entre la Dosis matutina y Vespertina.
Tabla 22	Comparación de las Variables Biológicas de los Pacientes Con y Sin Medicamento Antihipertensivo Además del Metoprolol.
Tabla 23	Genotipo del CYP2D6 en los Pacientes Estudiados
Tabla 24	Comparación de los parámetros PK (t _{1/2} el y CI) de metoprolol de acuerdo al genotipo y a la cronofarmacocinética
Tabla 25	Comparación de los parámetros PK (ABC y V _d) de metoprolol de acuerdo al genotipo y a la cronofarmacocinética

Lista de Abreviaturas

AAS	Ácido acetil salicílico
ABC	Área bajo la curva
ARA	Antagonista de los receptores de la angiotensina II
CI /F	Depuración
Cpmax	Concentración plasmática máxima
Cpmin	Concentración plasmática mínima
CYP	Citocromo P450
DNTP	Nucleótido
EVC	Evento vascular cerebral
FC	Frecuencia cardiaca
HAS	Hipertensión arterial sistémica
IAM	Infarto agudo al miocardio
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IMC	Índice de masa corporal
Kb	Kilobases
LADME	Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
Mm	Milimolar
MAUC	Modelo abierto de un compartimento
MADC	Modelo abierto de dos compartimentos
ML	Metabolizador lento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción-reacción en cadena de la polimerasa
Pk	Coeficiente de ionización
PK/PD	Relación Farmacocinética/farmacodinamia
PP	Presión de pulso
PCR-RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción-reacción en cadena de la polimerasa
t_{1/2} el	Tiempo medio de eliminación
TA	Tensión arterial
TAD	Tensión arterial diastólica
Tmax	Tiempo máximo de la concentración plasmática
TAS	Tensión arterial sistólica
Vd /F	Volumen de distribución
XL-PCR	Amplificación de fragmentos grandes de ADN Genómico

RESUMEN

La variación farmacogenética y la cronofarmacocinética del metoprolol pueden influir en la respuesta al tratamiento, por lo que el objetivo del presente estudio fue establecer la influencia de los polimorfismos genéticos del *CYP2D6* sobre la cronofarmacocinética del metoprolol y su respuesta, en individuos bajo tratamiento, para lo cual se incluyeron 11 pacientes (6 mujeres y 5 hombres) para el estudio Farmacocinético (PK) matutino y vespertino, con dosis de 100 mg de metoprolol. Se midió la tensión arterial (TA), la frecuencia cardíaca (FC) y las concentraciones de metoprolol, este último mediante HPLC a ocho diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 4, 7, 12, 18 y 24 hrs. post-dosis). A partir de una muestra sanguínea se aisló el ADN y se determinaron los polimorfismos del *CYP2D6*: *3, *4, *5, *6 (variantes inactivas), *10, *17 (variantes de función intermedia) y duplicaciones del gen, mediante la técnica de PCR-RFLP. De los resultados obtenidos, la TA sistólica fue diferente de acuerdo a la hora de administración: 6 de 10 pacientes fueron dipper con la dosis vespertina y 3 pacientes dipper con la dosis matutina. Seis pacientes fueron no dipper con la dosis matutina y 2 con la dosis vespertina. Dos sujetos fueron riser con la dosis vespertina contra uno con la dosis matutina. El número de sujetos que se encontraron dentro del intervalo terapéutico fue mayor con la dosis vespertina, mientras que con la dosis matutina fue mayor el número de sujetos con concentraciones tóxicas. En 9 de los 20 estudios realizados, fue posible obtener sus parámetros PK (C_{pmax} , T_{max} , $t_{1/2el}$, ABC y Cl/F), los cuales fueron más elevados con la dosis matutina que con la vespertina. De los pacientes con parámetros PK, 3 fueron heterocigotos para una variante inactiva del *CYP2D6* y 2 homocigotos silvestres. Los individuos heterocigotos eliminaron más lento el fármaco que los homocigotos. Lo cual se hace más evidente en el turno matutino, ya que factores ambientales modifican el fenotipo en el turno vespertino. De lo anterior se puede concluir que existe una mejor respuesta al tratamiento con la dosis vespertina que con la dosis matutina. La PK de metoprolol se ve influenciada principalmente por los ritmos circadianos y los polimorfismos del *CYP2D6*, lo que hace obligado individualizar el tratamiento de acuerdo a estos factores biológicos y ambientales.

ABSTRACT

Pharmacogenetic and chrono pharmacokinetic variation of Metoprolol have an influence on treatment response, the objective of this study was to establish the influence of CYP2D6 and genetic polymorphisms over the chrono-pharmacokinetic of metoprolol and its response in individuals undergoing treatment, 11 patients were included in this study for pharmacokinetic analysis in the morning and evening with 100 mg metoprolol doses. BP and HR were measured as well as metoprolol concentration by HPLC in 0.5, 1, 2, 4, 7, 12, 18 and 24 hours post-dose. DNA was isolated from blood samples and CYP2D6 polymorphisms determined: *3, *4, *5, *6 (inactive variants), *10, *17 (intermediate function variant) and duplications by PCR-RFLP technique. For the 11 patients (6 women and 5 men), SBP reading was different depending on the administration time: Six out of 10 patients were dipper with evening dose against 3 patients dipper with morning dose. Six patients were no dipper with morning dose and 2 with evening dose. Two patients were riser with evening dose vs one with morning dose. The number of subjects found in the therapeutic interval was higher with the evening dose while the number of subjects with toxic concentrations was higher with the morning dose. In 9 of the 20 studies conducted, it was possible to get PK parameters (pC_{max} , T_{max} , $t_{1/2el}$, ABC and Cl/F), which were higher with the morning dose compared with the evening dose. Among those patients with PK parameters, three were heterozygous for an inactive variant of the CYP2D6 and two homozygous wild type. Heterozygotic subjects had slower elimination of the medication compares with homozygotic, which is more evident in the morning owing to the fact that environment factors modified the phenotype in the afternoon. We can conclude there was a better treatment response with evening dose compares with morning dose. The PK of metoprolol was influenced mainly by circadian rhythms and CYP2D6 polymorphisms, therefore according to these biological and environment factors is important to place individual treatment in order to obtain better response to it.

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial esencial es un problema de salud pública e individual importante. La medicación es esencial para el tratamiento de las personas hipertensas. Entre los fármacos más usados en esta población, se encuentra el metoprolol el cual es ampliamente prescrito en adultos jóvenes y adultos mayores. Este fármaco es un agente cardiosselectivo bloqueador β -adrenérgico, que es metabolizado principalmente por la isoenzima del citocromo P450 CYP2D6, la cual cataliza la alfa-hidroxilación y la O-demetilación de este fármaco (Borg *et al.*, 1975).

La cronofarmacología es una nueva visión de la farmacología, estudia los efectos de los fármacos en función del tiempo biológico. Existen variaciones circadianas en la concentración de un fármaco y sus metabolitos en los líquidos biológicos. Estas fluctuaciones se deben a que la actividad biológica de las células del organismo es variable a lo largo del día. La síntesis de las diferentes sustancias endógenas del organismo, entre ellas los sistemas enzimáticos encargados del metabolismo de los fármacos, siguen ritmos de actividad de tipo circadiano. Esa diferente actividad modifica los procesos farmacocinéticos del Sistema LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco) (Betés de Toro *et al.*, 1994)

Estudios recientes indican que la variación genética puede ser un marcador útil para evaluar la eficacia terapéutica de la medicación antihipertensiva (Cadman y O'Connor, 2003) y para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico, dicha variación se ve reflejada en la identificación en más de 75 alelos del CYP2D6 (Ingelman-Sundberg, *et al.*, 2007), algunos de estos presentan mutaciones que dan lugar a un aumento, reducción o una completa pérdida de actividad enzimática (Capdevila *et al.*, 2002), lo cual ofrece una nueva aproximación al ajuste del tratamiento antihipertensivo y a mejorar su eficacia. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de los polimorfismos genéticos del CYP2D6 sobre la cronofarmacocinética del metoprolol en individuos bajo tratamiento.

II. ANTECEDENTES

Epidemiología

En México la prevalencia de la Hipertensión Arterial Sistémica es de 30.05% (Velázquez *et al.*, 2000). En Durango, la prevalencia por diagnóstico médico previo en los adultos de 20 años o más, es de 18.5% con un 23% en mujeres y un 13.1% en hombres, alcanzando un 41.1% en adultos mayores de 60 años (Velázquez *et al.*, 2000).

Definición, clasificación y fisiopatogenia de la HAS

La presión arterial se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial y se expresa a través de las diferentes técnicas de medición como TAS.

Sistemas de control

Son múltiples los mecanismos fisiológicos conocidos que intervienen en el control de la PA y que al mantener una estrecha interrelación garantizan la homeostasis del organismo.

Estos sistemas de control son:

1.- Los nerviosos actúan rápidamente (segundos)

- Barorreceptores.
- Quimiorreceptores.
- Respuesta isquémica del sistema nervioso central.
- Receptores de baja presión.

Otros mecanismos de respuesta rápida

- Participación de los nervios y músculos esqueléticos.
- Ondas respiratorias.

2.- Sistema de regulación de acción intermedia (minutos).

- Vasoconstricción por el sistema renina angiotensina.
- Relajación de los vasos inducido por estrés.
- Movimiento de los líquidos a través de las paredes capilares.
- Vasoconstrictor noradrenalina-adrenalina
- Vasoconstrictor vasopresina.

3.- Mecanismos a largo plazo (horas y días)

- Control Renal

Sistema renal-líquidos corporales

Sistema renina angiotensina aldosterona.

Con frecuencia se señala que la HAS es controlada por el gasto cardíaco y la resistencia periférica. En condiciones normales, aproximadamente un 60% del volumen sistólico permanece en los vasos de gran capacitancia (aorta y grandes vasos) mientras que el 40% restante es conducido directamente a los tejidos periféricos. En la diástole la energía almacenada contrae la aorta y envía la sangre hacia la circulación periférica. Cuando la distensibilidad arterial está disminuida la capacidad de almacenamiento se reduce por lo que el volumen que pasa a la circulación periférica directamente tras la eyección ventricular es mayor dando lugar a un incremento en la amplitud de la onda de pulso y a una presión sistólica más elevada. La presión diastólica mínima viene determinada por la duración del intervalo diastólico (que a su vez depende de la frecuencia cardíaca) y la rapidez con que desciende la presión. Esta velocidad de descenso está relacionada con dos parámetros: por un lado con las resistencias periféricas y por otro, con las propiedades viscoelásticas de las grandes arterias. Luego, para unas resistencias periféricas dadas, el descenso de la presión diastólica será mayor conforme más elevada sea la rigidez de las grandes arterias.

Este patrón de elevación de la TA en el que la rigidez supera a las resistencias

periféricas dará lugar a la elevación de la TAS manteniendo normal o incluso disminuyendo la TAD, es decir elevación de la presión de pulso y HAS aislada. Por el contrario cuando las resistencias periféricas están elevadas dan lugar a una reducción del flujo anterógrado por lo que la proporción de sangre que queda almacenada en las grandes arterias es mucho mayor y como consecuencia aumenta el flujo anterógrado diastólico (70%) y se elevan la presión arterial media y la presión diastólica. En éste caso las resistencias periféricas superan a la rigidez arterial por lo que producirán una elevación de la TAD y de la TAM dando lugar a hipertensión sistodiastólica.

Estas características fisiopatológicas condicionan las dos formas de desarrollo de la HAS en el ser humano. El aumento de las resistencias periféricas consecuencia de alteraciones estructurales de la microvasculatura y de la rarefacción de los pequeños vasos se observa fundamentalmente en individuos jóvenes o de mediana edad y afecta a una parte pequeña de la población (menos del 20%), aunque la obesidad, el sedentarismo y, en general, el estilo de vida moderno tienden a aumentar la prevalencia de esta forma de hipertensión, en la que predomina la elevación de la TAD y de la TAM.

La etiopatogenia no se conoce aún pero los distintos estudios indican que los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la HT primaria. (O'Rourke y Staessen, 2002)

A continuación relacionamos diferentes teorías que abordan tan compleja enfermedad.

1. Factores genéticos.
2. Factores alimentarios.
3. Factores ambientales.
4. Factores psicosociales.
5. Síndrome de estrés y adaptativo de Selye.
6. Teoría neurovisceral de Miasnikov.

7. Iones de sodio-potasio y la ATPasa. Otros iones.
8. Disbalance en la relación GMPc - AMPc.
9. Sistema renina-angiotensina-aldosterona.
10. Prostaglandinas.
11. Sistema kalicreína - kinina.
12. Metabolismo de los glúcidos.
13. SNS.
14. Endotelinas.

Otros factores:

- Sedentarismo.
- Tabaquismo.

Criterios Diagnósticos

En el Séptimo Informe del Joint National Committee sobre prevención, detección, evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial, se propone una clasificación sencilla de la hipertensión arterial (National Heart, Lung and Blood Institute NIH-2004).

Se establece un nuevo estadio "prehipertensión", en sujetos con cifras de tensión arterial TA de 120-139/80-89 mmHg. Este grupo tiene un riesgo elevado de desarrollar hipertensión y en ellos son fundamentales los programas de educación sanitaria para modificar "su estilo de vida".

El objetivo terapéutico en pacientes con edad igual o superior a 50 años, es el de conseguir descender la TA por debajo de 140/90 mmHg y < 130/80 mmHg en pacientes diabéticos o con insuficiencia renal. Se describe un claro algoritmo para el tratamiento de la hipertensión arterial (National Heart, Lung and Blood Institute NIH-2004).

La primera medida, es el cambio de estilo de vida, que incluya reducción de peso, reducción de ingesta de sodio, reducción de consumo de alcohol y aumento de actividad física con lo que se consigue un descenso importante de la TA.

Los fármacos para iniciar el tratamiento, dependerán de que la hipertensión no esté complicada o bien presente complicaciones asociadas. En el primer grupo (hipertensión no complicada) y dentro del estadio 1 (140-159/90-99 mmHg), se puede iniciar el tratamiento con un diurético tiazidico a dosis bajas, o considerar algunos de los siguientes grupos: Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA), Antagonista de los Receptores de Angiotensina II (ARA II), Betabloqueantes o Calcioantagonistas. En el VI informe del Joint National Committe, se recomendaba únicamente el inicio con tiazidas o betabloqueadores.

En el estadio 2 (> 160/100 mmHg), se aconseja la asociación de dos fármacos: usualmente tiazidas y IECA o ARA II o betabloqueadores o calcioantagonistas. Esto se realiza con los dos fármacos de forma aislada o en combinaciones fijas.

El uso de fármacos genéricos o combinaciones fijas de los fármacos, se puede considerar para reducir el gasto sanitario.

En los pacientes con complicaciones específicas, se sugieren determinados fármacos según los resultados de distintos ensayos, entre los cuales se encuentran los betabloqueadores

Asimismo, se revisan todas las situaciones especiales, que requieren medidas o tratamientos específicos (National Heart, Lung and Blood Institute NIH-2004).

Farmacocinética del metoprolol

El metoprolol se absorbe completamente tras la administración oral, en más del 95% detectado en forma de metoprolol y sus metabolitos (α –hidroxymetoprolol, O-desmetilmetoprolol y metoprolol deanimado) en orina. Las concentraciones

plasmáticas máximas se alcanzan al cabo de una 1 a 2 horas, y no son significativamente diferentes entre personas de edad avanzada y personas jóvenes. Debido al efecto del primer paso, alrededor del 50% de una dosis oral alcanza la circulación sistémica. La disponibilidad sistémica de cada dosis oral puede aumentar de 20-40% si se administra junto con alimentos, aunque la variabilidad interindividual es grande, los perfiles del nivel plasmático pueden reproducirse bien en cada individuo (Hoffman y Lefkowitz, 1996).

Menos de 5% de la dosis se excreta en forma inalterada en la orina de la mayoría de los sujetos, lo cual indica que el metabolismo es el principal proceso responsable de su eliminación (Regardh *et al.*, 1974). La vida media de eliminación promedio es de 3 horas y media. El aclaramiento sistémico de una dosis intravenosa es de 1ml/min aproximadamente y la fijación proteica es de un 10%. (Regardh *et al.*, 1974).

Las grageas de liberación controlada consisten de varios cientos de microesferas con succinato de metoprolol. Cada microesfera está cubierta con una membrana polimérica que controla la velocidad de liberación de metoprolol. La gragea se desintegra rápidamente después de ser ingerida, permitiendo la dispersión de las microesferas en el tubo digestivo, liberando metoprolol en forma continua aproximadamente por 20 horas (Rosenstein *et al* 2004).

La liberación oral ofrece una accesibilidad excelente, de modo que los sistemas de liberación de fármacos pueden ser incorporados y eliminados con facilidad. La membrana mucosa de la boca también proporciona una ruta de administración para las terapias sistémicas.

Entre las propiedades fisicoquímicas que pueden afectar la farmacocinética se encuentran:

Solubilidad. En general, para que un fármaco sea absorbido debe presentarse en forma de disolución acuosa en el lugar de absorción.

Peso molecular. Probablemente, más del 95% de los fármacos, son transportados a través de membranas, por difusión. En este caso, el fármaco debe presentarse

en forma de disolución acuosa fuera de la membrana, luego debe poderse disolver en el material de la membrana durante el proceso de transporte a través de ella, y después de ser expulsado debe ser soluble en el medio acuoso del otro lado de la membrana.

pKa. Muchos fármacos son electrolitos débiles, lo que significa que se ionizan a ciertos pHs. El porcentaje de ionización depende del valor del pKa, y puede ser descrito por la ecuación de Henderson-Hasselbalch,

Coeficiente de partición aparente (CPA). El coeficiente de partición aparente, también llamado coeficiente de partición lípido/agua, es la relación de las concentraciones de fármaco en dos fases parcialmente inmiscibles. (Sáez *et al.*, 2003)

Diferentes estudios han demostrado que los patrones farmacocinéticos y los factores que influyen sobre estos, deben ser monitoreados cuidadosamente en las diferentes formas de liberación de metoprolol. Sin embargo, las fluctuaciones en las curvas plasmáticas indican que los factores fisiológicos como la motilidad y presumiblemente el metabolismo influye adicionalmente en los patrones farmacocinéticos (Lipika *et al.* 1995, Oberle *et al.*, 1987, Higaki *et al.*, 2001).

Cronofarmacocinética de agentes antihipertensivos

Mientras que la biología molecular de los ritmos circadianos ha sido revelada a fondo en varias especies animales, la investigación en humanos todavía se encuentra en fases tempranas. La biología circadiana en humanos es similar a la que se encuentra en los animales, sin embargo, los seres humanos expresan comportamientos que no son equivalentes al resto del reino animal, debido el uso de relojes, despertadores, aplicación de luz artificial, trabajo nocturno voluntario, automedicación de fármacos cronobióticos (Amita *et al* 2004).

El reloj maestro responsable de la coordinación en la relación que se establece en varios órganos y sistemas fisiológicos y el ambiente en todos los momentos del día,

es el núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado en el hipotálamo en el cerebro. Éste envía señales al resto del cerebro, osciladores periféricos y tejidos para coordinar el tiempo interno del cuerpo durante un periodo de 24 hrs.

Los sincronizadores, definidos en los años cincuenta por Halberg, llamados también «Zeitgebers» por Aschoff, son señales externas del medio ambiente, capaces de poner en hora los ritmos biológicos del organismo (Halberg *et al* 1954, Aschoff 1954). En jerarquía, el sincronizador más importante para el ser humano es la alternancia luz-oscuridad, del cual se regulan múltiples funciones biológicas. Ya se ha descrito la alternancia frío-calor (ritmos estacionales), alternancia ruido-silencio señal de carácter social en relación con el ritmo actividad-descanso.

Las distintas etapas farmacocinéticas, como la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción, están influenciadas por diferentes funciones fisiológicas que varían durante el día. Estas modificaciones determinan cambios en los parámetros farmacocinéticos de un agente antihipertensivo, como la concentración plasmática máxima, el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima, el aclaramiento y el volumen de distribución (Höcht y Taira, 2006).

Todos los grupos farmacológicos ven modificados sus efectos según la hora de administración, los bloqueadores beta son uno de ellos (Lemmer *et al*)

La variación circadiana de la presión arterial está caracterizada por un descenso nocturno de la misma entre aproximadamente las 21:00 horas y las 6:00 horas (Hassler *et al.*, 2005). A partir de ese momento surge un incremento brusco de la presión arterial a razón de 3mmHg/hora, el cual se extiende hacia las 12:00 horas (Hassler *et al.*, 2005). Paralelamente se incrementa también la frecuencia cardíaca aumentando significativamente la demanda de oxígeno por parte del miocardio (White *et al.*, 1997).

A partir de estos hallazgos es habitual la clasificación de los pacientes hipertensos de acuerdo al ritmo circadiano que presenta su presión arterial en cuatro grupos: (Hermida *et al.*, 2004).

- Hipertensos dippers, los cuales presentan un descenso en media nocturna de la presión arterial mayor al 10%.
- Hipertensos no-dippers, en los cuales no se observa el descenso nocturno de la presión arterial (<10%).
- Hipertensos dipper extremos con reducciones bruscas de la presión arterial nocturna (>20%).
- Hipertensos riser, que son aquellos en donde la presión nocturna es superior a la presión diurna.

. Todos los grupos farmacológicos ven modificados sus efectos según la hora de administración como es el caso del los betabloqueadores (Lemmer, 1991)

Si bien se han realizado pocos estudios cronotrópicos de bloqueantes beta adrenérgicos, estos agentes antihipertensivos fueron más eficaces en reducir la presión arterial diurna con respecto a la nocturna en ensayos convencionales, incrementando de esta manera el patrón no dipper en los pacientes hipertensos (Höcht y Taira, 2006).

La terapéutica antihipertensiva utilizada actualmente no presentaría un control óptimo del riesgo cardiovascular de pacientes hipertensos, especialmente en pacientes que no presentan el descenso nocturno de la presión arterial. Por lo tanto, los objetivos de la cronoterapéutica en la hipertensión arterial serán re-establecer el patrón circadiano normal de la presión en pacientes no dippers y atenuar el incremento matutino de la misma. Para ello se han desarrollado distintas estrategias, entre las cuales se puede destacar el diseño de fármacos antihipertensivos con un mayor tiempo de vida media de eliminación, de manera tal que se incrementa la permanencia del fármaco en el organismo, prolongando así su acción farmacológica.

Otra estrategia cronoterapéutica es la administración nocturna del fármaco antihipertensivo, de manera tal que alcance concentraciones plasmáticas altas en

el período nocturno y atenúe el incremento matinal de la presión arterial. Esta estrategia, si bien parece la más adecuada en pacientes no dippers, podría ser deletérea en pacientes dippers o dippers extremos, ya que ocasionaría una reducción exagerada de la presión nocturna con el consiguiente incremento del riesgo de un accidente cerebrovascular isquémico. Además, no todos los antihipertensivos presentan eficacia importante en el período nocturno. Un claro ejemplo son los bloqueantes beta-adrenérgicos, los cuales reducen en mayor grado la presión diurna respecto a la nocturna. (Hermida *et al.*, 2004)

Existen diferentes instancias por la que estudios cronofarmacocinéticos son necesarios: 1) cuando las variaciones diarias en la farmacocinética puede ser responsables de las variaciones dependientes del tiempo en los efectos de los fármacos (específicos a cierta hora del día) (Michel *et al* 1999), 2) cuando los fármacos tienen un intervalo terapéutico estrecho (Bruguerolle 1998), 3) cuando los síntomas de la enfermedad son claramente fase-circadiano dependientes (Lemmer 1997), 4) cuando las concentraciones plasmáticas están bien correlacionadas al efecto terapéutico en caso que sean fase-circadiano dependientes (Bruguerolle *et al* 1993), y 5) cuando el fármaco tiene serios efectos adversos.

Farmacogenética

La isoenzima CYP2D6 metaboliza el 20% de los medicamentos más usados clínicamente (Bertz y Granneman, 1997).

Genética molecular de CYP2D6

EL gen que codifica para la enzima CYP2D6 está formado de 9 exones y 8 intrones, se encuentra en el locus CYP2D, ubicado en el brazo largo del cromosoma 22, en la posición 22q13.1; el CYP2D6 está acompañado por dos pseudogenes altamente homólogos, CYP2D8P, CYP2D7, los cuales se localizan dentro de una región contigua de aproximadamente 45 kb (Skoda *et al.*, 1988).

La variabilidad interindividual en la respuesta a estos fármacos es debido principalmente a los polimorfismos del gen *CYP2D6*, del que se han identificado más de 75 alelos (Ingelman-Sundberg, *et al.*, 2007), algunos de estos presentan mutaciones que dan lugar a un aumento, reducción o una completa pérdida de actividad enzimática (Capdevila *et al.*, 2002).

Alelos inactivos del CYP2D6

Los alelos inactivos no codifican para una proteína *CYP2D6* funcional y no se detecta una actividad enzimática residual. Estos alelos son responsables del fenotipo metabolizador lento (ML) si están presentes como homocigotos o en diferentes combinaciones de heterocigotos. Se han reportado diferentes mecanismos que conducen a la pérdida total de función de la proteína como los que se mencionan a continuación:

*CYP2D6**3. Consiste de una supresión de un par de bases que interrumpe el marco de lectura y provoca la terminación prematura de la proteína, en caucásicos se presenta con una frecuencia del 0.7 al 1.4% (Kagimoto *et al.*, 1990).

*CYP2D6**4. Este es el alelo inactivo más frecuente en Caucásicos que aparece con una frecuencia del 20 al 25% y es responsable del 70 al 90% de todos los ML en esta población. La mutación clave de este alelo es una transición de una G por A la cual provoca un cambio del sitio consenso de procesamiento del RNA en el tercer intrón, generando un RNAm con una base adicional causando un marco de lectura alterado y un prematuro codón de paro. En orientales la frecuencia del alelo *4 es sólo del 1% o menos (Wang *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 1994; Dahl *et al.*, 1995), mientras que aparece con una frecuencia de 6 a 7% en Africanos y Afroamericanos (Leathart *et al.*, 1998; Griesse *et al.*, 1999).

*CYP2D6**5. Se presenta con una frecuencia muy similar tanto en caucásicos como en orientales y se caracteriza por una supresión del gen entero *CYP2D6* (Gaedigk *et al.*, 1991), de manera que sólo los pseudogenes *CYP2D7* y *CYP2D8P* se encuentran en el cromosoma.

*CYP2D6**6. Contiene una mutación que inactiva al gen, al producirse un cambio del marco de lectura en el exón 3 lo que produce un codón de paro y como consecuencia una enzima inactiva (Daly *et al.*, 1995).

Alelos que causan un metabolismo disminuido

*CYP2D6**10. La mutación 100C<T que provoca la sustitución del aminoácido Pro34 a Ser, es la mutación funcionalmente dominante del alelo *10. Pro34 es parte de una región altamente conservada de los CYP450's microsomales que funciona como un tipo de "bisagra" entre la parte hidrofóbica transmembranal y la porción globular de la enzima (Yamazaki *et al.*, 1993). Diferentes estudios han reportado bajos niveles de proteína *CYP2D6* y actividad enzimática residual del producto de este alelo, lo cual explica porque individuos homocigotos para la variante *10 o con el genotipo *10/*0 (*0 alelo inactivo) son fenotípicamente MI (metabolizadores intermedios) y no ML. En Caucásicos el alelo *10 tiene una frecuencia de 2% y es responsable del 10-20% de los individuos MI (34,69), mientras que en orientales su frecuencia excede el 50% (Wang *et al.*, 1993; Armstrong *et al.*, 1993).

*CYP2D6**17. Este alelo presenta dos mutaciones en común con el *2 (alelo activo) y una mutación adicional que provoca el cambio de T107 a I que es la causa de una disminución en la actividad de la enzima. El alelo *17 está prácticamente ausente en los Europeos (Griese *et al.*, 1998), pero en Africanos o Afro-americanos tiene una frecuencia cercana al 30% y parece explicar porque los Africanos tienen valores más altos de la RM (Leathart *et al.*, 1998).

Alelos que causan un metabolismo ultra-rápido

El metabolismo ultra-rápido es causado por la presencia de duplicaciones, multiduplicaciones o amplificaciones del *CYP2D6* (Johansson *et al.*, 1993). Actualmente, se han reportado alelos con dos, tres, cuatro, cinco y 13 copias en tándem (Ingelman-Sundberg, 1997), el número de individuos llevando múltiples copias del *CYP2D6* es mayor en Etiopía y Arabia Saudita, donde una tercera parte de la población presenta este genotipo. Los alelos con dos a cinco copias en

tándem, se han originado probablemente por recombinación desigual entre dos secuencias homólogas pero no alélicas que flanquean al gen. Por el contrario, los alelos con 13 copias del gen han aparecido probablemente por segregación desigual y replicación extracromosomal de DNA acéntrico (Lundqvist *et al.*, 1999).

Asociación Genotipo-Fenotipo

Existe una asociación cercana entre el genotipo y fenotipo de CYP2D6 para Caucásicos y Asiáticos. Sin embargo, la relación entre fenotipo y las frecuencias alélicas para el gen *CYP2D6* en la población Africana y Afro- Americana es más ambigua (Droll *et al.*, 1998). En dicha población se ha observado una disociación fenotípica, ya que se ha reportado que metabolizan diferentes sustratos de CYP2D6 con diferentes grados de eficiencia (Masimirembwa *et al.*, 1997; Droll *et al.*, 1998).

En un estudio con individuos México-Americanos (Mendoza *et al.*, 2001), los alelos *3, *4 y *5 fueron responsables de aproximadamente dos terceras partes de los ML. Además se observó que estos alelos inactivos también influyen en la actividad enzimática en los MR: los sujetos heterocigotos para estos alelos (por ej., *1/*4), presentaron significativamente menos actividad de CYP2D6 que aquellos clasificados como homocigotos silvestres, lo cual demuestra un claro efecto de gen-dosis, que también se ha reportado previamente en Caucásicos (Sachse *et al.*, 1997).

La frecuencia de ML en población caucásica es de 5 al 10% (Gaedigk *et al.*, 1999), en Africanos es del 0 al 19% (Masimirembwa y Hasler, 1997), mientras que en asiáticos no es mayor al 2%. En México-Americanos de Los Ángeles se reportó una frecuencia de 3.2% (Mendoza *et al.*, 2001) y recientemente en el laboratorio de genómica del CIIDIR Durango se determinó una frecuencia de 6.8% de ML en Mestizos del estado de Durango (Sosa-Macias *et al.*, 2006), cercana a la obtenida en Mestizos de la ciudad de México, D.F que es del 10% (López *et al.*, 2005).

El polimorfismo de esta enzima puede resultar en diferencias de 30-40 veces en el aclaramiento de fármacos, que da como resultado concentraciones fuera del rango

terapéutico en una fracción de los pacientes tratados. En virtud de lo anterior, se pueden observar no sólo severos efectos adversos en la terapia clínica, por ejemplo la terapia con antihipertensivos (Kirchheiner *et al.*, 2004), sino también una falta de respuesta al medicamento, tal como se observa en los ML después de una baja dosis de codeína (Gasche *et al.*, 2004), mientras que en los (metabolizadores ultra rápidos (MUR) se observa que no responden a las dosis usuales de fármacos debido a la rápida eliminación del agente activo, por lo que se requieren mayores dosis de medicamento para alcanzar el efecto terapéutico (Bertilsson *et al.*, 1993). Se han recomendado dosis preliminares de antidepresivos basadas en el genotipo del *CYP2D6* (Kirchheiner *et al.*, 2004), lo que nos permite vislumbrar cómo la farmacogenética puede sugerirnos regímenes de dosis para una cierta población de pacientes.

Estudios recientes indican que la variación genética puede ser un marcador útil para evaluar la eficacia terapéutica de la medicación antihipertensiva (Cadman y O'Connor, 2003) y para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico, lo cual ofrece una nueva aproximación al ajuste del tratamiento antihipertensivo y a mejorar su eficacia. A este respecto, se ha observado que algunas variantes alélicas del *CYP2D6* influyen en la variabilidad farmacocinética del metoprolol en adultos jóvenes y adultos mayores de origen asiático (Taguchi *et al.*, 2003), así mismo, se ha publicado que la farmacocinética del metoprolol en dosis repetitivas puede ser diferente de la obtenida en una dosis única en pacientes más jóvenes.

Aunque el genotipo del *CYP2D6* es uno de los factores principales en la actividad enzimática, éste explica solo una fracción de la variación total y no predice con exactitud la respuesta individual a un fármaco.

La enorme variación interindividual en la actividad del *CYP2D6*, sugiere que se debe tener un cuidadoso monitoreo de las concentraciones de metoprolol en plasma y de la bioactividad del *CYP2D6*, en el contexto de una co-administración de otros fármacos que pueden intervenir en la actividad de la enzima y que normalmente forman parte de la politerapia con metoprolol en pacientes hipertensos.

La variabilidad en la respuesta a los fármacos puede ser parcialmente debida a diferencias en el metabolismo. Sujetos con diferente capacidad metabólica (ML o MUR) pueden tener mayores o menores concentraciones en plasma que las esperadas cuando son tratados con las dosis clínicamente recomendadas. Debido a la alta variabilidad interindividual entre dosis del fármaco y concentraciones en plasma, no es posible prescribir el mismo régimen de dosis a todos los pacientes. Por lo tanto, la evaluación del perfil farmacocinético así como de las concentraciones plasmáticas del metoprolol en estado estacionario pueden ser útiles en la individualización de la dosis. Además, puede ayudar en el manejo clínico de interacción de fármacos, que se observa con frecuencia en pacientes hipertensos, quienes pueden presentar una repentina pérdida de eficacia o a una inesperada toxicidad del fármaco.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La alta variabilidad interindividual en la respuesta al metoprolol, empleado para el tratamiento de la HAS, es debida en parte a los polimorfismos del gen *CYP2D6* que codifica para la enzima involucrada en su metabolismo. Asimismo, la cronobiología juega un papel importante para explicar las variaciones circadianas que regulan la HAS. Lo anterior hace obligado el conocimiento farmacocinético y farmacogenético de este fármaco, con el fin de mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento, así como el mejor control de este padecimiento.

3. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión arterial sistémica debido a su alta prevalencia y una amplia variabilidad interindividual hace obligado el conocimiento farmacogénético y farmacocinética de los fármacos utilizados para su tratamiento y control como el caso del metoprolol, el cual es metabolizado principalmente por la enzima del citocromo P450 CYP2D6.

Así mismo, es imprescindible conocer el papel que juega la cronobiología para explicar las variaciones circadianas que regulan hipertensión arterial así como la farmacocinética y la farmacodinamia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar la influencia de los polimorfismos genéticos *3,*4, *5, *6, *10, *17 y la duplicación *CYP2D6* sobre la cronofarmacocinética del metoprolol en individuos mexicanos bajo tratamiento.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Establecer diferencias cronofarmacocinéticas de acuerdo a los polimorfismos genéticos *3,*4, *5, *6, *10, *17 y la duplicación *CYP2D6*

4.2.2. Determinar la relación de los parámetros cronofarmacocinéticos de metoprolol de acuerdo a la hora de administración de metoprolol.

5. DISEÑO DEL ESTUDIO

- Prospectivo
- Transversal
- Comparativo

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio

Participaron 11 pacientes quienes acuden a control de su padecimiento a la Clínica de Diagnóstico en la ciudad de Durango y que cumplieron con los criterios de inclusión; de los cuales 9 realizaron el estudio matutino vespertino, un paciente sólo realizó el estudio matutino y otro sólo el estudio vespertino.

6.2. Criterios de inclusión:

- Consentimiento informado por escrito firmado.
- Género: masculino y femenino.
- Pacientes con diagnóstico previo de hipertensión arterial sistémica.

- Pacientes cuyo tratamiento antihipertensivo sea a base de metoprolol.

6.3. Criterios de exclusión

- Historia conocida de hipertensión secundaria, incluyendo (pacientes con desórdenes endócrinos como feocromocitoma, hipertiroidismo, e hipotiroidismo no tratado).
- Enfermedad progresiva no cardíaca fatal.
- Enfermedad inmunológica o hematológica.
- Que se encuentren tomando alguna hierba o componente de dieta que tenga el potencial de influir en la presión arterial, en los 7 días previos al estudio
- Bloqueo auriculoventricular de segundo o tercer grado.
- Insuficiencia cardíaca descompensada.
- Bradicardia sinusal clínicamente manifiesta, enfermedades del seno.
- Trastornos graves de la irrigación arterial periférica.
- Antecedentes de enfermedad renal inestable o de progreso rápido.
- Enfermedad hepática significativa, incluyendo hepatitis activa crónica.
- Antecedentes documentados de hepatotoxicidad con cualquier medicamento.
- Antecedentes documentados de enfermedad hepatobiliar severa.

6.4. Criterio de eliminación

Declinación de Consentimiento de Informado.

6.5. Variables

6.5.1. Variable dependiente: parámetros Farmacocinéticos: C_pmax, C_pmin, ABC, t_{1/2el}, V_d, Cl, y sus efectos sobre la TA.

6.5.2.- Variable independiente: Polimorfismos del CYP2D6.

Variables como la edad cronológica, peso corporal y género no fueron evaluadas en virtud del tamaño de muestra que impide una adecuada estratificación.

Tabaquismo: se solicitó a los pacientes no fumar 48 h antes del estudio.

Alcoholismo: se solicitó a los pacientes no ingerir alcohol 48 h antes del estudio.

Actividad física: se solicitó no realizar ejercicio físico (correr , trotar, etc.).

Medicamentos concomitantes: se registró el uso de monoterapia o polifarmacia y/o medicamentos inductores o inhibidores del CYP2D6.

6.6. Procedimiento

En la primer visita se administró el metoprolol a una dosis de 100 mg y se extrajeron ocho muestras sanguíneas a cada paciente en los siguientes tiempos: una toma pre-dosis y 0.5, 1, 2 , 4, 6, 8, 12, 18 y 24 hrs post-dosis. La dosis matutina se administró a las 7:00 hrs, la dosis vespertina las 18:00 hrs. Los estudios matutino y vespertino, se programaron con un intervalo de 7 días entre ellas. De las muestras sanguíneas se tomó el plasma y se determinaron las concentraciones plasmáticas mediante un método de cromatografía de líquidos de alta resolución, (HPLC). Además se realizó medición de la TA y FC en tres ocasiones utilizando un baumanómetro digital marca Omron, en posición sentado, con 5 minutos de reposo, previo a la recolección de la muestra.

6.7. Reporte de eventos adversos

El paciente 1 refirió mareo nocturno con la administración de la dosis vespertina. Cinco pacientes (5, 7, 8, 9, 10) refirieron pesadillas con la administración

vespertina. El paciente 1 presentó bradicardia con la dosis matutina (FC 42 latidos por minuto) y el paciente 9 presentó taquicardia al inicio del estudio vespertino.

7. ANÁLISIS

7.1. Determinación de las concentraciones plasmáticas de metoprolol.

Los niveles plasmáticos de metoprolol se determinaron por un método de HPLC, de acuerdo al método descrito por Sohn *et al* (1992). En tubos cónicos de 15 mL con tapón de rosca se colocaron 0.5 mL de plasma (plasma libre de fármacos o plasma al que se le añadieron concentraciones conocidas de metoprolol), 100 µl de los diferentes estándares de metoprolol y 5 mL de una mezcla de diclorometano/éter, los tubos se agitaron a máxima velocidad por 60 segundos. Se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo y se evaporó en baño maría a 45 °C. El residuo seco se reconstituyó con 1 ml de fase móvil del cual se inyectaron alícuotas de 200 µl al sistema cromatográfico.

7.2. Validación del método analítico

Se utilizó una columna Symmetry C₁₈ de 150 mm de longitud x 3.9 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm. Como fase móvil a utilizar fue una mezcla de solución acuosa de trietilamina y acetonitrilo en proporciones 85:15 v/v, la detección fue por fluorescencia a una longitud de onda de 230 nm y de emisión de 300 nm. Para demostrar la confiabilidad del método analítico se realizó la validación preparando en cada corrida analítica curvas patrón y series de muestras de control de calidad por duplicado (control bajo, medio y alto), utilizando como matriz biológica plasma humano.

Para determinar la linealidad del método se prepararon seis curvas de calibración independientes, en el intervalo de trabajo a las siguientes concentraciones: 10, 25,

50, 100, 200 a 300 ng/ml. Los controles de calidad incluidos fueron de 30, 100 y 250 ng/ml.

7.3. Análisis de genotipificación

Extracción de ADN

De cada paciente se obtuvo una mezcla de sangre para la determinación del genotipo, mediante el uso de tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante. El DNA genómico se aisló a partir de 5 mL de sangre total mediante el método de extracción de perclorato de sodio/cloroformo (Daly *et al.*, 1998)

Amplificación del gen *CYP2D6*

Para identificar los alelos *CYP2D6**3, *4, *6, *10 y *17 se amplificó mediante PCR el gen *CYP2D6* en un fragmento de 5100 pb, con los iniciadores P101 y P102, el cual posteriormente se empleó como templado para las reacciones de PCR anidadas. La reacción se realizó en 50 μ L totales consistiendo de la mezcla siguiente:

Agua	la necesaria para aforar a 50 μ l
Solución amortiguadora 10X	1X
Mezcla de dNTP's	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Iniciador 1	0.5 μ M
Iniciador 2	0.5 μ M
ADN genómico	~50 ng
Taq ADN polimerasa	
High Fidelity (Invitrogen)	2.5 U

Las condiciones empleadas para amplificar el fragmento de 5100 pb fueron las siguientes:

1 ciclo	94°C por 1 min
30 ciclos	94°C por 30 seg seguidos de 65°C por 30 seg y finalmente 68°C por 5 min

1 ciclo 68°C por 5 min

El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y el DNA se visualizó con bromuro de etidio.

Detección de los alelos *CYP2D63,*4,*6,*10 y *17**

Se realizaron sucesivas PCRs anidadas para identificar la presencia de los alelos *CYP2D6**3,*4,*6, *10 y *17. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en 25 µl totales con 0.5 U de Taq polimerasa, 1 µl de *CYP2D6* template (producto de la XL-PCR diluido con H₂O 1:10), 0.5 µM de cada primer, 0.2 mM de cada dNTPs y 1.2 mM MgCl₂. Las condiciones fueron: 1 minuto a 94°C, seguido de 30 ciclos (excepto *CYP2D6**6, 20 ciclos) de 10 segundos a 94°C, 20 segundos a 65°C, 20 segundos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Posteriormente, 8 µl de la reacción de PCR junto con un mix de 12 µl de buffer de restricción y 5-10 U de enzima de restricción (New England Biolabs, MA, USA) se incubaron durante 8 horas para conseguir una digestión completa. Con el producto de PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El DNA se visualizó con bromuro de etidio. La Tabla 1 resume todas las reamplificaciones que se llevaron a cabo.

Determinación de las multiplicaciones del gen *CYP2D6*

Para determinar la existencia de duplicaciones en el gen *CYP2D6* se realizó una XL-PCR. Los oligonucleótidos usados fueron 2D6dupl-F y 2D6dupl-R, que amplificaron un fragmento de 3.5 Kb solo en aquellos individuos que presenten más de una copia del gen en el mismo alelo (Bertilsson, 1993). Las reacciones se realizaron en 25 µl totales con 0.375 µl de la mezcla de la enzima Taq DNA Polimerasa (High Fidelity Invitrogen), de 50 a 100 ng/µl de DNA genómico humano, con 2.5 µl de solución amortiguadora para PCR, 0.5 mM de cada dNTPs y 0.5 µM de cada primer. Las condiciones fueron las siguientes: 2 min a 94°C, seguidos de 10 ciclos de 20 segundos a 95°C y 4 minutos a 68°C, 20 ciclos más aumentando 5 segundos cada paso de 68°C, y una extensión final de 7 minutos a 68°C.

Detección del alelo *CYP2D65**

Para determinar la presencia de *CYP2D6*5* en los individuos, se llevó a cabo una XL-PCR. Los primers utilizados fueron 5'2D6*5 y 3'2D6*5 (Steen et al., 1995), que son específicos para determinar la presencia del alelo *CYP2D6*5* (3.5 kb). Las reacciones de amplificación, las condiciones y el análisis del DNA son las mismas que las descritas en la determinación de las multiplicaciones del gen *CYP2D6*.

Tabla 1. Reacciones de amplificación y reamplificaciones realizadas para determinación de las variantes alélicas del *CYP2D6* (Dorado et al, 2005).

Inciadores	Inciadores	Nucleótido	PCR (bp)	Enzima de restricción	Resultados (bp)
PM1,	PM2,				2D6 gene: 5100
2D6dupl-F	2D6dupl-R				*1, *2, *4 xN: 3500
5'2D6*5	3'2D6*5				*5: 3500
5'2D6*3	3'2D6*3	2637	259 or 258	<i>StuI</i>	wt: 227 + 32 *3 : 258
5'2D6*10	3'2D6*10	188 (T)	241	<i>ScaI</i>	wt: 241 *4, *4x2 or *10 : 206 + 35
5'2D6*4	3'2D6*4/*6	1934 (G)	242	<i>PstI</i>	wt: 208 +34 *4 : 242
d5'2D6*6	3'2D6*4/*6	1795	385 or	<i>SpeI</i>	wt: 351 + 34

			384		*6 : 384
5'2D6*17	3'2D6dup	1111 (C)	206	<i>RsaI</i>	wt: 170 + 36
					*17 : 206
5'2D6dup	3'2D6*1xN	4268 (G)	247	<i>BanI</i>	*2x2: 214 + 33
					*1x2 : 247

7.4. Análisis farmacocinético

Los perfiles de declinación de las curvas de concentración plasmática de metoprolol, se construyeron a partir del perfil farmacocinético de las concentraciones plasmáticas obtenidas a diferentes tiempos para cada paciente estudiado, y se obtuvieron las gráficas en función del tiempo en función del tiempo. Los datos experimentales de la población fueron ajustados a través de modelos compartimentales, a un modelo abierto de un compartimiento, MAUC o un modelo abierto de dos compartimientos, MADC (21) empleando las siguientes ecuaciones (Winters.1984):

- MAUC: $C_p = C_{p0} \cdot e^{-k_e \cdot t}$
- MADC: $C_p = A e^{-\alpha \cdot t} + B e^{-\beta \cdot t}$

7.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron a través del software SPSS XII. Se realizó un análisis descriptivo de las variables y se calcularon las medidas de tendencia central y de variabilidad. Dependiendo de la distribución y de la dispersión de los datos, se emplearon las pruebas paramétricas “t de Student para muestras dependientes. En el caso de distribuciones asimétricas se emplearon pruebas no paramétricas, como la prueba Wilcoxon. Además, se realizó un análisis de regresión múltiple entre variables.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con los lineamientos establecidos en la Ley General de Salud los participantes firmaron en forma voluntaria una carta de consentimiento informado. Además se cumplió con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas de Laboratorio y de Investigación (Cristie, 2000). El protocolo fue aprobado por la Comisión de Ética e Investigación del Hospital General de Durango.

9. RESULTADOS

Se estudiaron 11 pacientes (6 hombres y 5 mujeres) con HAS, a petición de 2 voluntarios se les realizó el estudio farmacocinético en una sola ocasión quedando así 10 estudios farmacocinéticos con la dosis matutina, y 10 con la dosis vespertina.

La tabla 2 muestra el promedio $\pm$ DS de la edad para los hombres la cual fue de 46.83 ± 11.8 años y en mujeres de 52 ± 7.4 años; el peso corporal fue de 88 ± 14.72 kg en hombres y 78 ± 4.06 kg en mujeres. Referente a la talla los hombres presentan 1.78 ± 0.05 m y las mujeres 1.60 ± 0.07 m con un valor de $p= 0.0023$ mostrando una diferencia estadísticamente significativa en esta variable. Los valores para el IMC fueron de 27.75 ± 3.86 y de 30.39 ± 3.17 , respectivamente.

**Tabla 2. Comparación de las Variables Biológicas de los Pacientes
Estudiados de acuerdo al género**

variables biológicas	Hombres	Mujeres	p
	N=6	N=5	

EDAD (años)	46.83±11.8	52.6±7.4	0.3718
TALLA (m)	1.78±0.05	1.60±0.07	0.0023*
PESO (kg)	88±14.72	78±4.06	0.1780
IMC (kg/m ²)	27.75±3.86	30.39±3.17	0.1553

• *Diferencias estadísticamente significativas; $p < 0.05$

• Prueba utilizada: t de Student

En la tabla 3 se presentan los valores promedio±DS de los 11 pacientes, con la dosis vespertina la TAS fue de 114 ± 12.26 mmHg, la TAD, de 73 ± 7.65 mmHg y la FC de 68.8 ± 11.79 latidos/min. En el turno matutino la TAS fue 114 ± 13.81 , y la TAD de 73 ± 6.5 mmHg, mientras que los valores de la FC fueron de 63.7 ± 9.64 latidos/min.

Tabla 3. Comparación de las Variables Biológicas TA sistólica, Ta diastólica y FC de los Pacientes Estudiados

variables biológicas	Dosis		P
	Matutina	vespertina	
TAS	114 ± 13.81	114 ± 12.26	0.9524*
TAD	73 ± 6.5	73 ± 7.65	0.8646*
FC	63.7 ± 9.64	68.8 ± 11.79	0.0121*♦

* Prueba utilizada: t de Student

♦ Diferencias estadísticamente significativas; $p < 0.05$

Los valores anteriores reflejan el promedio $\pm$ DS de los valores de la TA de las 9 mediciones al día que se le realizó a cada paciente; cabe hacer notar que el valor máximo de presión arterial en el turno vespertino fue de 166 mmHg de TAS y de 108 mmHg de TAD a las 4 hrs post-dosis, la FC más alta encontrada fue de 112 latidos/min; después de la dosis matutina la máxima TAS y TAD fue de 150/93 mmHg respectivamente y la máxima FC fue de 85 latidos/min. En la dosis vespertina la TAS y TAD mínima fue de 89/54 mmHg respectivamente, y la FC mínima fue de 48 latidos/min. Con la administración de la dosis matutina la TA sistólica/diastólica mínima correspondió a valores de 89/64 mm de Hg, y la FC de 41 latidos/min.

Cabe mencionar que si bien las diferencias en los promedios de las presiones arteriales de los 20 estudios realizados a los 11 pacientes, no son estadísticamente significativas entre la dosis matutina y la vespertina con excepción de la FC ($p=0.0121$), la significancia biológica y clínica como lo demuestran los resultados individuales son de suma importancia en virtud del efecto de las concentraciones de metoprolol y la respuesta terapéutica.

Diagnósticos y Terapia Concomitante

Los pacientes estudiados presentaron diferentes diagnósticos clínicos además de la hipertensión arterial sistémica. Como puede verse en la tabla 4, solamente 3 pacientes presentaron HAS como única enfermedad presente.

Así mismo, en la tabla 5 se puede observar que sólo un paciente (sujeto 8) utilizaba metoprolol como único medicamento; 5 pacientes emplearon otro medicamento como terapia antihipertensiva (pacientes 1,4,5,7,10) y 7 pacientes, medicamentos concomitantes de otro tipo (2,3,4,6,7,9,11).

Tabla 4. Diagnósticos Clínicos de los Pacientes Estudiados

Paciente	Diagnóstico clínico
1	Hipertensión arterial sistémica
2	Hipertensión arterial sistémica Hipercolesteronemia Onicomycosis Gastritis Hipertensión arterial sistémica Diabetes tipo 2
4	Hipertensión arterial sistémica IAM previo Hipercolesteronemia
5	Hipertensión arterial sistémica
6	Hipertensión arterial sistémica Diabetes tipo 2
7	Hipertensión arterial sistémica
8	Hipertensión arterial sistémica Taquicardia paroxística
9	Hipertensión arterial sistémica

Tabla 5. Relación de Terapia Antihipertensiva y Medicamentos Concomitantes de los Pacientes Estudiados

Paciente	Terapia Antihipertensiva	Otros Medicamentos
1	Enalapril, metoprolol	
2	Metoprolol	Pravastatina, bezafibrato, itraconazol, ranitidina, imipramina, diclofenaco
3	Metoprolol	Rozigitazona, metformina, celecoxib
4	Ramipril, furosemida, metoprolol	Isosorbide, AAS clopidogrel, atorvastatina
5	Nimodipino, metoprolol	
6	Metoprolol	Metformina
7	Losartán, metoprolol	AAS
8	Metoprolol	
9	Metoprolol	Omeprazol, ranitidina
10	Telmisartán, metoprolol	
11	Metoprolol	Clopidogrel

Clasificación del comportamiento de la TAS y TAD nocturna.

Como puede observarse en la Tabla 6, del total de pacientes, el descenso esperado por la noche de la (TAS) de un 10-20% (pacientes dipper) en la dosis matutina lo presentaron 3 sujetos, y en la dosis vespertina lo presentaron 6 pacientes. Seis pacientes con la dosis matutina se clasificaron como no dippers (0-10%) y en este mismo rubro en la dosis vespertina solo 2 de ellos. Tres pacientes presentaron un incremento en la TAS por la noche (riser, por arriba del 0 %), uno con la administración de la dosis matutina y dos con la dosis vespertina.

Tabla 6. Relación de Pacientes de Acuerdo a su Clasificación del Ritmo Circadiano de la TAS

	Dosis		
	Matutina	Vespertina	Total
Dipper	3	6	9
No dipper	6	2	8
Riser	1	2	3
Total	10	10	20

$\chi^2 = 10.0$, con 2 grados de libertad
 $P = 0.0067 < 0.01$

En la Tabla 7 se muestra que del total de pacientes, el descenso esperado por la noche de la TAD de 10-20% (pacientes dipper) en la dosis matutina lo presentaron 3 sujetos, y con la dosis vespertina lo presentaron 4 pacientes. Tres pacientes con la dosis matutina se clasificaron como no dippers (0-10%) y en este mismo rubro en la dosis vespertina solo 4 de ellos. Siete pacientes presentaron un incremento en la TAD por la noche (riser, por arriba del 0 %), 4 con la administración de la dosis matutina y 3 con la dosis vespertina.

Tabla 7. Relación de Pacientes de Acuerdo a su Clasificación del Ritmo Circadiano de la TAD

	Dosis		
	Matutina	Vespertina	Total
Dipper	3	3	6
No dipper	3	4	7
Riser	4	3	7
Total	10	10	20

$\chi^2 = 0.583$, con 2 grados de libertad
 $p = 0.7470$

El comportamiento de la TAS se presenta de manera diferente en cada paciente, entre las dosis matutina y vespertina, tal y como se puede ver en la Tabla 8. Ocho pacientes presentaron un porcentaje de disminución de TAS por la noche diferente de acuerdo a dosis horaria matutina o vespertina de metoprolol (1, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11). De estos 8 sujetos, 2 tuvieron un descenso dipper con la dosis matutina y 5 dipper en la dosis vespertina. El paciente 2 presentó un descenso dipper tanto en la dosis matutina como en la vespertina. Además, se presentó un paciente riser con la dosis matutina, el cual en la dosis vespertina fue no dipper (paciente 1). Los pacientes 6 y 7 presentaron un ligero incremento de la TAS con la dosis vespertina, y en la dosis matutina fueron no dipper y dipper, respectivamente.

Tabla 8. Porcentaje de Disminución Nocturna esperado de la TAS y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano

Paciente	Matutino	Disminución de Tas (%)	Vespertino	Disminución de Tas (%)
1	Riser	(+)6.67*	No dipper	4.5
2	Dipper	11.21	Dipper	18.79
3			No dipper	5.25
4	Dipper	19.79		
5	No dipper	6.91	Dipper	13.27
6	No dipper	4.51	Riser	(+)1.54*
7	Dipper	12.93	Riser	(+)2.14*
8	No dipper	2.02	Dipper	14.01
9	No dipper	8.85	Dipper	13.23
10	No dipper	5.85	Dipper	13.79
11	No dipper	5.75	Dipper	14.41
	Mediana	6.91		13.79
	Max	19.79		18.79
	Min	2.02		5.25

* Valores (+) = % de TAS que aumento durante la fase nocturna del estudio

Como se puede observar en la tabla 9, cinco pacientes presentan un porcentaje de disminución de TAD por la noche diferente de acuerdo a dosis horaria matutina o vespertina de metoprolol (2, 6, 7, 8, 11). Por lo tanto de estos 5 sujetos, uno presentó un descenso dipper con la dosis matutina y dos dipper en la dosis vespertina. El paciente 5 presentó un descenso dipper tanto en la dosis matutina como en la vespertina. Cinco pacientes presentaron un incremento riser con la dosis matutina (1, 2, 7, 8, 11) y 3 con la dosis vespertina (1,3, 6). Se hace notar que el paciente 1 presenta un incremento riser similar tanto en la dosis matutina como en la vespertina de la TAD. Los pacientes 9 y 10 presentan un descenso no dipper tanto con la dosis matutina como en la vespertina.

Tabla 9. Porcentaje de Disminución Nocturna Esperado de la TAD y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano

Paciente	Matutino	Disminución de TAD (%)	Vespertino	Disminución de TAD (%)
1	Riser	(+)6.23*	Riser	(+)4.76*
2	Riser	(+)4.66*	Dipper	16.36
3			Riser	(+)22.46*
4	Dipper	17.26		
5	Dipper	13.62	Dipper	18.65
6	Dipper	11.21	Riser	(+)1.78*
7	Riser	(+)10.51*	No dipper	0
8	No dipper	0.91	Dipper	14.65
9	No dipper	5.85	No dipper	8.81
10	No dipper	4.9	No dipper	2.96
11	Riser	(+)9.09*	No dipper	6.55
	Mediana	8.53		7.68
	Max	17.26		18.65
	Min	0.91		2.96

* Valores (+) = % de TAD que aumento durante la fase nocturna del estudio

Clasificación del comportamiento de la TAS y TAD nocturna de acuerdo a grupos de riesgo de cardiopatía

Antes de los 50 años de edad la TAD es un potente factor de riesgo de cardiopatía, mientras que la TAS lo es después de los 50 años de edad

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de disminución nocturna de la TAS y la clasificación de acuerdo al ritmo circadiano de los 6 pacientes con edad >50 años. Únicamente el paciente 2 presenta una disminución dipper en su TAS de la dosis matutina y vespertina. A los pacientes 3 y 4 sólo se les realizó un estudio (vespertino y matutino respectivamente). Los pacientes 5, 6, 7 presentan diferente descenso nocturno de la TAS de acuerdo a la dosis administrada (matutino y vespertino).

Tabla 10. Porcentaje de Disminución Nocturna esperado de la Presión Arterial Sistólica y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano de los Pacientes con Edad Mayor a 50 años

Paciente	Matutino	Disminución de TAS (%)	Vespertino	Disminución de TAS (%)
2	Dipper	11.21	Dipper	18.79
3			No dipper	5.25
4	Dipper	19.79		
5	No dipper	6.91	Dipper	13.27
6	No dipper	4.51	Riser	-1.54
7	Dipper	12.93	Riser	-2.14
	Mediana	11.21		13.27
	Max	19.79		18.79
	Min	4.51		5.25

La importancia de la TAS relacionada al riesgo cardiovascular se complementa con la presión de pulso (diferencia entre TAS y TAD), la cual no debe ser >63 mmHg. La tabla 11 presenta la relación del promedio de la presión de pulso (PP) del grupo de pacientes con edad mayor a 50 años relacionado a su clasificación con el ritmo circadiano.

Tabla 11. Promedio de PP y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano de los Pacientes con edad mayor a 50 años

Paciente	Matutino	Promedio de PP dosis matutina mmHg	Vespertino	Promedio de PP dosis vespertina mmHg
2	Dipper	31.78	Dipper	30.41
3			No dipper	43.44
4	Dipper	39.85		
5	No dipper	53.56	Dipper	48.63
6	No dipper	56.63	Riser	54.44
7	Dipper	37.78	Riser	38.74
	Mediana	39.85		43.44
	Max	56.63		54.44
	Min	31.78		30.41

La tabla 12 presenta el porcentaje de disminución nocturna de la TAD y la clasificación de acuerdo al ritmo circadiano de los pacientes con edad menor a 50 años. Como se observa en dicha tabla, únicamente el paciente 8 con la dosis vespertina presenta un comportamiento dipper de su TAD. Con la dosis matutina se presentaron 3 comportamientos riser (1,2,11) y con la dosis vespertina un riser (1). Dos pacientes presentaron un comportamiento no dipper con la dosis matutina (9, 10) y tres con la dosis vespertina (9, 10, 11).

Tabla 12. Porcentaje de Disminución Nocturna esperado de la Presión Arterial Diastólica y Clasificación de Acuerdo al Ritmo Circadiano de los Pacientes con Edad menor a 50 años

Paciente	Matutino	Disminución de TAD (%)	Vespertino	Disminución de TAD (%)
1	Riser	-6.23	Riser	-4.76
8	Riser	0.91	Dipper	14.65
9	No dipper	5.85	No dipper	8.81
10	No dipper	4.9	No dipper	2.96
11	Riser	-9.09	No dipper	6.55

Intervalo Terapéutico

En cuanto al intervalo terapéutico (25-100 ng/ml) alcanzado por cada sujeto con la administración de la dosis matutina, cabe señalar que sólo cuatro pacientes alcanzaron concentraciones dentro del intervalo terapéutico (ver la tabla 13), y con la dosis vespertina 6 sujetos. Del total de pacientes 2 presentaron niveles subterapéuticos de metoprolol con la dosis matutina, y 3 sujetos con la dosis vespertina. Cuatro pacientes alcanzaron niveles tóxicos de metoprolol con la dosis matutina, y con la dosis vespertina un sujeto presentó niveles por arriba del rango terapéutico.

Tabla13. Clasificación del Rango Terapéutico Alcanzado por la Población Estudiada

Concentraciones	Matutino	Vespertino	Total
Subterapéutica	2	3	5
Terapéutica	4	6	10
Tóxica	4	1	5
Total	10	10	20

$\chi^2 = 10.0$, con 2 grados de libertad

$p = 0.0067$ diferencia significativa

En la tabla 14 se observa que los pacientes 1,5, 7, 8, 9, 10 y 11 presentan el mismo nivel terapéutico tanto en la dosis matutina como en la vespertina. Sin embargo, el comportamiento de la TAS y TAD que se presenta en cada individuo es diferente de acuerdo al momento de la dosis administrada (matutina o vespertina), tal como se comentó en las tablas 7 y 8. Los pacientes 2 y 6 presentan diferentes niveles a diferente momento de la dosis. Se observa una diferencia significativa en el rango terapéutico entre la dosis matutina y vespertina ($p=0.0067$).

Tabla 14. Rango Terapéutico Alcanzado y C_pmax de Metoprolol de los pacientes en Estudio

Pacientes	Matutino	C_pmax	Vespertino	C_pmax
1	Terapéutico	36.977	Terapéutico	57.664
2	Tóxico	121.768	Terapéutico	61.128
3			Sub- terapéutico	15.065
4	Tóxico	136.276		
5	Tóxico	164.161	Tóxico	105.325
6	Tóxico	100.185	Terapéutico	91.236
7	Terapéutico	66.108	Terapéutico	78.33
8	Terapéutico	37.231	Terapéutico	30.184
9	Terapéutico	37.832	Terapéutico	32.89
10	Sub- terapéutico	12.485	Sub- terapéutico	12.85
11	Sub- terapéutico	23.716	Sub- terapéutico	15.888
	Mediana	51.97		45.277
	Max	164.16		105.325
	Min	12.48		12.85

La tabla 15. Muestra la disminución de la TAS nocturna esperada y la Cpmax, Tmax y Cp de la dosis de metoprolol administrada en el estudio matutino. No se presenta una relación concentración efecto, esto se hace evidente en el comportamiento dipper presentado por 3 pacientes, de los cuales dos (2 y 4) presentan niveles por arriba del intervalo terapéutico, y el paciente 7 en niveles terapéuticos de metoprolol. Así mismo, se presentan 6 pacientes con comportamiento no dipper, de los cuales 2 están por arriba del intervalo terapéutico (5,6) , 2 con niveles terapéuticos de metoprolol (8, 9) y 2 por debajo del intervalo terapéutico (10, 11). Se presenta un comportamiento riser con niveles dentro del intervalo terapéutico (1).

Tabla 15. Disminución de la TAS nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano, la Cpmax, Tmax e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol

Paciente	Disminución de la TAS nocturna (%)	Clasificación de TAS de acuerdo a ritmo circadiano	Cpmax ng/ml	Tmax	Intervalo Terapéutico
1	-6.67	Riser	36.977	4	Terapéutico
2	11.21	Dipper	121.768	1	Tóxico
3					
4	19.79	Dipper	136.276	18	Tóxico
5	6.91	No dipper	164.161	18	Tóxico
6	4.51	No dipper	100.185	7	Tóxico
7	12.93	Dipper	66.108	12	Terapéutico
8	2.02	No dipper	37.231	18	Terapéutico
9	8.85	No dipper	37.832	2	Terapéutico
10	5.85	No dipper	12.485	4	Sub-terapéutico
11	5.75	No dipper	23.716	0.5	Sub-terapéutico

La tabla 16 muestra la disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano Cpmax y Tmax de la dosis de metoprolol administrada en el estudio vespertino. No se observó una relación entre el intervalo terapéutico alcanzado por cada paciente y el descenso de la TAS nocturna. Se presentan

comportamientos dipper con niveles de metoprolol por arriba del intervalo terapéutico (paciente 5), y por debajo del nivel terapéutico (pacientes 10,11). De igual manera se presentan dos pacientes con comportamiento riser cuyos niveles de metoprolol se encuentran dentro del intervalo terapéutico.

Tabla 16. Disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano, C_{pmax}, T_{max} e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol en la dosis vespertina

Paciente	Disminución de la TAS nocturna (%)	Clasificación de TAS de acuerdo a ritmo circadiano	C _{max} ng/ml	T _{max}	Intervalo Terapéutico
1	4.5	No dipper	57.664	1	Terapéutico
2	18.79	Dipper	61.128	7	Terapéutico
3	5.25	No dipper	15.065	12	Sub-terapéutico
5	13.5	Dipper	105.325	24	Tóxico
6	-1.54	Riser	91.236	18	Terapéutico
7	-2.14	Riser	78.33		Terapéutico
8	14.01	Dipper	30.184	12	Terapéutico
9	13.23	Dipper	32.89	24	Terapéutico
10	13.79	Dipper	12.85	0.5	Sub-terapéutico
11	14.41	Dipper	15.888		Sub-terapéutico

En la tabla 17 se muestra la disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano, C_{pmax}, T_{max} y C_{pmin} de la dosis de metoprolol administrada en el estudio matutino. Cinco pacientes presentan comportamiento riser, de los cuales 3 presentan concentraciones plasmáticas de metoprolol dentro del intervalo terapéutico (1, 7, 8), un paciente por arriba del intervalo terapéutico (2), y el paciente 11 por debajo del intervalo terapéutico. Se presentan 3 pacientes con

comportamiento dipper, todos con concentraciones de metoprolol por arriba del intervalo terapéutico (4,5,6).

Tabla 17. Disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano, C_{pmax}, T_{max} e intervalo terapéutico de la dosis de metoprolol en la dosis matutina

Paciente	Disminución de la TAD nocturna (%)	Clasificación de TAD de acuerdo a ritmo circadiano	C _{pmax} ng/ml	T _{max}	Intervalo Terapéutico
1	-6.23	RISER	36.977	4	Terapéutico
2	-4.66	RISER	121.768	1	Tóxico
4	17.26	DIPPER	136.276	18	Tóxico
5	13.62	DIPPER	164.161	18	Tóxico
6	11.21	DIPPER	100.185	7	Tóxico
7	-10.51	RISER	66.108	12	Terapéutico
8	0.91	RISER	37.231	18	Terapéutico
9	5.85	NO DIPPER	37.832	2	Terapéutico
10	4.9	NO DIPPER	12.485	4	Subterapéutico
11	-9.09	RISER	23.716	0.5	Subterapéutico

Finalmente en la Tabla 18 se presenta la disminución de la TAD de acuerdo al ritmo circadiano y las concentraciones de metoprolol (C_{pmax}, C_{pmin}) de la dosis vespertina. Se observaron 3 comportamientos dipper, dos de los cuales presentaron concentraciones plasmáticas de metoprolol dentro del intervalo terapéutico (2, 8) y uno por arriba del intervalo terapéutico (5). Tres pacientes tuvieron comportamiento riser, dos con concentraciones dentro del intervalo terapéutico (1, 6), y un paciente por debajo del nivel terapéutico (3). Cuatro pacientes presentan comportamiento no dipper, dos de ellos con concentraciones

de metoprolol dentro del intervalo terapéutico (7, 9) y dos por debajo del intervalo terapéutico (10, 11).

Tabla 18. Disminución de la TAD nocturna esperada de acuerdo al ritmo circadiano, C_{pmax}, T_{max} e intervalo terapéutico de la dosis vespertina de metoprolol

Paciente	Disminución de la TAD nocturna (%)	Clasificación de TAD de acuerdo a ritmo circadiano	C _{pmax} ng/ml	T _{max}	Intervalo terapéutico
1	-4.76	RISER	57.664	1	Terapéutico
2	16.36	DIPPER	61.128	7	Terapéutico
3	-22.46	RISER	15.065	12	Terapéutico
5	18.65	DIPPER	105.325	24	Tóxico
6	-1.78	RISER	91.236	18	Terapéutico
7	0	NO dIPPER	78.33	1	Terapéutico
8	14.64	DIPPER	30.184	12	Terapéutico
9	8.81	NO dIPPER	32.89	24	Terapéutico
10	2.96	NO dIPPER	12.85	0.5	Subterapéutico
11	6.55	NO dIPPER	15.888		Subterapéutico

En la Tabla 19 se presentan los parámetros farmacocinéticos del metoprolol, obtenidos después de la dosis matutina de los paciente 1, 6, y 7, los cuales se ajustaron a un Modelo Abierto de Un Compartimento (MAUC), empleando el Software WINONLINE; únicamente el paciente 6 presentó un tiempo lag, T_{lag}. Sin embargo en el paciente 2 los datos farmacocinéticos se obtuvieron al ajustarse los datos a un Modelo Abierto de Dos Compartimientos, MADC, ya que en éste caso se obtuvieron tanto el $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$.

Tabla 19. Parámetros Farmacocinéticos de Metoprolol Después de la Dosis Matutina

	*Cpmax	*Tmax	*t_{1/2el}	*ABC	**t_{1/2α}	**t_{1/2β}	*CL/F	*Vd/F	Tlag
Paciente	(ng/mL)	(h)	(h)	(ng/mL/h)			(mL/h/kg)	(L/Kg)	(h)
1	35.97	6.19	4.29	605.93			0.1567	0.921	
2	119.9	1.2		4788.3	1.55	52.8	0.0198	0.4	
6	106.38	9.35	6.39	2669.8			0.0355	0.3285	0.122
7	70	9.62	6.67	1834.5			0.0517	0.498	
Mediana	88.19	7.77	6.39	2252.15			0.0436	0.449	
Valor máximo	119.9	9.62	6.67	4788.3			0.1567	0.921	
Valor mínimo	35.97	1.2	4.29	605.93			0.0198	0.3285	

En la Tabla 20 se presentan los parámetros farmacocinéticos del metoprolol, obtenidos después de la dosis vespertina de los paciente 1, 2, 6, y 8, los cuales se ajustaron a un MAUC. Mientras que en el paciente 7 los datos farmacocinéticos se obtuvieron al ajustarse los datos a un MADC.

Tabla 20. Parámetros Farmacocinéticos de Metoprolol Después de la Dosis Vespertina

Paciente	*Cpmax (ng/mL)	*Tmax (hrs)	*t _{1/2} el (hrs)	*ABC (ng/mL/hr)	**t _{1/2} α	**t _{1/2} β	*CL/F (mL/h/kg)	*Vd/F (L/Kg)
1	34.16	7.14	5.13	687.28			0.1382	1.022
2	48.9	6.9	4.78	919.4			0.103	0.7134
6	77.1	2.76	1.91	580.6			0.1636	0.452
7	77.88	1.25		557.1	1.79	11.26	0.1705	0.8117
8	21.87	9.17	6.36	545.9			0.174	2.243
Mediana	48.9	6.9	4.955	580.6			0.1636	0.8117
Valor máximo	77.88	9.17	6.36	919.4			0.174	2.243
Valor mínimo	21.87	1.25	1.91	545.9			0.103	0.452

En la Tabla 21 se observa las diferencias entre cada uno de los parámetros farmacocinéticos del metoprolol entre las dosis matutina y vespertina.

Son evidentes las diferencias entre Cpmax las cuales son significativamente más elevadas durante la dosis matutina (88.19 vs 48.9 ng/mL respectivamente). El Tmax es discretamente más retardada en los pacientes con dosis matutina con 7.77 h vs 6.9 h con la dosis vespertina al igual que el t_{1/2}el con 6.39 h vs 4.95 h respectivamente, diferencias que son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). El área bajo la curva (ABC), también presenta diferencias significativas ya que los valores son elevados con la dosis matutina 2252.15 vs 580.6 de la dosis vespertina. Así mismo la depuración del metoprolol fue más elevada durante la dosis vespertina que durante la dosis matutina (0.163 vs 0.0436 mL/h/kg respectivamente) con un valor de $p \leq 0.05$. El volumen de distribución Vd/F el doble con la dosis vespertina que con la dosis matutina (0.812 vs 0.449 L/ kg, respectivamente).

Tabla 21.- Comparación de las Medianas, los Valores Máximos y Mínimos de los Parámetros Farmacocinéticos de Metoprolol, entre la Dosis matutina y Vespertina.

Parámetros Farmacocinéticos	Dosis	
	Matutina N=4	Vespertina N=5
*Cpmax (ng/mL)	88.19 (35.97-119.9)	48.9 (21.87-77.88)
*Tmax (h)	7.77 (1.2-9.62)	6.9 (1.25-9.17)
*t1/2el (h)	6.39 (4.29-6.67)	4.955 (1.91-6.36)
*ABC (ng/mL/h)	2252.15 (605.93-4788.3)	580.6 (545.9-919.4)
*CL/F (mL/h/kg)	0.0436 (0.0198-0.1567)	0.163 (0.103-0.174)
*Vd/F (L/Kg)	0.449 (0.3285-0.921)	0.811 (0.452-0.103)

Reacciones Adversas

El paciente 1 refirió mareo nocturno con la administración de la dosis vespertina. Cinco pacientes (5, 7, 8, 9, 10) refirieron pesadillas con la administración vespertina.

Relación Farmacocinética/ Farmacodinámica

De manera general, la farmacocinética de metoprolol fue la siguiente: se observaron concentraciones plasmáticas de metoprolol más altas con la dosis matutina que en la vespertina; además, el 78% de los pacientes presenta una absorción más lenta con la dosis matutina, con una eliminación más lenta del metoprolol.

Los diferentes sujetos presentan picos y llanos en su cinética de absorción en uno de los dos estudios (vespertino- matutino), o en ambos, a excepción de un paciente que lo presenta, éste alcanzó concentraciones subterapéuticas en ambos estudios.

Características farmacocinéticas por paciente.

En las figuras 1 y 2 se puede observar que el paciente 1 alcanza concentraciones plasmáticas de metoprolol más altas con la dosis vespertina, con picos y valles en la cinética de absorción. La C_{pmax} presenta una estrecha relación con la TAS y TAD, las cuales son más bajas a lo largo de las 24hrs del estudio que en la dosis matutina. Cabe señalar que la eliminación del metoprolol es similar en ambas etapas del estudio. No se encontró relación entre las concentraciones de metoprolol y la dieta. Existe una mayor relación PK-PD con la dosis matutina. Con ambas dosis, la TAS y FC se encontraron en valores normales, sin embargo, la TA es más baja con la dosis vespertina. Llama la atención que con la dosis matutina la FC presenta cifras de bradicardia (41 latidos/min) cuando teóricamente el ritmo circadiano de la TA y FC en ese período de tiempo (6:00am-12:00) aumenta sus niveles, lo cual está relacionado con la mayor concentración plasmática de metoprolol en ese período.

Figura 1. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 1, dosis matutina.

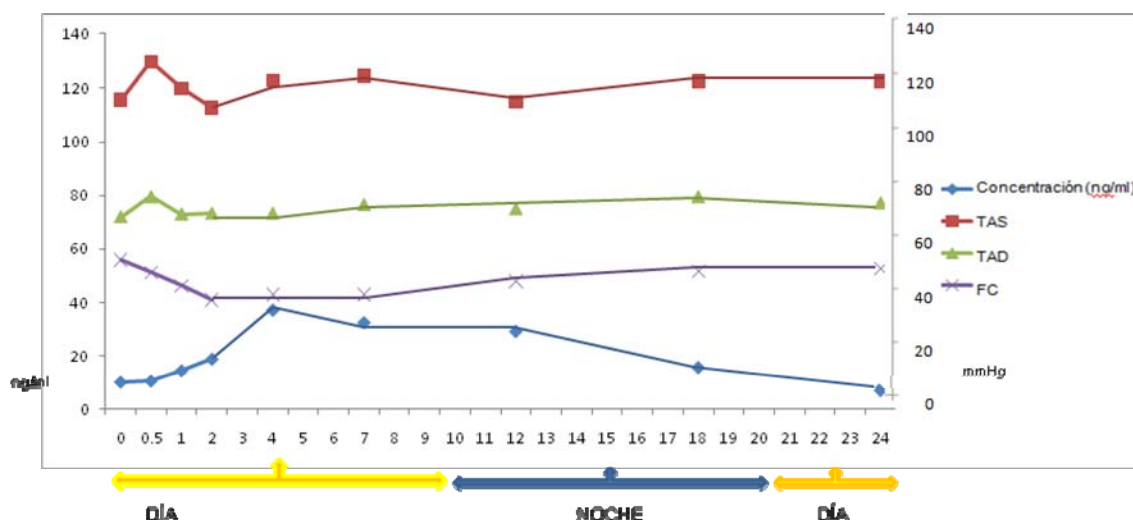
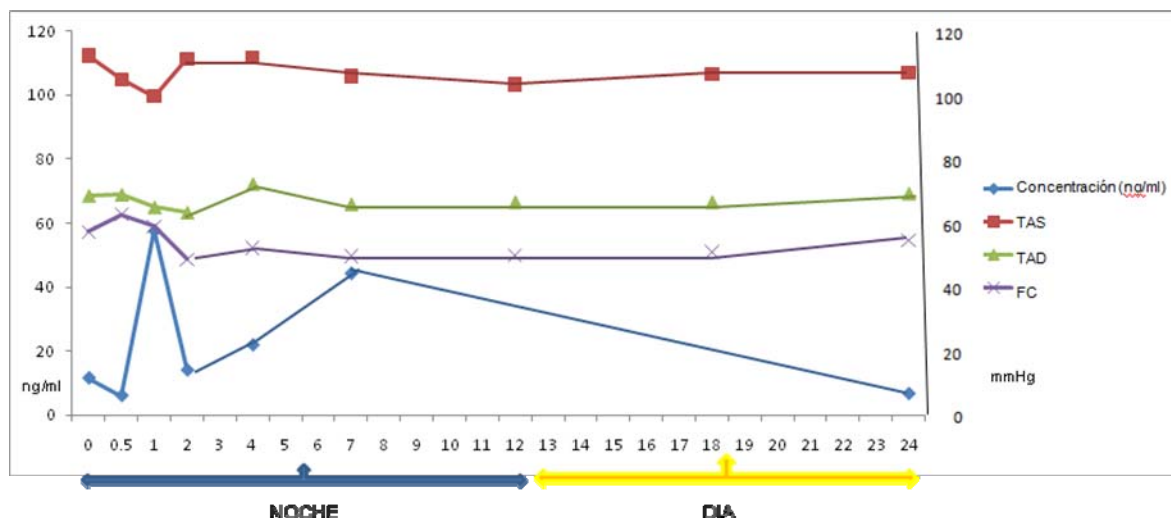


Figura 2. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 1, Dosis Vespertina.



El paciente 2 (ver la figura 3 y 4), también presentó concentraciones más altas de metoprolol con la dosis matutina, con valles y picos durante la absorción. No hay una relación evidente de la dieta con las concentraciones de metoprolol. No se encuentra una relación PK-PD en la dosis matutina de la TA, mas no así con la FC, a diferencia de la dosis vespertina. El ritmo circadiano de la TA y FC (fue el esperado por la noche y se eleva por la mañana) se presenta más claro en dosis vespertina, sin embargo presenta TA y FC más altas con la dosis vespertina aunque en niveles normales).

Figura 3. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 2, Dosis Matutina.

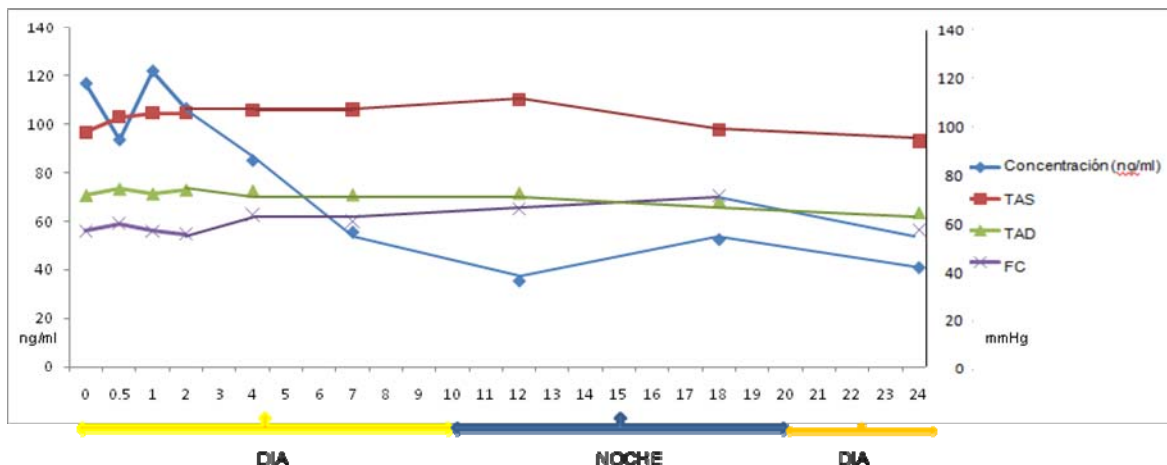
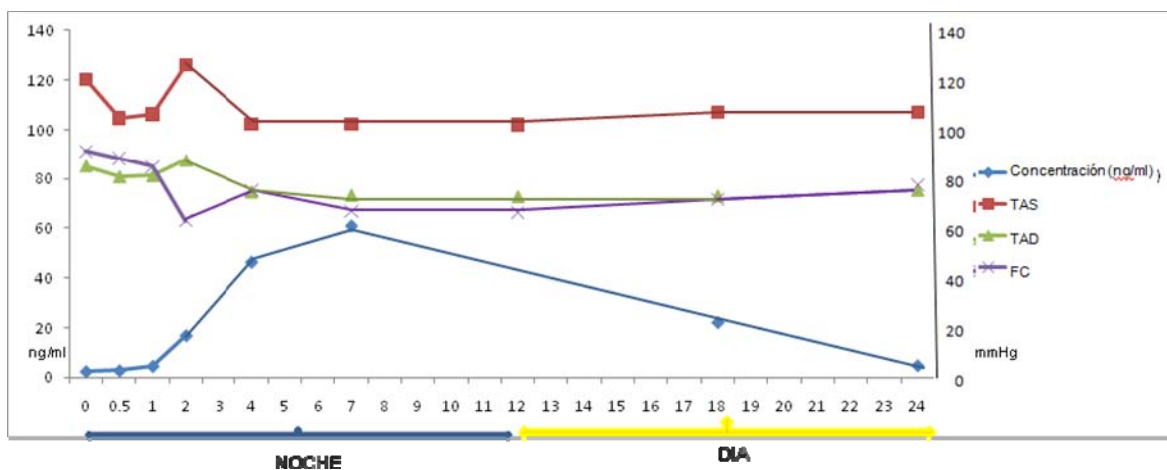
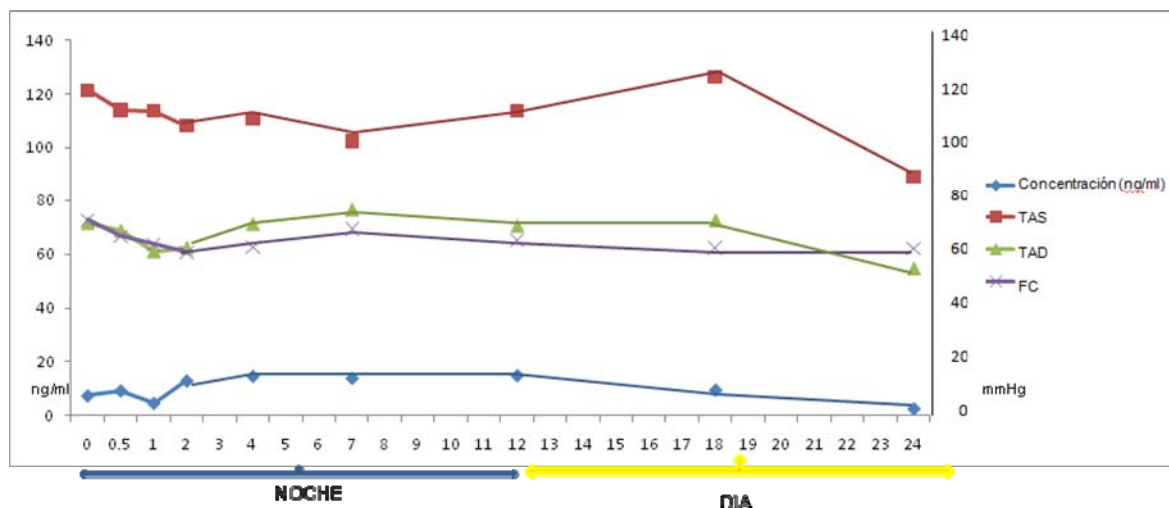


Figura 4. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 2, Dosis Vespertina.



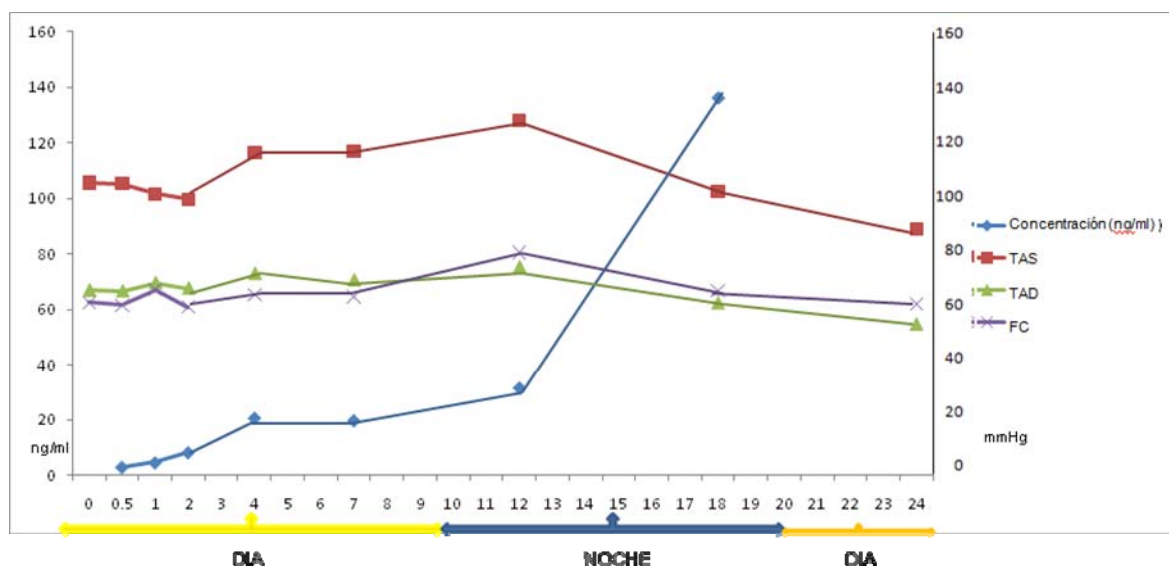
Al paciente 3 se le realizó sólo el estudio vespertino (Figura 5) el cual presenta concentraciones subterapéuticas de metoprolol con una C_{pmax} de 15ng/ml y C_{pmin} de 2ng/ml. La variación de la TAS en 24 hrs en esta dosis parece más relacionada al propio ritmo circadiano más que a las concentraciones de metoprolol.

Figura 5. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 3, Dosis Vespertina.



Al paciente 4 (Figura 6) únicamente se le realizó el estudio matutino. Presenta niveles subterapéuticos de las concentraciones plasmáticas de metoprolol hasta las 12 hrs después de la dosis administrada; en este tiempo la concentración de metoprolol se eleva hasta alcanzar 137ng/ml, cifra por arriba del rango terapéutico. En este momento se observó que la concentración de metoprolol se relacionó con el efecto hipotensor, ya que el descenso de la TA nocturno coincidió con la máxima concentración alcanzada en este periodo.

Figura 6. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 4, Dosis Matutina.



El paciente 5 presenta concentraciones plasmáticas de metoprolol más altas con la dosis matutina que con la vespertina (Figuras 7 y 8). En ambos estudios presenta picos y valles de concentraciones de metoprolol, además de un rápido incremento en la cinética de absorción a las 12 horas post-dosis (dosis matutina) y 18 horas post-dosis (dosis vespertina), alcanzando concentraciones por arriba del intervalo terapéutico en ambas ocasiones. La TA fue más alta con la dosis matutina a pesar de que fueron más elevadas las concentraciones plasmáticas de metoprolol. EL ritmo circadiano de la TA esperado, es decir el descenso circadiano de la TA por la noche así como su incremento paulatino a partir de las 6 de la mañana, se presenta correctamente en ambos días.

Figura 7. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 5, Dosis Matutina.

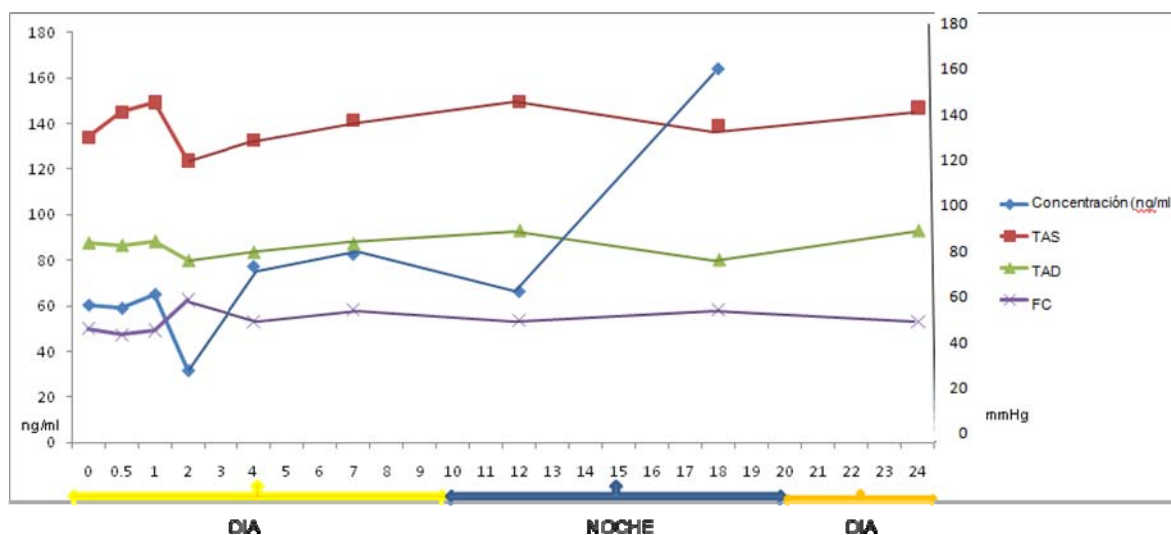
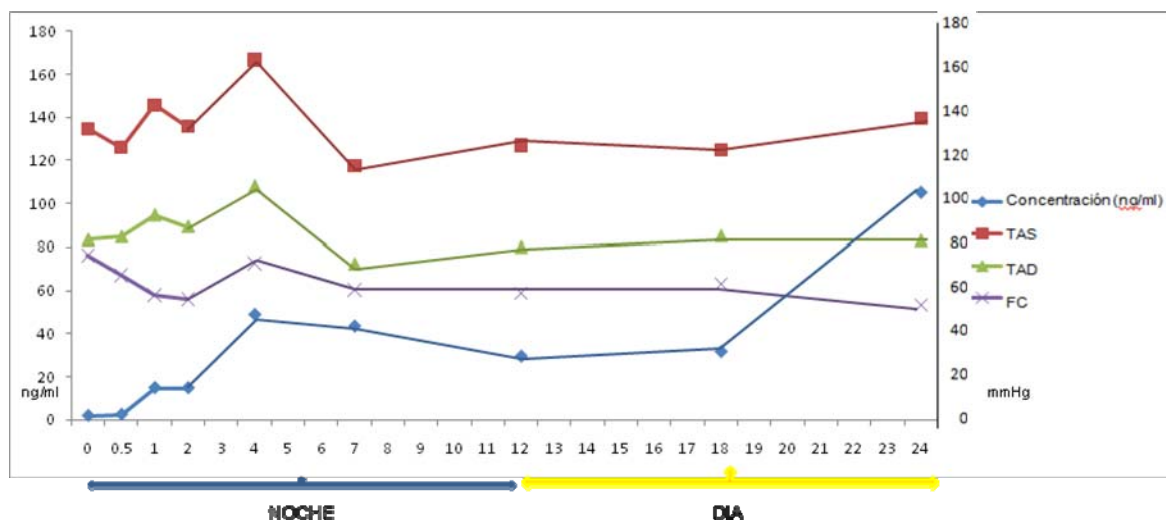


Figura 8. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 5, Dosis Vespertina.



El paciente 6 presenta concentraciones plasmáticas de metoprolol más altas con la dosis matutina, y una eliminación más lenta que con la dosis vespertina. Este paciente, por equivocación propia refiere haber tomado una dosis de 100 mg de tartrato de metoprolol 12hrs después de la dosis vespertina correspondiente al estudio. Presenta picos y valles con ambas dosis, y un adecuado manejo de la TA

a pesar de haber tomado una segunda dosis de metoprolol en el estudio vespertino. El ritmo circadiano de la presión arterial se presenta más claro con la dosis matutina.

Figura 9. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 6, Dosis Matutina.

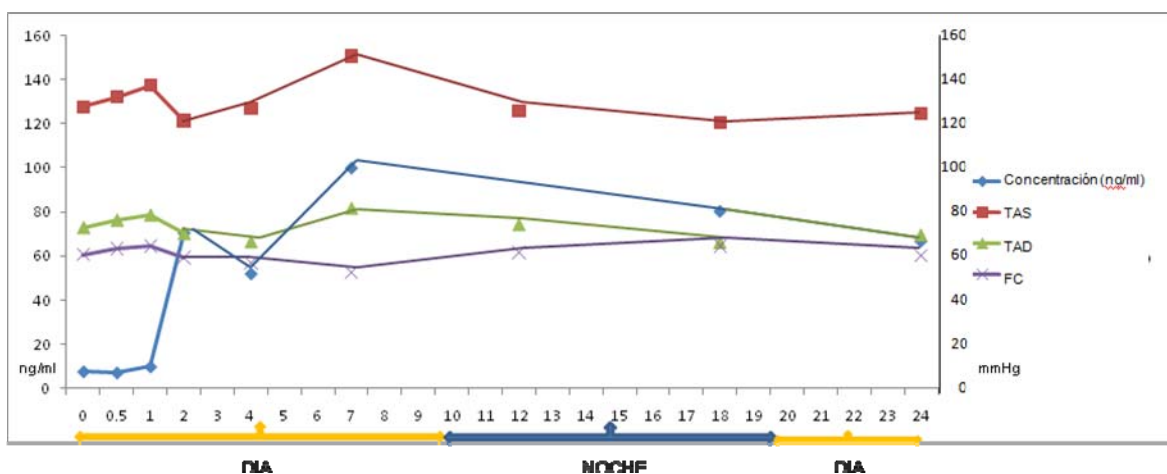
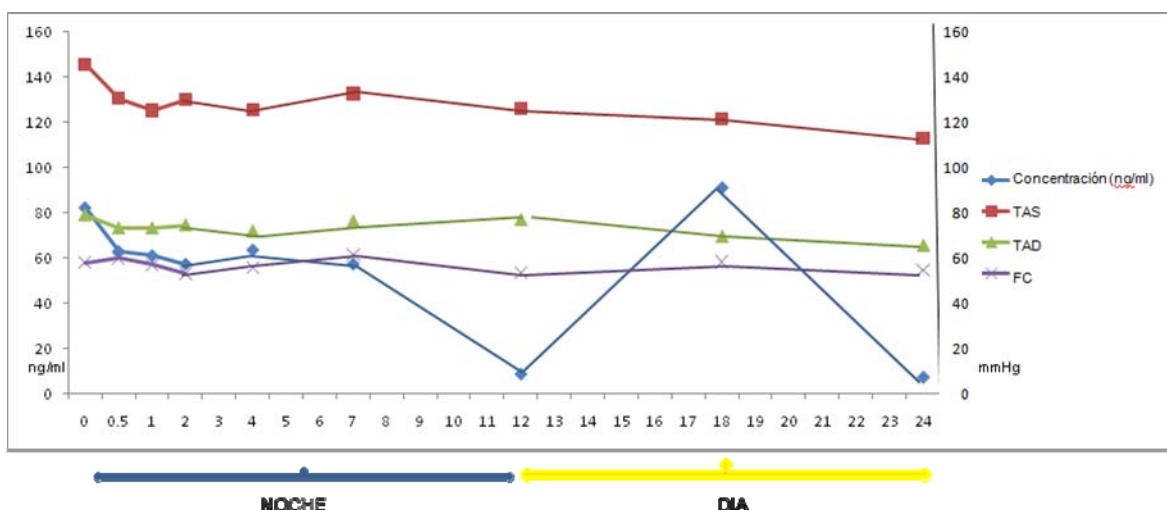


Figura 10. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 6, Dosis Vespertina.



El paciente 7 (ver la Figura 11) presenta concentraciones plasmáticas de metoprolol más elevadas con la dosis matutina. Presenta picos y valles durante la absorción por la mañana. En éste paciente se observó una relación PK-PD en ambos estudios. Con la dosis vespertina presenta una cinética de absorción y eliminación más rápida que la observada en el estudio matutino.

Figura 11 Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 7, Dosis Matutina.

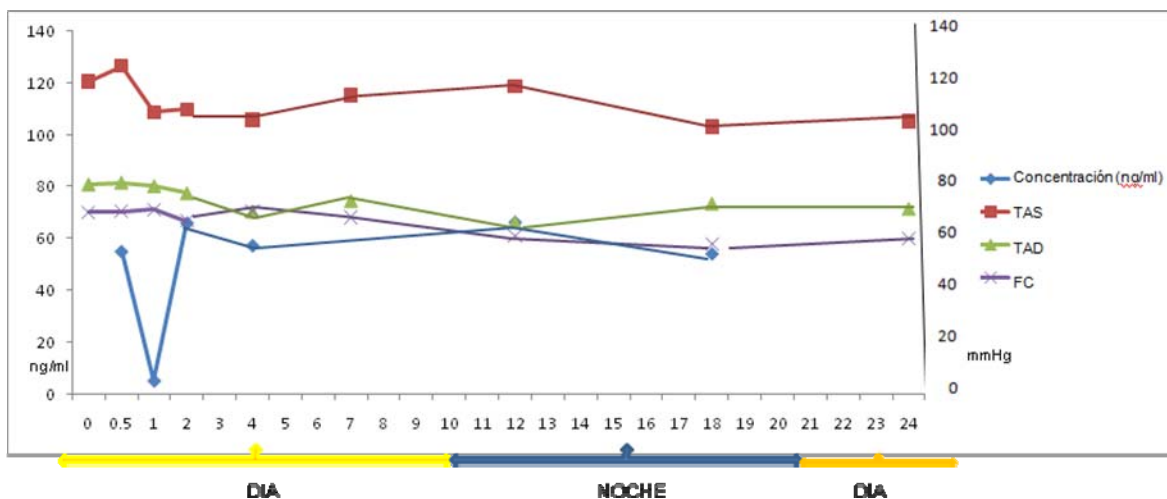
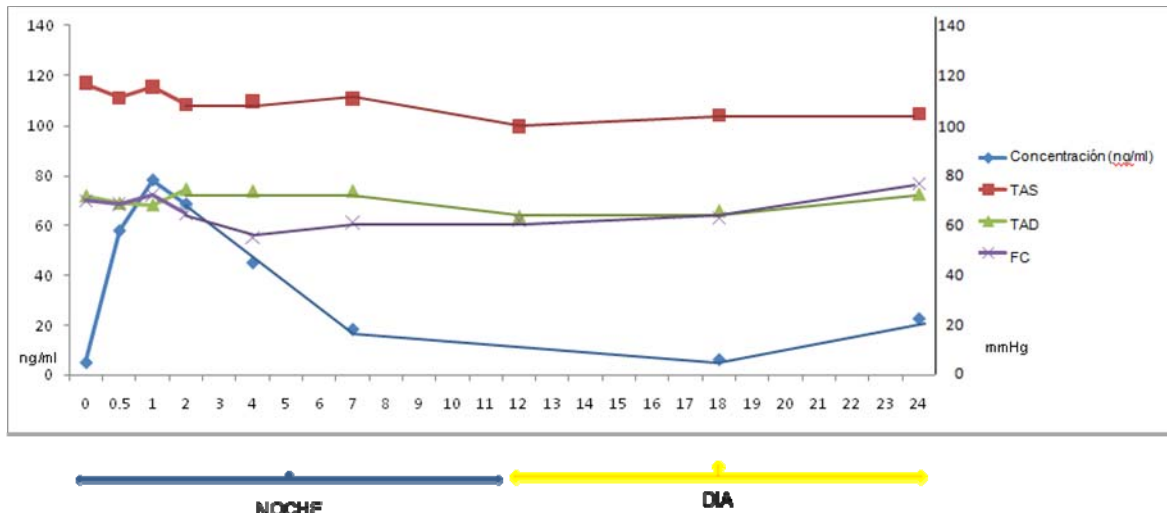


Figura 12. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 7, Dosis Vespertina.



El paciente 8 en ambos estudios mostró concentraciones de metoprolol dentro del rango terapéutico (Figuras 13 y 14). Sin embargo, es evidente que la absorción en el estudio matutino es más retardada. En ambos estudios existe una relación

PK/PD. En el estudio vespertino presenta fluctuaciones con picos y valles en la cinética de absorción. Este paciente presenta un adecuado control de la TA y FC en ambos estudios, sin embargo en el vespertino presenta un mayor descenso de la TA por la noche

Figura 13. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 8, Dosis Matutina.

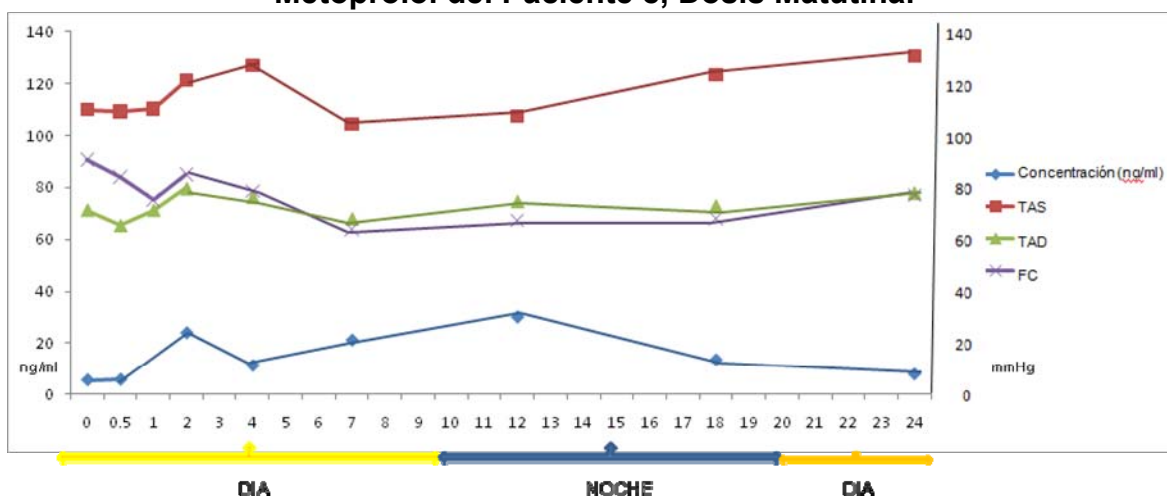
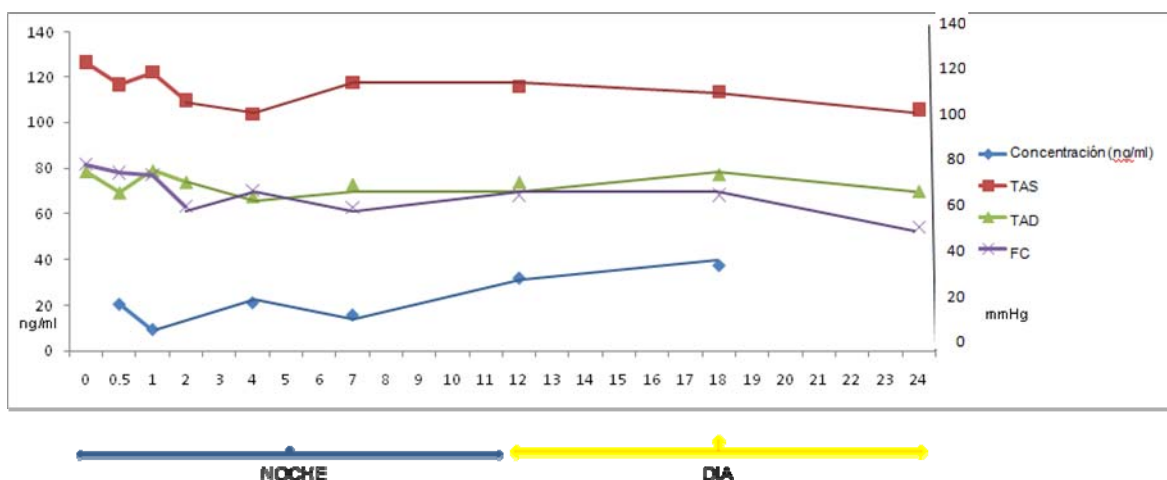


Figura 14. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 8, Dosis Vespertina.



El paciente 9 (Figuras 15 y 16) presenta una absorción y una eliminación más rápida con la dosis matutina. En ambos estudios alcanzó concentraciones plasmáticas máximas al mismo Tmax (4 hrs). No existe relación PK/PD en ninguno de los dos estudios realizados a este paciente. La relación PK/PD de la FC fue más evidente con la dosis vespertina, sin embargo, la taquicardia presentada por el paciente al inicio del estudio vespertino (112 latidos/min) y su disminución paulatina, no se relacionaron con la concentración plasmática de metoprolol en las primeras 2 hrs, ya que se encuentra dentro de un rango subterapéutico. Es a las 4 hrs post-dosis en el estudio matutino cuando ocurre una disminución notable de la FC correlacionada con la Cpmax de metoprolol. Tanto en el estudio matutino como en la administración vespertina, el ritmo circadiano de la TA no se hace presente.

Figura 15. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 9, Dosis Matutina.

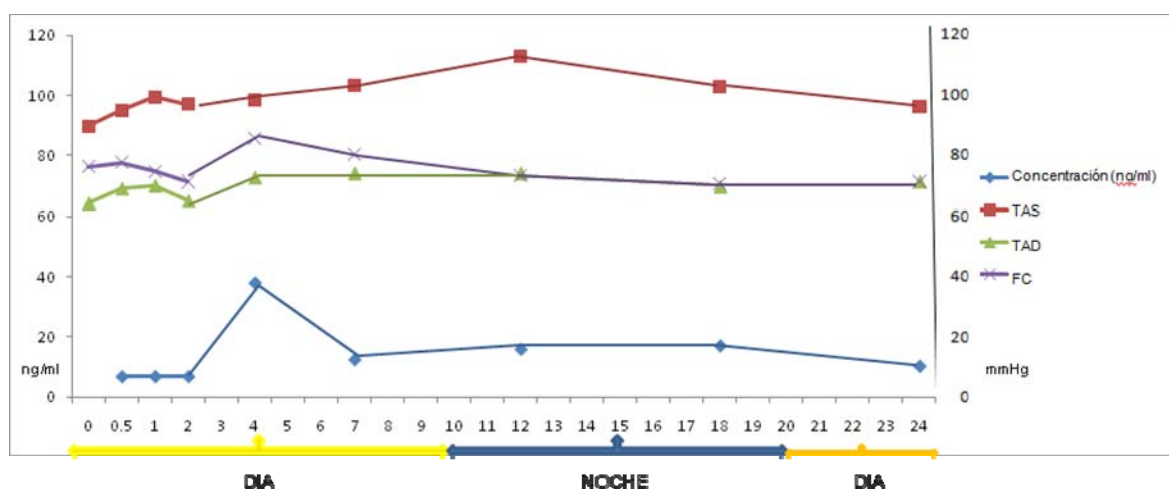
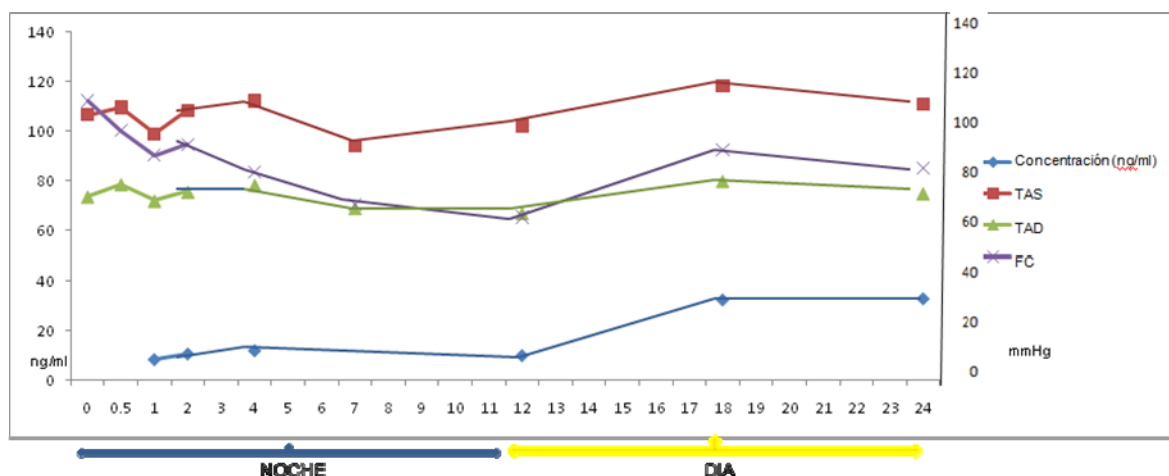


Figura 16. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 9, Dosis Vespertina.



En las Figuras 17 y 18 se observa que el paciente 10 presenta en ambos estudios concentraciones subterapéuticas de metoprolol, lo cual refleja la nula relación PK/PD de la TA y FC en ambos estudios. Durante el estudio matutino la variabilidad de cifras de TA y FC del paciente son mínimas. El ritmo circadiano de la TA se hace un poco más evidente durante la dosis vespertina. Las cifras tensionales con valores normales posiblemente son consecuencia de la administración de medicamento concomitante para tratamiento de hipertensión arterial (telmisartán). La cinética de absorción y eliminación son similares en ambos estudios.

Figura 17. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 10, Dosis Matutina.

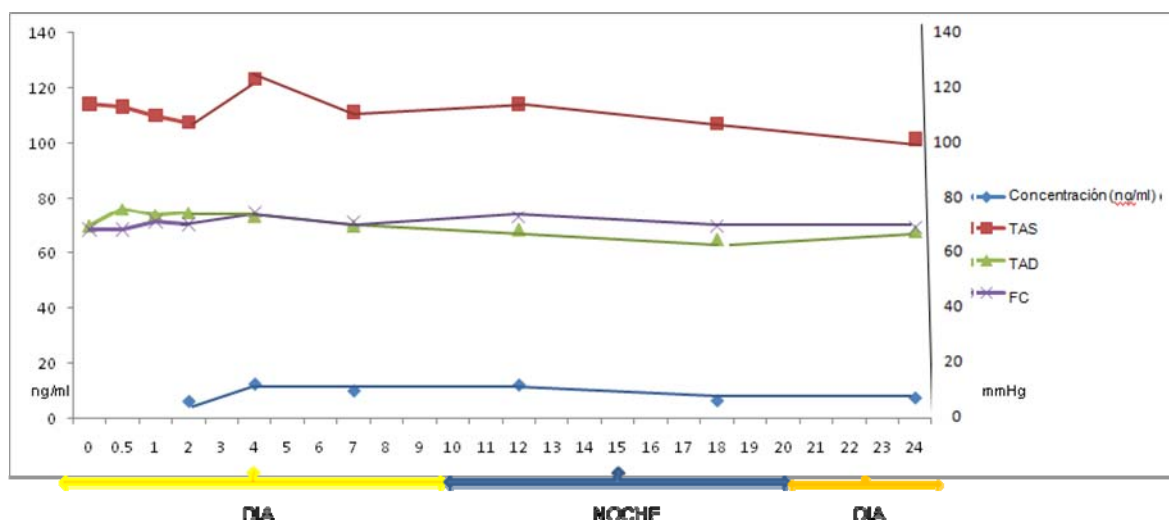
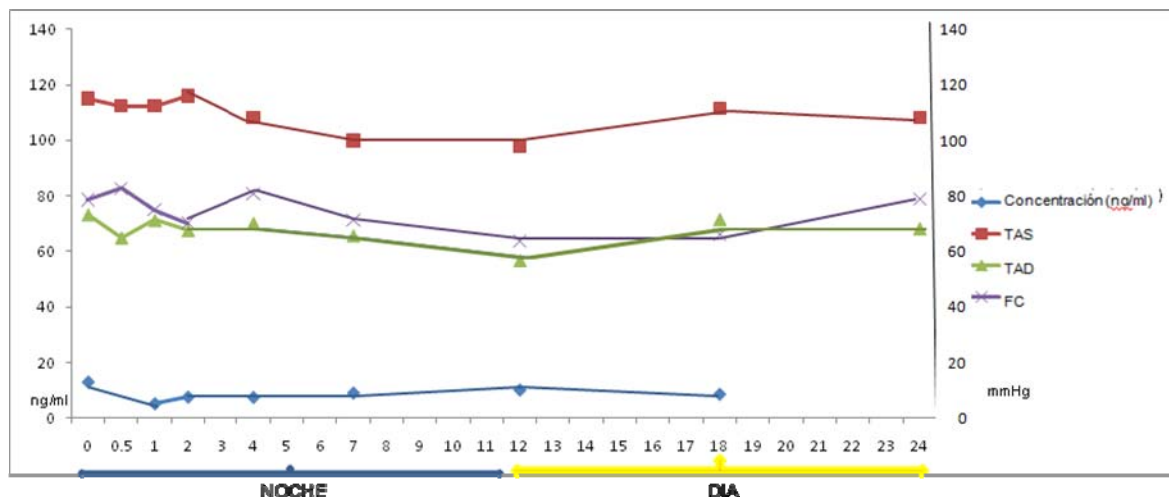


Figura 18. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 10, Dosis Vespertina.



En las Figuras 19 y 20 se presentan los resultados del paciente 11 a quién se le realizó únicamente el estudio vespertino completo. En el estudio vespertino sólo presenta una concentración plasmática de metoprolol debido a la imposibilidad de extraer más muestras sanguíneas. En el estudio matutino hay una escasa relación PK-PD de la TA, con la excepción de la FC.

Figura19. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 11, Dosis Matutina.

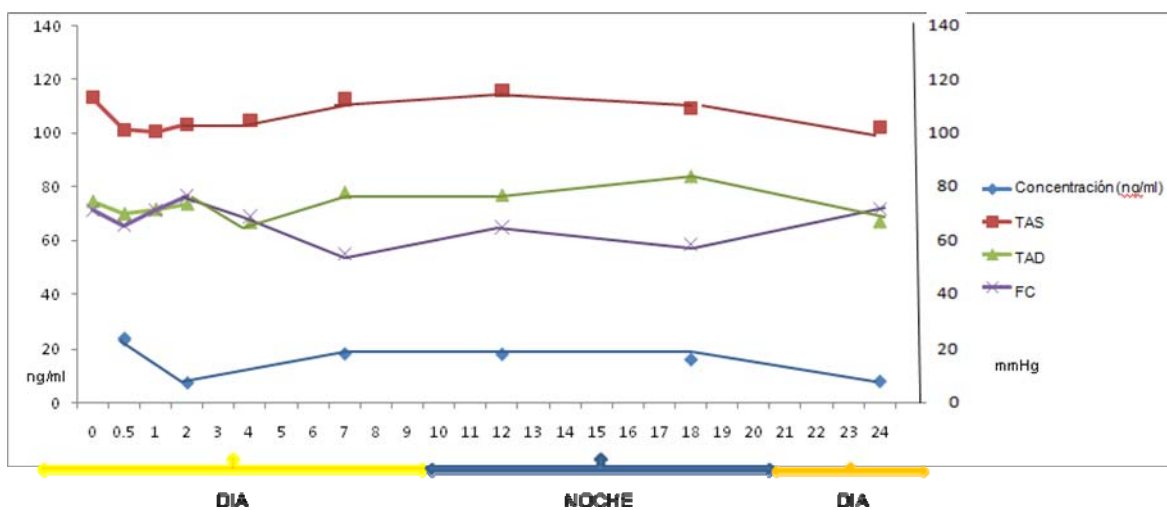
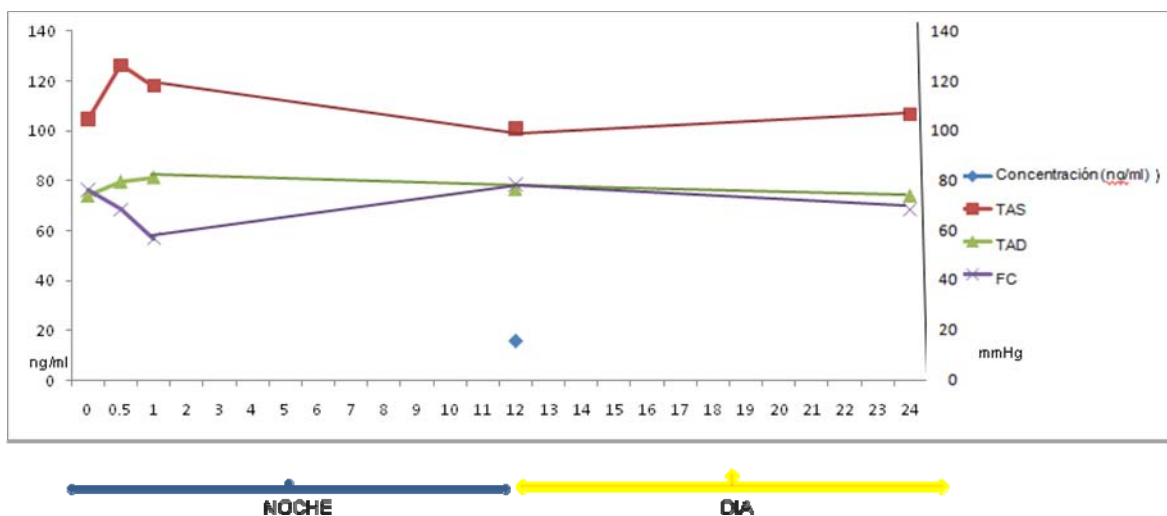


Figura 20. Evolución de TAS, TAD, FC y Concentración Plasmática de Metoprolol del Paciente 11, Dosis Vespertina.



Comparación de pacientes que utilizan medicamentos antihipertensivos concomitantes con pacientes que solo utilizan metoprolol.

En la Tabla 22 muestra que 5 pacientes utilizaron un medicamento antihipertensivo concomitante, contra 6 pacientes que solo utilizaron metoprolol. Las variables biológicas edad, talla, peso e IMC no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

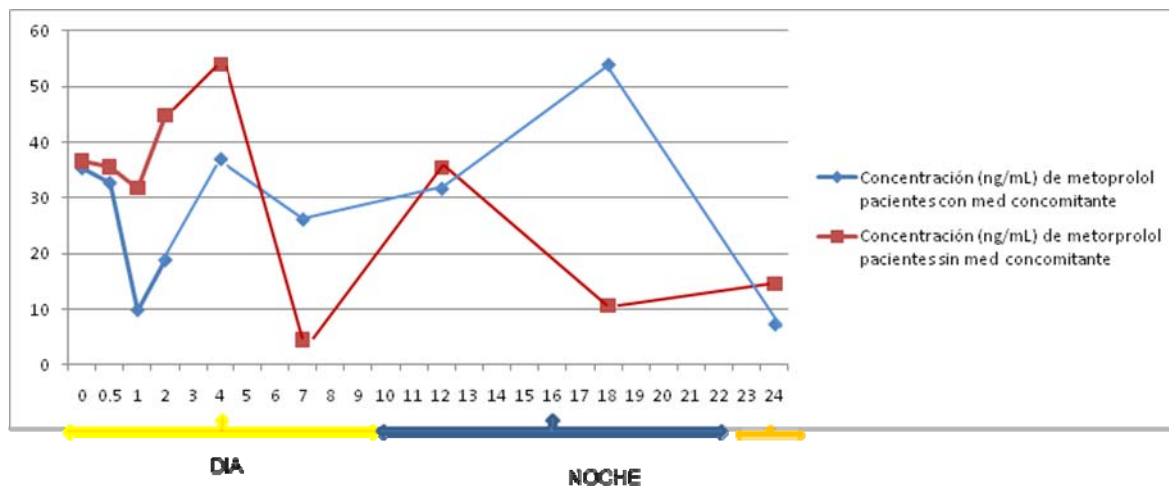
Tabla 22. Comparación de las Variables Biológicas de los Pacientes con y sin Medicamento Antihipertensivo concomitante

Variables biológicas	Sin medicamento concomitante N=6	Con medicamento concomitante N=5	T	p
EDAD (años)	50±12	48.8±8.5	0.18	0.85
TALLA (m)	1.70±0.09	1.70±0.14	1.69	0.95
PESO (kg)	79±10.24	88.8±12.62	-1.4	0.187
IMC (kg/m ²)	27.47±3.52	30.74±3.26	-1.5	0.147

• Prueba utilizada: t de Student

En la Figura 25 se muestra la comparación de las concentraciones plasmáticas de metoprolol de los pacientes con y sin medicamentos concomitantes, en la dosis matutina. Aunque la mediana no presenta diferencias significativas, se puede observar que durante la noche los pacientes con terapia concomitante presentaron concentraciones más altas de metoprolol (18 hrs post-dosis). El resto de los pacientes mostraron concentraciones que presentan picos y valles muy similares a diferentes niveles.

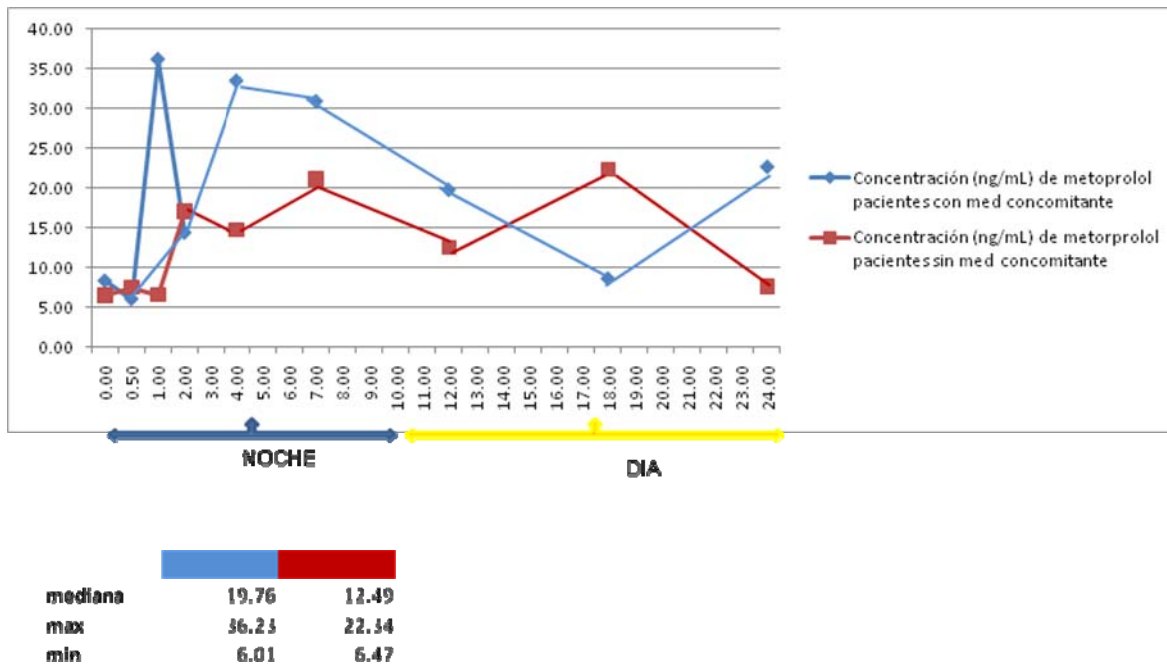
Figura 25. Comparación de las Concentraciones Plasmáticas de Metoprolol de los Pacientes con y sin Medicamento Concomitante Antihipertensivo en la Dosis Matutina.



mediana	28.86	30.79
max	53.99	54.23
min	7.22	9.63

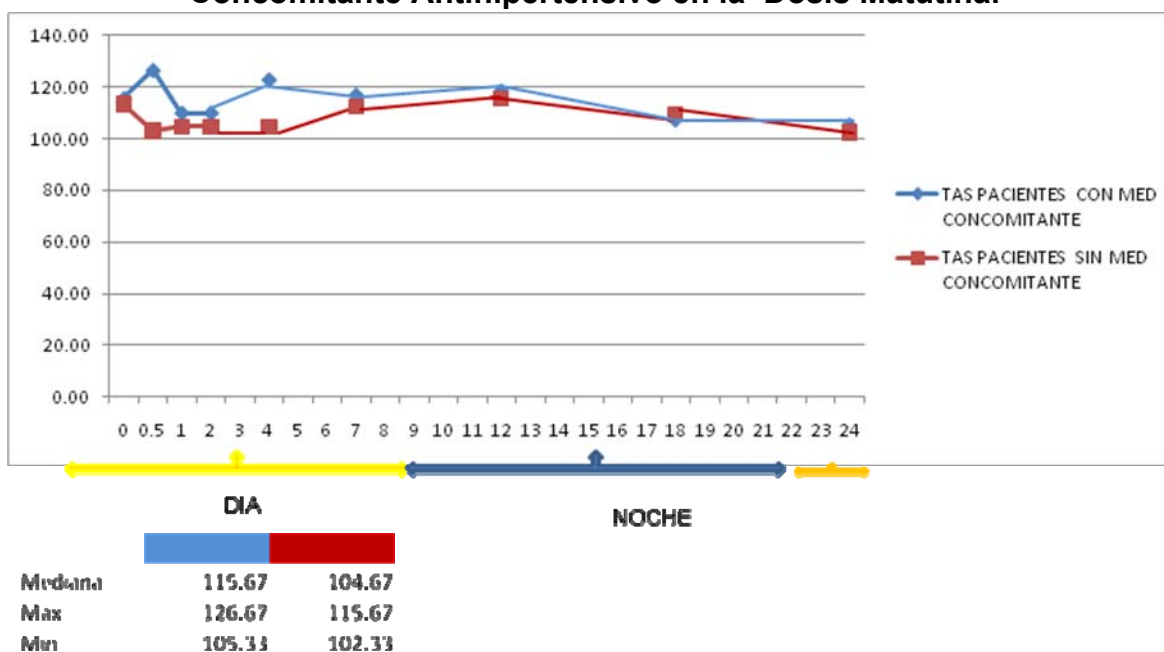
En la Figura 26 se muestra la comparación de las concentraciones plasmáticas de metoprolol de los pacientes con y sin medicamento antihipertensivo concomitante, en la dosis vespertina. Similar a lo observado con las dosis matutinas, las concentraciones plasmáticas alcanzadas durante la noche fueron más altas en los pacientes con terapia concomitante.

Figura 26. Comparación de las Concentraciones Plasmáticas de Metoprolol en Pacientes con y sin Medicamento Concomitante Antihipertensivo en la Dosis Vespertina.



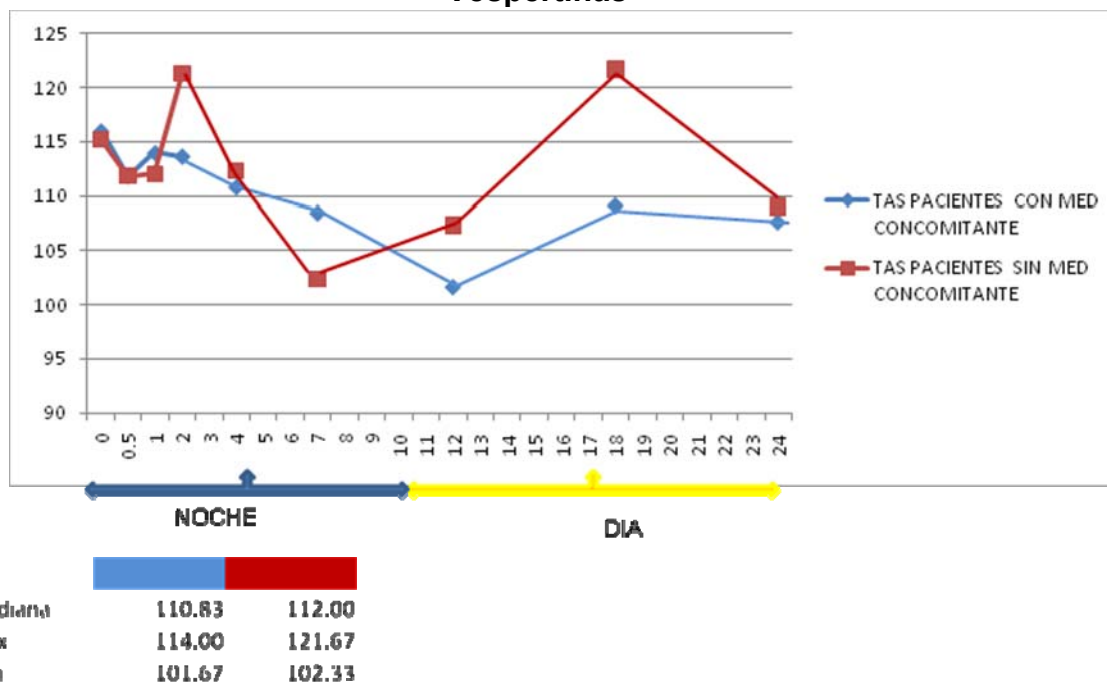
En la Figura 27 se muestra la comparación de la TAS en la dosis matutina entre los pacientes con y sin medicamento concomitante antihipertensivo. Los pacientes sin medicamento concomitante presentan niveles de TAS más bajos (Mediana=102 mmHg) en las primeras 8 horas del estudio, comparados con los que tomaron un medicamento antihipertensivo adicional (Mediana=155 mmHg).

Figura 28. Comparación de la TAS en los Pacientes con y sin Medicamento Concomitante Antihipertensivo en la Dosis Matutina.



En la Figura 29 se muestra la comparación de las TAS en la dosis vespertina entre pacientes con y sin medicamento antihipertensivo concomitante. Se puede observar que al igual que la dosis matutina, los pacientes sin medicamento concomitante presentan niveles de TAS más bajos durante el día.

Figura 29 Comparación de TAS de los Pacientes con y sin Medicamento Concomitante Antihipertensivo en las Dosis Vespertinas



Las variables TAD y FC no presentan diferencias significativas entre ambos grupos

Genotipo del CYP2D6 en los pacientes estudiados

En la tabla 23 se muestra el genotipo los pacientes estudiados, de los cuales tres fueron heterocigotos para el alelo *4 (pacientes 1, 5, 6) y uno para el alelo *5 (paciente 7). El resto de los pacientes fueron homocigotos *1/*1 (silvestre). Únicamente en 4 pacientes con la dosis matutina y en 5 con la dosis vespertina fue posible ajustar sus datos a modelos farmacocinéticos compartimentales, ya que el perfil farmacocinético cumplió con los requisitos para emplear dichos modelos.

Tabla 23. Genotipo del CYP2D6 en los Pacientes Estudiados

Pacientes	Genotipo
1	*4/*1
5	*4/*1
6	*4/*1
7	*5/*1
3	*1/*1
4	*1/*1
8	*1/*1
9	*1/*1
10	*1/*1
11	*1/*1

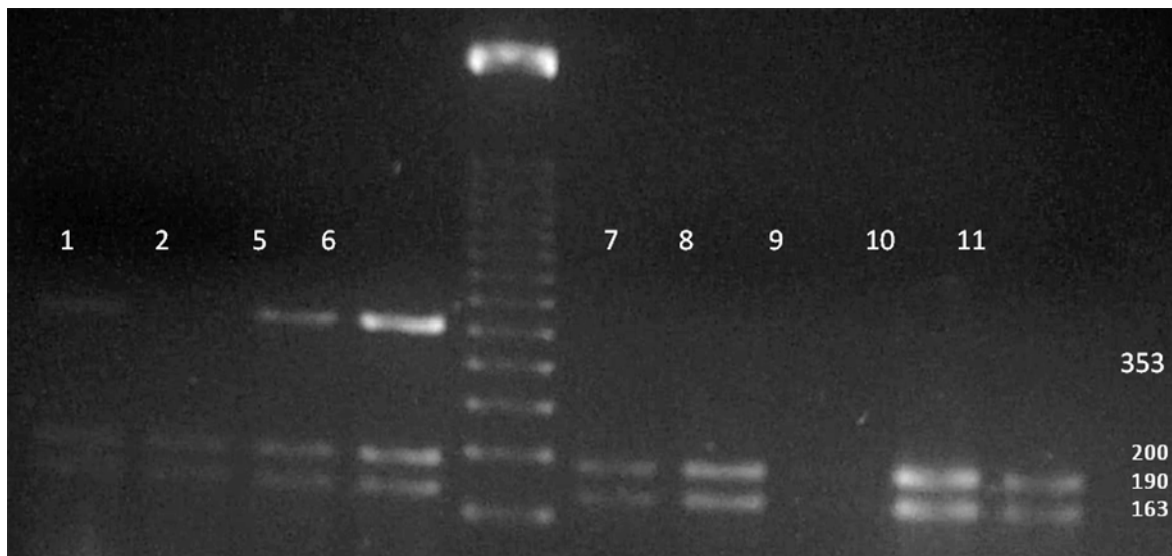
Algunos parámetros farmacocinéticos en los pacientes heterocigotos fueron más elevados que en los pacientes homocigotos silvestres, con la dosis matutina. Mientras que con la dosis vespertina se hizo más lento el metabolismo de los individuos homocigotos silvestres y aumentó en los heterocigotos. (Tabla 24 y 25)

Tabla 24. Comparación de los parámetros PK ($t_{1/2}$ el y CL) de metoprolol de acuerdo al genotipo y a la cronofarmacocinética

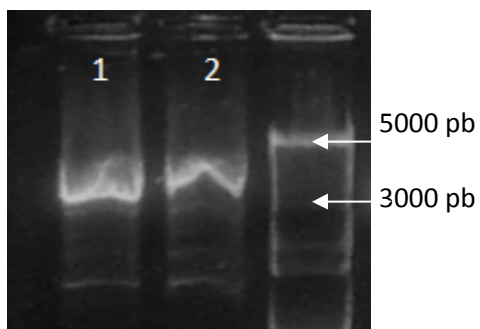
Genotipo	Parámetros Farmacocinéticos			
	Matutino		Vespertino	
	$t_{1/2}$ el	CL	$t_{1/2}$ el	CL
Silvestre	N=1	N=1	Silvestre	N=2 N=2
*1/*1	4.29	0.02	*1/*1	8.04 0.14
			*1/*1	(6.9-9.2) (0.10-0.17)
Heterocigotos	N=2	N=3	Heterocigotos	N=3 N=3
*4/*1	6.53	0.05	*4/*1	2.76 0.16
*4/*1	(6.4-6.9)	(0.04-0.16)	*4/*1	(1.2-7.1) (0.14-0.17)
*5/*1			*5/*1	

Tabla 25. Comparación de los parámetros PK (AUB y Vd) de metoprolol de acuerdo al genotipo y a la cronofarmacocinética

Parámetros Farmacocinético					
Matutino			Vespertino		
Genotipo	ABC	Vd		ABC	Vd
Silvestre	N=1	N=1	Silvestre	N=2	N=2
<i>*1/*1</i>	4788.3	0.4000	<i>*1/*1</i>	732.67 (545.9-919.4)	0.9200 (0.810-1.020)
Heterocigotos	N=3	N=3	Heterocigotos	N=3	N=2
<i>*4/*1</i>			<i>*4/*1</i>		
<i>*4/*1</i>	1834.5 (605.9-2669.8)	0.16 (0.1400-0.1700)	<i>*4/*1</i>	580.6 (557.1-687.5)	0.58 (0.450-0.710)
<i>*5/*1</i>			<i>*5/*1</i>		

Detección del alelo *CYP2D6* *4

Carril 2, 7, 8, 9, 10, 11 homocigoto silvestres. Carriles 1, 5, 6 heterocigotos *1/*4

Detección del alelo *CYP2D6* *5

Carril 1 heterocigoto *1/*5. Carril 2 control *5

10. DISCUSIÓN

Los β -bloqueadores son frecuentemente usados en la terapia de enfermedades cardiovasculares y son efectivos en la reducción de la morbilidad y mortalidad en pacientes con hipertensión, enfermedad coronaria e insuficiencia cardíaca.

Los sincronizadores, definidos en los años cincuenta por Halberg, llamados también Zeitgebers, por Aschoff, son señales externas del medio ambiente, capaces de coordinar los ritmos biológicos del organismo (Halberg *et al* 1954, Aschoff J. 1954).

Para el ser humano, el sincronizador más importante, es la alternancia de luz-oscuridad, de la que se regulan múltiples funciones biológicas.

Diferentes estudios han demostrado que diversos factores como el ritmo circadiano y la hora de administración del fármaco, influyen sobre la cronofarmacología de agentes antihipertensivos y sobre la TA y la FC.

Está reportado que tanto el vaciamiento gástrico como el peristaltismo están incrementados en la mañana, favoreciendo una absorción más rápida de fármacos liposolubles como el metoprolol (Bruguerolle B 1998), sin embargo, Hainer (2007) reportó que la velocidad de liberación de succinato de metoprolol es independiente de factores fisiológicos como el pH y la peristalsis, debido a que la concentración plasmática del fármaco en ayunas y post-prandial fue muy similar. Asimismo, se ha establecido que la unión a proteínas plasmáticas no es importante para fármacos antihipertensivos como el metoprolol, por lo tanto no adquiere una significancia clínica (Bruguerolle, 1998).

En nuestro estudio la farmacocinética de metoprolol se ve influenciada por los ritmos biológicos, ya que los parámetros farmacocinéticos (C_{pmax} , T_{max} , $t_{1/2el}$, ABC, Cl/F) fueron más altos con la dosis matutina que con la dosis vespertina, esto concuerda con lo descrito en otros estudios cronofarmacocinéticos realizados con propranolol, oxprenolol, nifedipino y verapamilo) en los que la C_{max} fue más alta por la mañana, aunque la T_{max} fue menor (Haya *et al* 2004).

Los diferentes sistemas neurohormonales que regulan la presión arterial, presentan variaciones en su actividad durante un periodo de 24 hrs. Una gran mayoría de fármacos antihipertensivos actúa mediante el bloqueo del sistema nervioso simpático, como los betabloqueadores (Giles *et al.*, 2000). Los pacientes 2, 6, 10 y 11 presentan un evidente comportamiento circadiano de la TA y FC en ambas dosis, a pesar de que los pacientes 2 y 6 presentaron niveles tóxicos de metoprolol con la dosis matutina y niveles dentro del intervalo terapéutico con la dosis vespertina, mientras que los pacientes 10 y 11 presentaron concentraciones plasmáticas de metoprolol por debajo del intervalo terapéutico en ambas dosis (figura 13). Lo anterior hace evidente el efecto del ritmo circadiano sobre la TA en estos pacientes. Además en las figuras 14 a 17 se muestra que a pesar de las concentraciones plasmáticas de metoprolol alcanzadas por los pacientes, la disminución de la TAS y TAD es diferente de acuerdo a la hora de administración del fármaco. Cinco pacientes presentan medicamento antihipertensivo además del metoprolol (tabla 22), lo cual podría modificar los niveles de TA.

Algunos fármacos cardiovasculares son sustratos de enzimas que exhiben variabilidad genética, pero en un gran número de casos, esto no tiene consecuencias clínicas importantes (Julie *et al.*, 2004). Por ejemplo, individuos ML de sustratos de la enzima CYP2D6, presentan concentraciones plasmáticas 5 veces arriba de lo normal (Lennard *et al.* 1982, 1983; McGourty *et al.* 1985), sin embargo, se ha demostrado que la concentración plasmática de metoprolol y el genotipo del CYP2D6 no son determinantes de los efectos adversos de este fármaco, en pacientes con hipertensión o insuficiencia cardíaca (Zineh *et al.* 2004, Terra *et al.* 2005). En nuestro estudio los pacientes heterocigotos (1, 5, 6, 7) para un alelo inactivo del CYP2D6 presentaron parámetros farmacocinéticos más elevados con la dosis matutina que los sujetos con genotipo silvestre, a diferencia de lo observado con la dosis vespertina, en la que los parámetros farmacocinéticos de los pacientes heterocigotos presentan una notable disminución. Esto contrasta con lo encontrado por Rau *et al.* (2009), quienes demostraron que individuos tratados con metoprolol a largo plazo, presentaron concentraciones plasmática similares, sin

importar el genotipo del *CYP2D6*, sin embargo, en este estudio no se consideró la influencia de los ritmos biológicos.

Los seres humanos tienen control auto-motivacional sobre el sueño y la vigilia. Paradójicamente, el desarrollo de sociedades que operan 24hrs al día los 7 días de la semana, han provocado que los procesos regulados por la homeostasis y los ritmos biológicos se modifiquen. En este estudio, solo un paciente (8) desarrolla una actividad laboral nocturna que podría afectar su estado de vigilia-sueño, sin embargo, presenta una adecuada relación PK/PD en ambos estudios, aunque el descenso de la TA fue mayor con la dosis vespertina.

Por lo tanto, es imprescindible asimilar los conceptos de la cronobiología: respetar los ritmos biológicos, tomar conciencia de que existen variaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas a lo largo de las 24 horas y que el organismo responde de manera diferente según el momento de administrar el fármaco. La aplicación sistemática de estos conceptos permitirá, en un futuro próximo, mejorar el tratamiento de muchas enfermedades.

Desde la más remota antigüedad hasta nuestros días, el tiempo ha sido un tema rodeado de misterios. Desde San Agustín a los relojes astronómicos, desde Kant a los ritmos biológicos, casi nunca el hombre logró definir con claridad al tiempo. Somos organismos sometidos a la periodicidad de la naturaleza, somos relojes celulares complejos y poco comprendidos.

La Cronobiología humana nos sumerge en uno de los temas más apasionantes, complejos y necesariamente útiles para nuestras vidas, como es el de los ritmos biológicos. Los ritmos biológicos nos llevan a pensar en el concepto del tiempo, en períodos, en cómo todos los seres vivos nos movemos en esta dimensión. Sin embargo, ya Einstein introdujo el concepto de que el tiempo es un aspecto de la relación entre el Universo y el observador, descartando la noción del tiempo absoluto de Newton. Es necesario, entonces, que la biología vuelva a mirar hacia la física cuántica y todas las grandes discusiones de la primera mitad del siglo XX.

Del espacio-tiempo de la física, pasamos ahora al tiempo y cuerpo de la cronobiología.

El estudio de la forma en cómo las personas responden a los medicamentos según su herencia genética y el respeto a esa relación naturaleza-organismo plasmada en los ritmos biológicos, nos llevará a la base de la medicina personalizada: la dosis correcta, del fármaco correcto, la indicación correcta, al paciente correcto, en el tiempo correcto...

11. CONCLUSIONES

- Se observó mejor respuesta al tratamiento con la dosis vespertina que con la dosis matutina. El comportamiento de los niveles de la TAS fue diferente de acuerdo a la hora de administración.
- No hay diferencia significativa en la PP de acuerdo a la hora de administración del metoprolol.
- El número de sujetos que se encuentra dentro del intervalo terapéutico es mayor con la dosis vespertina que con la dosis matutina, sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas.
- La respuesta circadiana de la TA al metoprolol no siempre tiene relación con su intervalo terapéutico, ya que seguramente está influyendo el ritmo circadiano central.
- La PK de metoprolol se ve influenciada principalmente por los ritmos circadianos y los polimorfismos del CYP2D6, lo que hace obligado individualizar el tratamiento de acuerdo a estos factores biológicos y ambientales.

12. RECOMENDACIONES

Se recomienda individualizar la prescripción de metoprolol para lo cual deberá tenerse en cuenta el comportamiento circadiano de la HAS, las variaciones cronofarmacocinéticas del metoprolol, y de ser posible el perfil farmacogenético del *CYP2D6*. Estos aspectos establecen la necesidad de poner en práctica una medicina personalizada que redundará para mejorar la eficacia y seguridad de este fármaco.

Debido a la importancia de los resultados obtenidos, consideramos importante incrementar el tamaño de muestra en un estudio posterior con la finalidad de darles un mayor peso.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amita Sehgal *Molecular Biology of Circadian Rhythms*. John Wiley & Sons, Inc. 2004 255.

Armstrong M, Idle JR, Daly AK. A polymorphic Cfol site in exon 6 of the human cytochrome P450 CYP2D6 gene detected by the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1993;91:616-17.

Aschoff J. Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* 1954; 41: 49-56.

Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Aberg-Wistedt A, Humble M, Johansson I, Lundqvist E, Ingelman-Sundberg M. Molecular basis for rational megaprescribing in ultrarapid hydroxylators of debrisoquine. *Lancet* 1993; 341:63

Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet.* 1997;32:210-258.

Betés de Toro, Cronofarmacología clínica: principios y aplicaciones terapéuticas Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid. MEDICINA CLÍNICA VOL. 102. NÚM. 4. 1.994

Borg KO, Carlsson E, Hoffmann KJ, Johnsson TE, Thorin H, Wallin B. Metabolism of metoprolol-(H3) in man, the dog and the rat. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1975;36:125-135.

Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002;3:229–243

Bruguerolle B, Lemmer B. Recent advances in chronopharmacokinetics: methodological problems. *Life Sci*. 52:1809-24. 1993.

Bruguerolle B.1998 Chronopharmacokinetics. Current status.*Clin Pharmacokinet*. 35:83-94 4- Lemmer B.1997.

Cadman PE, O'Connor DT. Pharmacogenomics of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12:61-70.

Capdevila J, Harris RC, Falck JR. Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:780-789.

Christie B. Doctors revise Declaration of Helsinki. *British Medical Journal* 2000; 321: 9

Dahl ML, Yue QY, Roh HK, Johansson I, Sawe J, Sjoqvist F, Bertilsson L. Genetic analysis of CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics* 1995;5: 159-64.

Daly A.K., Leathart J.B.S., London S.J. and Idle J.R. An inactive cytochrome P450 CYP2D6 allele containing a deletion and a base substitution. *Hum Genet* 1995, 95:337-341.

Daly AK, Monkman SC, Smart J, Steward A, and Cholerton S (1998) Analysis of Cytochrome P450 Polymorphisms. In: Philips IR and Shephard EA (eds) *Cytochrome P450 Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Totowa NJ, pp 406-408.

Dorado P., Cáceres M C., Pozo Guisado E., Wong M., Licinio J., Llerena A. Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *BioTechniques*, 2005; 39:571-574

Droll K, Bruce-Mensah K, Otton SV, Gaedigk A, Sellers EM, Tyndale RF. Comparison of three CYP2D6 probe substrates and genotype in Ghanaians, Chinese and Caucasian. *Pharmacogenetics* 1998;8:325-33.

Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet* 1991;48:943-950

Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL, Leeder JS. Optimization of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics* 1999;9:669-682.

Gaedigk A., Blum M., Gaedigk R., Eichelbaum M., Meyer U.A. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet* 1991;48:943-50

Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *N Engl J Med*. 2004; 351:2827-2831.

Giles T.D. Factors influencing circadian variability. *Blood Press Monit* 2000; 5(suppl 1): S3-S7.

Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. Análisis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics* 1999;9:715-723.

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 1998;8: 15-26.

Hainer JW, Sugg J. Metoprolol succinate extended release/hydrochlorothiazide combination tablets. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(3):279-88.

Halberg F, Visscher MG, Bittner JJ. Relation of visual factors to eosinophil rhythm in mice, *Am J Physiology* 1954; 179: 229-235.

Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934-A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3'splice recognition site. *Am J Hum Genet* 1990;47:994-1001.

Hassler C., Burnier M. Circadian variation in blood pressure: Implications for chronotherapeutics. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005; 5: 7-15

Haya M. Al-Malaq Chronopharmacokinetics: The Circadian Rhythm of Drugs Teaching Assistant-Clinical Pharmacy Department College of Pharmacy King Saud University December 25-2004

Hermida Domínguez R.C., Ayala García D.E., Calvo Gómez C. Cronobiología y cronoterapia en la hipertensión arterial: implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas. *Hipertensión* 2004; 21: 256-270.

Hermida R.C., Calvo C., Ayala D.E., y col. Administration time-dependent effects of nevigolol on ambulatory blood pressure in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2005; 18: 62-63.

Higaki K., Yamashita S., Amidon G.L., Time-dependent oral absorption models, *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 28 (2001) 109–128.

Hoffman B, Lefkowitz R. Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos y antagonistas de los receptores adrenérgicos. En: Hardman J, Limbird L, Molinoff

Hötch C y Taira C. Cronofarmacología en el tratamiento de la hipertensión arterial, *Boletín del Consejo Argentino de H.T.A. – Año 7- Julio- Diciembre- 2006*
Ingelman-Sundberg M, Daly AK y Nebert DW. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee, <http://www.imm.ki.se/cypalleles/>

Ingelman-Sundberg M. *Arch Toxicol Suppl* 1997;19:3-13.

James W Hainer ,Jennifer Sugg. Metoprolol succinate extended release/ hydrochlorothiazide combination tablets *Vascular Health and Risk Management* 2007;3(3) 279–288

Johansson I., Lundqvist E., Bertilsson L., Dahl M.L., Sjöqvist F., Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D6 locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:11825-9.

Julie A. Johnson and Larisa H. Cavallari. Cardiovascular pharmacogenomics UF Center for Pharmacogenomics, University of Florida, Gainesville, FL, USA. 284-285. 2004

Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T and Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. J Biol Chem 1990;265:17209-17214.

Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmöller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drugs response. Mol Psychiatry. 2004;9:442-473.

Kroemer HK, Eichelbaum M. "It's the genes stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. Life Sci 1995; 56:2285-2298.

Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. CYP2D6 phenotype-genotype relationship in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. Pharmacogenetics 1998;8:529-541.

Lemmer B. Chronopharmacological aspects of PK/PD modelling. Int J Clin Pharmacol Ther. 35:458-64. 1997.

Lemmer B. Scheldel B, Behne S. Chronopharmacokinetics and chronopharmacodynamics of cardiovascular active drugs. Ann NY Acad Sci 1991; 618:166-181

Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Ramsay LE, Tucker GT & Woods HF. Oxidation phenotype – a major determinant of metoprolol metabolism and response N Engl J Med 307, 1558- 1560. (1982

Lipka E., I.D. Lee, P. Langguth, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler, G.L. Amidon, Celiprolol double-peak occurrence and gastric motility: nonlinear mixed effects

modeling of bioavailability data obtained in dogs, J. Pharmacokinet. Biopharm. 23 (1995) 267–286

López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. Eur J Clin Pharmacol 2005; 61:749-754.

Lundqvist E, Johansson I and Ingelman-Sundberg M. Gene 1999;226:327-38
Masimirembwa CM, Hasler JA. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in African populations: implications for the use of neuroleptics and antidepressants. Brain Res Bull 1997; 44:561-571.

McGourty JC, Silas JH et al. Metoprolol metabolism and debrisoquine oxidation polymorphism – population and family studies. Br J Clin Pharmacol 20, 555-566, 1985.

Mendoza R, Wan YY, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N, Lin KM. CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. Clin Pharmacol Ther. 2001; 70:552-560.

Michael Winters. Basic Clinical Pharmacokinetics. J.R. Prous Publishes, Barcelona Spain, 2nd edition. 1984.

Michel lebrun, Louis Grenier, Pierrette Gourde, Michel G. Bergeron, Gaston labrecque, and denis beauchamp. 1999

National Heart, Lung and Blood Institute NIH, The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health And Human Services. Publication No. 04-5230,2004.

O'Rourke MF, Staessen JA. Clinical applications of arterial stiffness; definitions and reference values. *Am J Hypertens* 2002; 15: 426-444.

Oberle R.L., Amidon G.L, The influence of variable gastric emptying and intestinal transit rates on the plasma level curve of cimetidine; an explanation for the double peak phenomenon, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 15 (1987) 529–544.

Rau T, Wuttke H, Michels LM, Werner U, Bergmann K, Kreft M, Fromm MF, Eschenhagen T. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Mar;85(3):269-72

Regardh C-G, Borg KO, Johansson R, Johnsson G, Palmer L. Pharmacokinetics studies on the selective B1-receptor antagonist metoprolol in man. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1974;2:347-364.

Rosenstein Ster Emilio, Seloken Zok, *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.* P.L.M.; 50 Edición, 2682-2684. 2004

Sachse C, Brockmoller J., Bauer S., Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum genet* 1997;60:284-95.

Sáez V. Hernáez E., López Leyre, Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas, *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 4(2)*, Abril 2003, 117-120

Shaw G.L., Falk R.T., Caporaso N.E. y col. Temporal aspects of diurnal variation on debrisoquine metabolic phenotyping. *J Nat Cancer Inst* 1990; 82:1573-1575.

Skoda RC, Gonzalez FJ, Demierre A, Meyer UA. Two mutant alleles of the human cytochrome P-450db1 gene (P450C2D1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5240-5243.

Sohn DR, Kusaka M, Shin SG, Jang IJ, Chiba K, Ishizaki T. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. *Ther Drug Monit.* 1992 Jun;14(3):184-9.

Sosa-Macias M, Elizondo G, Flores-Perez C, Flores-Perez J, Bradley-Alvarez F, Alanis-Banuelos RE, Lares-Asseff I. CYP2D6 genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, Mexico. *J Clin Pharmacol* 2006; 46:527-536.

Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Borresen AL, Idle JR, Gulbrandsen AK. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995;5:215-223.

Taguchi M, Nozawa T, Kameyama T, Inoue H, Takesono C, Mizukami A, Hashimoto Y. Effect of CYP2D6*10 on pharmacokinetic variability of routinely administered metoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;59:385-388.

Terra SG, Hamilton KK, Pauly DF, Lee CR, Patterson J, Adams KF et al. (2005). Beta-1 adrenergic receptor polymorphisms and left ventricular remodeling changes in response to b- blocker therapy. *Pharmacogenet Genom* 15, 227- 234

Velázquez MO, Rosas PM, Lara EA, Pastelín HG, Grupo ENSA 2000, Fause A, Tapia CR. Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000.

Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML. Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequency of CYP2D6. Clin Pharmacol Ther 1993;53:410-418.

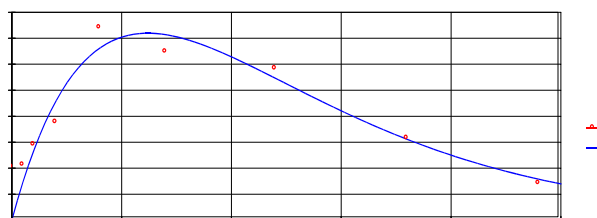
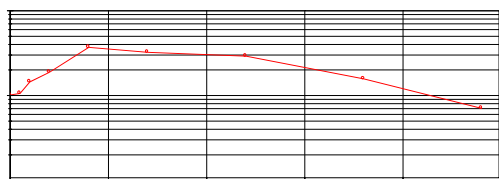
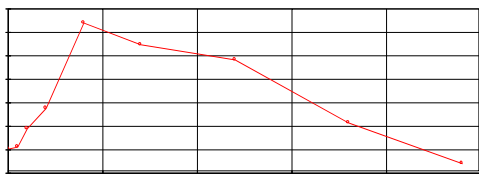
White W.B. Circadian variation of blood pressure. Blood Press Monit 1997; 2: 46-5.

Yamazaki S, Sato K, Suhara K, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. Importance of the praline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. J Biochem (Tokyo) 1993;114:652-657.

Zineh I, Beitelshees AL, Gaedigk A, Walker JR, Pauly DF, Ebers K et al. Pharmacokinetics and CYP2D6 genotypes do not predict metoprolol adverse effect or efficacy in hypertension. Clin Pharmacol Ther, 2004; 76, 536 – 544

14. ANEXOS

14.1 – Estudio farmacocinético del paciente 01



NOTE: Initial estimates derived from corresponding

model with unequal K01 and K10.

SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	605.933660	67.313736	11.11
K-HL	4.295504	.409561	9.53
CL/F	.156783	.017435	11.12
Tmax	6.197102	.590871	9.53
Cmax	35.970124	2.714988	7.55

STUDY 01 Matutino Metoprolol

PK Model 5

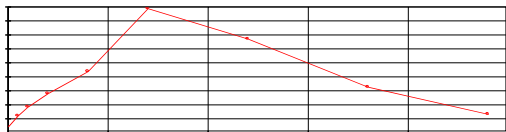
Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

Convergence criteria of .0001 used during minimization process

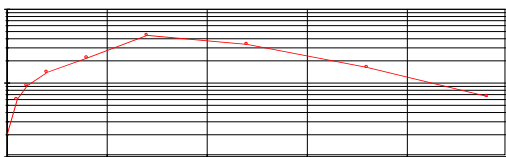
50 maximum iterations allowed during minimization process

14.2 – Estudio farmacocinético del paciente 01 dosis vespertina

Grafica study 1 vespertino Semil (escalas arit. Y semilog



)



SUMMARY OF

ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD	CV%
	ERROR		
AUC	687.289039	97.955838	14.25
K-HL	5.129856	.639543	12.47
CL/F	.138224	.019720	14.27
Tmax	7.400817	.922665	12.47
Cmax	34.163728	3.280084	9.60

Study vespertino paciente 1

Study vespertino paciente 1

PK Model 5

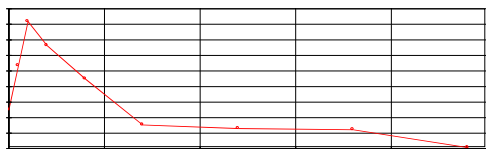
Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

Convergence criteria of .0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process

14.3 – Estudio farmacocinético del paciente 02 dosis matutina

Figuras papen aritmético y papel semilogarítmico



SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	4788.334697	23413.845622	488.98
K10-HL	20.210827	112.301408	555.65
K01-HL	.351675	.621080	176.61
Alpha	.445364	1.430727	321.25
Beta	.013119	.084965	647.64
Alpha-HL	1.556361	4.997498	321.10

Beta-HL	52.834678	341.812979	646.95
A	134.978291	346.925179	257.02
B	60.141647	94.268588	156.74
CL/F	.019840	.097109	489.47
Tmax	1.202178	.636502	52.95
Cmax	119.971540	26.464230	22.06

STUDY 02 Matutino metropolol PK Model 11

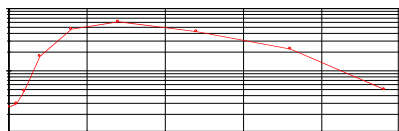
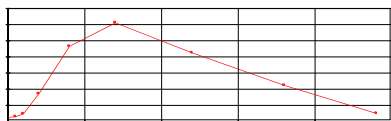
Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

Convergence criteria of .0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process

14.4 – Estudio farmacocinético del paciente 02 dosis vespertina

Study 2 vespertino metoprolol.. Curva aritmética y semilogaritimica



SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	919.425126	140.992017	15.33
K-HL	4.786070	.636666	13.30
CL/F	.103325	.015861	15.35
Tmax	6.904839	.918515	13.30
Cmax	48.985588	5.097395	10.41

Study 2, Vespertino de Metoprolol

PK Model 5

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

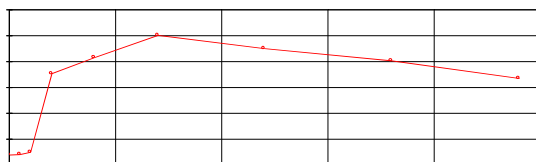
Convergence criteria of .0001 used during minimization process

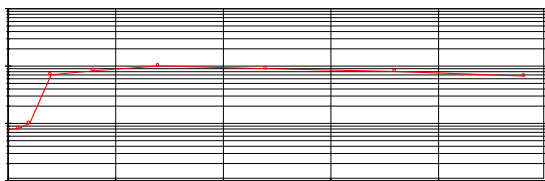
50 maximum iterations allowed during minimization process

14.5 – Estudio farmacocinético del paciente 06 dosis matutino

STUDY 06 Matutino Metoprolol

Figuras e papel aritmético y semilogarítmico





SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD	CV%
	ERROR		
AUC	2669.872365	306.080043	11.46
K-HL	6.399221	.762001	11.91
CL/F	.035582	.004083	11.48
Tmax	9.354783	.944148	10.09
Cmax	106.388422	8.063010	7.58

STUDY 06 Matutino

PK Model 6

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

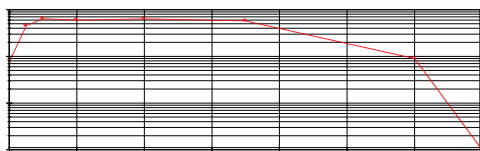
Convergence criteria of .0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process

14.6 – Estudio farmacocinético del paciente 06 dosis vespertina

Study 6 vespertino. Metoprolol

Graficas aritmética y semilogarítmica



SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	580.655220	86.144735	14.84
K-HL	1.918633	.240018	12.51
CL/F	.163608	.024297	14.85
Tmax	2.768002	.346273	12.51

Cmax 77.171592 7.471882 9.68

Study 3 vespertino

PK Model 5

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

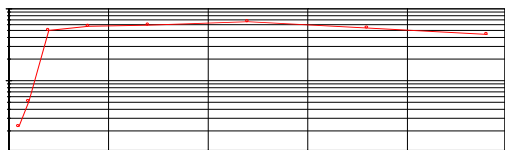
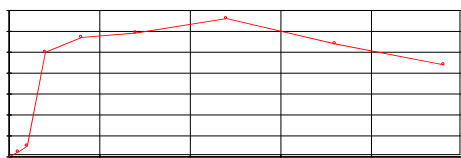
Convergence criteria of .0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process

14.7 – Estudio farmacocinético del paciente 07 dosis matutino

STUDY 07 Matutino, Metoprolol

Figuras en escalas aritmética y semilogarítmica



SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD	CV%
	ERROR		
AUC	1834.579956	217.570094	11.86
K-HL	6.673969	.713582	10.69
CL/F	.051783	.006147	11.87
Tmax	9.628502	1.029482	10.69
Cmax	70.094419	5.095613	7.27

STUDY 07 MATUTINO Metoprolol

PK Model 5

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

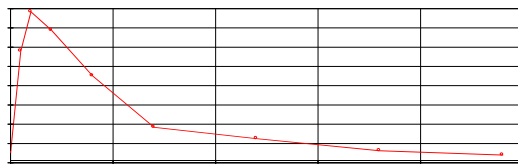
Convergence criteria of .0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process

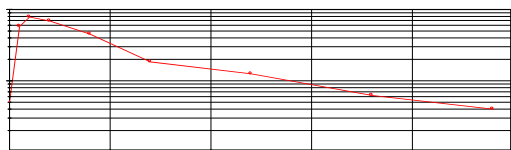
14.8 – Estudio farmacocinético del paciente 07 dosis vespertino

Study 07 Vespertino, Metoprolol

Figuras papel aritmético y



semilogarítmico



SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	557.176449	159.678377	28.66
K10-HL	3.300147	1.371189	41.55
K01-HL	.430742	.123513	28.67
Alpha	.386801	.225135	58.20
Beta	.061554	.089920	146.08
Alpha-HL	1.791998	1.042692	58.19
Beta-HL	11.260889	16.436417	145.96
A	129.520071	40.210891	31.05
B	19.380652	31.247121	161.23

CL/F	.170503	.048912	28.69
Tmax	1.251539	.098980	7.91
Cmax	77.888893	2.804048	3.60

Study 07 Vespertino metoprolol

PK Model 11

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

Convergence criteria of .0001 used during minimization process

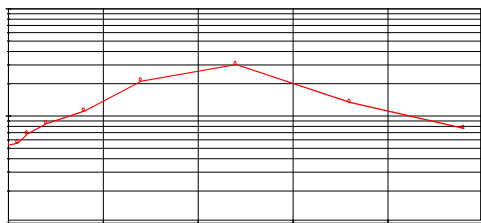
50 maximum iterations allowed during minimization process

14.9 – Estudio farmacocinético del paciente 08 dosis vespertino

Study 08 Vespertino

Figuras papel aritmético y semilogarítmico





SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	545.895654	107.067674	19.61
K-HL	6.362444	1.120429	17.61
CL/F	.174026	.034166	19.63
Tmax	9.179067	1.616437	17.61
Cmax	21.878454	2.700495	12.34

Study 08 Vespertino Metoprolol

PK Model 5

Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) method used

Convergence criteria of .0001 used during minimization process

50 maximum iterations allowed during minimization process