

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL  
POLIMORFISMO \*1B DE LA ENZIMA CITOCROMO P450  
3A4 Y SU RELACIÓN CON LA FARMACOCINÉTICA DE  
ZOLPIDEM EN VOLUNTARIOS SANOS.**

Tesis para Optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica  
Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular

Memoria para Optar al Título de Bioquímica

**Carla Estefanía Miranda Melo**

Director de Tesis  
Dr. Luis Quiñones Sepúlveda

**Santiago, Chile  
Marzo, 2010**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

**CARLA ESTEFANÍA MIRANDA MELO**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día\_\_\_\_\_.

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Luis Quiñones Sepúlveda

\_\_\_\_\_

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

Dra. Daniela Seelenfreund H.

\_\_\_\_\_

Dra. María Nella Gai H.

\_\_\_\_\_

Dr. Jorge Ferreira

\_\_\_\_\_

*A MATÍAS...*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar el Dr. Luis Quiñones, por la confianza depositada en mí y por sus valiosos consejos.

A la comisión revisora integrada por: Dra. Daniela Seelenfreund, Dra. María Nella Gai y Dr. Jorge Ferreira, por sus aportes constructivos para el desarrollo de este trabajo.

A las “niñas”, Paula Santander, Valentina Squicciarini y Joselyn Garay, mis compañeras de laboratorio, por los gratos momentos compartidos.

Agradecer también a todo el equipo de personas que conforman el Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas, por su apoyo y aportes, especialmente a Dr. Dante Cáceres, Helen Reyes y Jaime Sasso, por sus consejos y enseñanzas.

Agradezco también a mis amigos y amigas por su apoyo incondicional, compañía y cariño.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, por el cariño, su incondicional apoyo y por todo lo que he logrado en mi vida.

# ÍNDICE GENERAL

|   | Pág. |
|---|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | VII  |
| ÍNDICE DE TABLAS .....  | VIII |
| ABREVIATURAS .....  | IX   |
| RESUMEN.....  | XII  |
| ABSTRACT .....  | XIV  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| 1.1.    Farmacogenética .....   | 5    |
| 1.2.    CYP3A4 .....  | 7    |
| 1.3.    Zolpidem .....  | 10   |
| 2. HIPOTESIS.....   | 14   |
| 3. OBJETIVO GENERAL .....   | 14   |
| 4. OBJETIVO ESPECÍFICOS .....   | 14   |
| 5. MATERIALES Y METODOS .....   | 15   |
| 5.1.    Materiales .....  | 15   |
| 5.2.    Metodología .....   | 15   |
| 5.2.1.    Reclutamiento de los Voluntarios .....  | 15   |
| 5.2.2.    Análisis Genotípico .....   | 16   |
| 5.2.2.1. Extracción de sangre periférica y purificación del ADN .....                                       | 16   |
| 5.2.2.2. Determinación de la frecuencia genotípica y alélica de CYP3A4*1B... 16                             | 16   |
| 5.2.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg y Porcentaje de Mezcla Amerindio<br>caucásica (%M <sub>A-C</sub> ) ..... | 17   |
| 5.2.3.    Farmacocinética de Zolpidem .....   | 19   |
| 5.2.3.1. Voluntarios.....   | 19   |
| 5.2.3.2. Recolección de muestras.....   | 20   |
| 5.2.3.3. Aspectos éticos y de seguridad.....  | 20   |
| 5.2.3.4. Determinación de la concentración plasmática de Zolpidem.....                                      | 21   |
| 5.2.4.    Análisis estadístico.....   | 22   |

|  | Pág. |
|--|------|
| 6. RESULTADOS .....  | 23   |
| 6.1.    Análisis Genotípico .....  | 23   |
| 6.1.1.    Voluntarios.....   | 23   |
| 6.1.2.    Frecuencia del polimorfismo CYP3A4*1B en un grupo de población Chilena sana.....   | 23   |
| 6.1.3.    Equilibrio Hardy-Weinberg y porcentaje de mezcla amerindio caucásica (%M <sub>A-C</sub> ) .....  | 25   |
| 6.2.    Farmacocinética de Zolpidem .....  | 26   |
| 6.2.1.    Voluntarios.....   | 26   |
| 6.2.2.    Determinación de la concentración plasmática de Zolpidem en el tiempo.....   | 27   |
| 6.3.    Análisis estadístico.....  | 32   |
| 7. DISCUSIÓN.....  | 34   |
| 8. CONCLUSIONES .....  | 37   |
| 9. BIBLIOGRAFIA.....   | 39   |
| 10. ANEXOS.....  | 43   |
| Anexo 1: Consentimiento informado para análisis genético. ....   | 43   |
| Anexo 2: Protocolo de aprobación de proyectos clínicos. ....   | 45   |
| Anexo 3: Consentimiento informado para análisis farmacocinéticos. ....   | 47   |
| Anexo 4. Características generales. ....   | 50   |
| Anexo 5. Farmacocinética de Zolpidem de cada voluntario. ....  | 51   |
| Anexo 6. Modelos de regresión lineal para el efecto de la presencia de la variante genética CYP2C9, CYP3A4-CYP2C9 y CYP3A4/2C9 sobre los parámetros farmacocinéticos ajustado por edad, género e índice de masa corporal. .... | 52   |
| Anexo 7. Curva de concentración plasmática de Zolpidem en el tiempo de todos los voluntarios.....  | 53   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Citocromo P450: Localización y ciclo catalítico.....   | 4    |
| Figura 2. Representación esquemática de la estructura del <i>locus</i> CYP3A.....  | 8    |
| Figura 3. Esquema del sitio de corte de la enzima de restricción <i>MbolI</i> .....  | 9    |
| Figura 4. Estructura de Zolpidem.....  | 11   |
| Figura 5. Biotransformación de Zolpidem.....   | 13   |
| Figura 6. Representación esquemática del patrón de bandas del producto de la reacción de la PCR y de la digestión del producto de la PCR con la enzima de restricción <i>MbolI</i> ..... | 17   |
| Figura 7. Patrón electroforético del polimorfismo genético estudiado.....  | 24   |
| Figura 8. Cromatograma de detección de Zolpidem.....   | 27   |
| Figura 9. Curva farmacocinética según genotipo para CYP3A4.....  | 28   |
| Figura 10. Comparación de la curva farmacocinéticas promedio para el genotipo silvestre <i>versus</i> las curvas farmacocinéticas para cada voluntario con genotipo heterocigoto.....    | 29   |
| Figura 11. Comparación de curvas farmacocinéticas según genotipo CYP3A4/2C9.....   | 31   |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Enzimas CYP y su importancia relativa en la metabolización de fármacos en el hígado humano .....  | 7    |
| Tabla 2. Frecuencias genotípica y alélicas CYP3A4*1B en otras poblaciones.....   | 10   |
| Tabla 3. Características de la población estudiada.....  | 23   |
| Tabla 4. Frecuencia genotípica y alélica de la población chilena sana estudiada.....   | 24   |
| Tabla 5: Alineamiento de secuencias con base de datos de la NCBI.....  | 25   |
| Tabla 6. Distribución de los grupos sanguíneos, frecuencia alélica para el Sistema ABO y %Mezcla amerindio-caucásica.....  | 26   |
| Tabla 7. Características demográficas de los voluntarios sometidos a una monodosis de Zolpidem.....  | 27   |
| Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de Zolpidem de los voluntarios según su genotipo.....   | 28   |
| Tabla 9. Parámetros Farmacocinéticos del los voluntarios sometidos a una monodosis de 10 mg de Zolpidem según genotipo CYP3A4 y CYP2C9.....  | 32   |
| Tabla 10. Modelos de regresión lineal para los parámetros farmacocinéticos y el efecto de la presencia de la variante genética CYP3A4*1B ajustado por edad, género e índice de masa corporal.....  | 33   |
| Tabla 11. Efecto de la presencia de la variante genética CYP3A4, CYP2C9, CYP3A4-CYP2C9 y CYP3A4/2C9 sobre los parámetros farmacocinéticos ajustado por edad, género e índice de masa corporal..... | 33   |

## ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| %M <sub>A-C</sub> | Porcentaje de mezcla amerindio-caucásica.  |
| 5´PR              | Región promotora 5´.   |
| ABC               | Área bajo la curva.  |
| ADN               | Ácido desoxirribonucleico.   |
| Arg               | Arginina.  |
| BZ                | Benzodiazepínico.  |
| Cys               | Cisteína.  |
| C <sub>máx</sub>  | Concentración máxima.  |
| CYP               | Citocromo P450.  |
| CYP1A2            | Citocromo P450, Familia 1, Subfamilia A, polipéptido 2. Nombres alternativos: CP12, P3-450, P450 (PA) y aryl hydrocarbon hydroxylase. GenelD: 1544.                                |
| CYP2C19           | Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia C, polipéptido 19. Nombres alternativos: RP11-400G3.4, CPCJ, CYP2C, P450C2C, P450IIC19 y S-mephenytoin 4-hydroxylase. GenelD: 1557.          |
| CYP2C9            | Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia C, polipéptido 9. Nombres alternativos: CPC9, CYP2C, CYP2C10, MGC88320, P450IIC9 y MGC149605. GenelD: 1559.                                  |
| CYP2C9*2          | Variante de CYP2C9, en que se produce un SNP (C430T) que conlleva a un cambio aminoacídico en la proteína (Arg144Cys). rs1799853.  |
| CYP2C9wt/wt       | Genotipo homocigoto <i>wild type</i> para CYP2C9*2.  |
| CYP2C9wt/*2       | Genotipo heterocigoto para CYP2C9*2 o wt/*2.   |
| CYP2C9*2/*2       | Genotipo homocigoto mutado para CYP2C9*2 o *2/*2.  |
| CYP2C9*3          | Variante de CYP2C9, en que se produce un SNP (A1075C) que conlleva a un cambio aminoacídico en la proteína (Ile359Leu). rs1057910.   |
| CYP2D6            | Citocromo P450, Familia 2, Subfamilia D, polipéptido 6. Nombres alternativos: RP4-669P10.2, CPD6, CYP2D, CYP2DL1, MGC120389, MGC120390, P450-DB1, P450C2D y P450DB1. GenelD: 1565. |

|                   |  |
|-------------------|--|
| CYP3A4            | Citocromo P450, Familia 3, Subfamilia A, polipéptido 4. Nombres alternativos: CP33, CP34, CYP3A, CYP3A3, HLP, MGC126680, NF-25, P450C3, P450PCN1, P450-III, cytochrome P450, subfamily IIIA (niphedipine oxidase) polypeptide 4 y glucocorticoid-inducible P450. GeneID: 1576. |
| CYP3A4*1B         | Variante de CYP3A4, en que se produce un SNP (-392A>G) que conlleva a un promotor más débil, produciendo menor transcripción de la proteína. rs2740574.  |
| CYP3A4wt/*1B      | Heterocigoto para CYP3A4*1B o wt/*1B. *1B: Alelo Mutado.   |
| CYP3A4*1B/*1B     | Genotipo Homocigoto mutado para CYP3A4*1B o *1B/*1B  |
| CYP3A43           | Citocromo P450, Familia 3, Subfamilia A, polipéptido 43. Nombres alternativos: MGC119315, MGC119316 y citocromo P450 polipéptido 43. GeneID: 64816.  |
| CYP3A5            | Citocromo P450, Familia 3, Subfamilia A, polipéptido 5. Nombres alternativos: CP35, P450PCN3, PCN3, aryl hydrocarbon hydroxylase y subfamily IIIA (niphedipine oxidase), polypeptide 5. GeneID: 1577.  |
| CYP3A7            | Citocromo P450, Familia 3, Subfamilia A, polipéptido 7. Nombres alternativos: CP37, P450-HFLA, aryl hydrocarbon hydroxylase; cytochrome P450, subfamily IIIA polypeptide 7 y flavoprotein-linked monooxygenase. GeneID: 1551.  |
| CYP3AP1           | Citocromo P450, Familia 3, Subfamilia A, Pseudogene 1. Nombre alternativo: CYP3A5P1. Gene ID: 1578.  |
| CYP3A5P2          | Citocromo P450, Familia 3, Subfamilia A, Polipéptido 5 Pseudogene 2. Gene ID: 79424.   |
| dNTPs             | Desoxinucleótidos Trifosfatos.   |
| DE                | Desviación Estándar.   |
| FAD               | Flavoproteína, del inglés " <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i> ".  |
| FMN               | Flavin Mononucleótido o Riboflavina-5'-fosfato.  |
| GABA <sub>A</sub> | Receptor de unión a GABA (γ-aminobutírico) y varios fármacos, como: Zolpidem, benzodiazepinas, barbitúricos, etanol, esteroides neuroactivos, etc.   |
| GenBank           | Base de datos de secuencias de nucleótidos mantenida por el Centro nacional de Estados Unidos para la información biológica (" <i>National Center for Biotechnology Information</i> ").  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| Gene ID         | Número para identificar una secuencia de una proteína en particular.   |
| HPLC            | Cromatografía Líquida de Alta Resolución, del inglés " <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ".        |
| IFT             | Laboratorio de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.     |
| IMC             | Índice de masa corporal.   |
| ISP             | Instituto de Salud Pública (Chile).  |
| $K_e$           | Constante de eliminación.  |
| $K_m$           | Constante de Michaelis.  |
| Omega-1         | subtipo BZ-1.  |
| OMS             | Organización Mundial de la Salud.  |
| PCR             | Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ".                          |
| RFLP            | Fragmentos de restricción de largo polimórfico del inglés " <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ". |
| SEM             | Error estándar medio.  |
| SNC             | Sistema Nervioso Central.  |
| SNP             | Polimorfismos de nucleótido simple, del inglés " <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ".                      |
| $t_{1/2}$       | Tiempo de vida media.  |
| $t_{máx}$       | Tiempo al que se produce la $C_{máx}$ .  |
| VIH             | Virus de la inmunodeficiencia Humana.  |
| Vol.            | Voluntario.  |
| wt o *1         | Alelo silvestre, del inglés " <i>wild type</i> ".  |
| wt/wt           | Genotipo silvestre, del inglés " <i>wild type</i> ".   |
| $\lambda_{máx}$ | Longitud de onda máxima.   |

## RESUMEN

El ser humano está constantemente expuesto a agentes externos (xenobióticos), entre los que se incluyen los fármacos. La mayoría de estos xenobióticos son lipofílicos siendo absorbidos por la mucosa gastrointestinal hacia la circulación sistémica. Para facilitar su excreción existen enzimas de biotransformación, tales como las *monooxigenasas* o citocromo P450 (CYP), las cuales se encuentran principalmente en el hígado y transforman sustancias lipofílicas en compuestos hidrofílicos modificando la velocidad de excreción, la vida media y otras propiedades fármaco/tóxicocinéticas.

La variabilidad interindividual en el metabolismo y respuesta a fármacos es extensa debido a las características genéticas individuales y las interacciones con otros xenobióticos. Este tema es abordado por la farmacogenética, una disciplina que analiza la información genética del paciente para diseñar una terapia farmacológica más apropiada y por consiguiente, la información previa de esto puede ser beneficiosa, en especial en aquellos fármacos con un índice terapéutico estrecho o una concentración plasmática mínima. Ello debido a que es bien sabido que la mayoría de las enzimas de biotransformación son polimórficas, causando ya sea la supresión, disminución o aumento del metabolismo de fármacos. Por lo tanto, es necesario conocer su variación en un individuo para ajustar una terapia farmacológica individualizada.

Una de las enzimas relevantes en la respuesta farmacológica, responsable del metabolismo de gran cantidad de fármacos y que corresponde casi al 30% de las enzimas P450 hepáticas es CYP3A4. Se han descrito numerosos polimorfismos en el gen que codifica para esta enzima, siendo CYP3A4\*1B uno de los más estudiados. Al respecto, estudios *in vitro* han mostrado que esta variante exhibe una actividad enzimática dos veces menor que el genotipo común o *wild type* CYP3A4 wt/wt, sin embargo, *in vivo* no se ha logrado demostrar que esta variante esté asociada a una disminución de la actividad enzimática.

El medicamento hipnosedativo Zolpidem utilizado para iniciar o mantener el sueño es biotransformado principalmente por CYP3A4, por lo que esta enzima puede tener un papel muy relevante en la respuesta farmacoterapéutica. A pesar de que se han realizado estudios *in vitro* que han demostrado su biotransformación por CYP3A4 (61%), CYP2C9 (22%) y CYP1A2 (14%), aún no se demuestra que la presencia del polimorfismo de CYP3A4 \*1B altere los parámetros farmacocinéticos en humanos, ya sea sometidos a monodosis o a un tratamiento con Zolpidem.

De acuerdo a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo de tesis persiguió determinar la frecuencia del polimorfismo CYP3A4 \*1B en la población chilena sana, y asociar el polimorfismo a cambios en los parámetros farmacocinéticos de Zolpidem en un grupo de voluntarios sanos sometidos a una monodosis de Zolpidem. La detección de los diferentes genotipos se realizó a través de PCR-RFLP convencional y los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los resultados obtenidos mostraron una frecuencia genotípica de un 0,889 para el genotipo silvestre (wt/wt), 0,111 para los heterocigotos (wt/\*1B) y no se encontraron individuos homocigotos mutados (\*1B/\*1B) en 253 chilenos sanos. La frecuencia alélica fue de un 0,945 para el alelo silvestre (wt) y un 0,055 para el alelo mutado (\*1B).

El análisis estadístico para establecer la relación entre el genotipo y los parámetros farmacocinéticos de 32 personas estudiadas (28 para wt/wt y 4 para wt/\*1B) no mostró una asociación estadísticamente significativa, por lo que sería necesario disponer de un mayor número de individuos tratados con el fármaco de modo de establecer la presencia de metabolizadores rápidos o lentos de Zolpidem o en su defecto realizar un estudio farmacocinético en un grupo de individuos previamente identificados como portadores del alelo mutado. Sin perjuicio de lo anterior, es necesario destacar que el objeto último de la farmacogenética es establecer respuestas individuales, por lo que el hallazgo de 4 individuos con genotipo mutado y el análisis de sus niveles plasmáticos de Zolpidem podrían permitir disponer de una herramienta útil para el ajuste de la dosis de este medicamento.

## ABSTRACT

Human beings are constantly exposed to external agents (xenobiotics), including drugs. Most of xenobiotics are lipophilic and therefore they are absorbed by gastrointestinal mucous towards the systemic circulation. To facilitate their excretion biotransformation enzymes, such as monooxygenases or cytochrome P450 (CYP), found mainly in the liver, change lipophilic substances to hydrophilic compounds by modifying their excretion rate, half-life, and other pharmacokinetics or toxicokinetics properties.

The interindividual variability in metabolism and drug responses is huge because of individual genetics characteristic and interactions with other xenobiotics. This topic is approached by pharmacogenetics, an area that analyzes the genetic makeup of patients a suitable pharmacological therapy design and therefore. The knowledge derived from this research can be beneficial, especially for those drugs with a tight therapeutic index or minimum plasmatic concentration. Since it is well-known that most biotransformation enzymes are polymorphic, causing suppression, decrease or increase of drug metabolism, it is necessary to know individual variation to fit an individualized pharmacology therapy.

One of the relevant enzymes responsible for the metabolization of many drugs and part of hepatic P450 enzymes is CYP3A4. This enzyme presents several polymorphisms, being CYP3A4\*1B one of the most studied. *In vitro* studies have shown that this variant shows only half of the enzymatic activity of the common genotype (CYP3A4 wild type). It has not been shown *in vivo* that this variant is associated to an enzymatic activity reduction.

The hypnosedative drug Zolpidem used to induce or maintain sleep is mainly biotransformed by CYP3A4, therefore this enzyme may have a relevant role in the pharmacotherapeutic response. In spite of *in vitro* studies have demonstrated its biotransformation by CYP3A4 (61%), CYP2C9 (22%) and CYP1A2 (14%), it still has not been shown that the presence of the CYP3A4\*1B polymorphism modifies zolpidem

pharmacokinetic parameters in humans, whether they are administered as a monodose or a treatment sustained.

The goal of this thesis was to determine CYP3A4\*1B polymorphism frequency in a healthy Chilean population and in a group of healthy volunteers under a Zolpidem monodose treatment, and to relate the genotypes frequencies to changes in Zolpidem pharmacokinetic parameters. Detection of correlated genotypes were realized through conventional PCR-RFLP and the pharmacokinetic parameters were measured through high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

The results showed a genotypic frequency of 0,889 for the wild type genotype (wt/wt) and 0,111 for heterozygous (wt/\*1B). We did not find homozygote individuals for the (\*1B/\*1B) genotype in 253 healthy Chileans. The allelic frequency was 0,945 for the wild type allele (wt) and 0,055 for mutated allele (\*1B).

The statistic analysis to establish the relation among genotype and pharmacokinetic parameters of 32 individuals (28 wt/wt and 4 wt/\*1B) did not show a significant statistically association. It will be necessary to analyze a higher number of subjects treated with the drug to establish rapid or poor Zolpidem metabolizers. Alternatively a pharmacokinetic study can be restored in a group previously identified as carriers of mutated allele. It is important to stand out that the final purpose of pharmacogenetics is the establishment of individual answers, therefore, the finding of wt/\*1B genotype subjects together with their plasma levels of Zolpidem could permit us to have an useful tool to fit the drug posology.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano está constante e inevitablemente expuesto a moléculas químicas extrañas (xenobióticos), las que incluyen sustancias presentes en la naturaleza, como alcaloides, toxinas producidas por hongos, plantas y animales, productos de pirolisis en alimentos cocidos, y también, sustancias químicas sintetizadas por el hombre, como químicos de origen industrial y fármacos. Una gran cantidad de estas moléculas son lipofílicas, por lo que pueden ser absorbidas fácilmente a través de la piel, de las mucosas gastrointestinal y pulmonar, alcanzando así la circulación sistémica. La capacidad del organismo para excretar estos compuestos, al ser lipofílicos es pobre, debido a que, una vez excretados por vía renal, tienden a ser reabsorbidos. Los organismos vivos han desarrollado entonces sistemas enzimáticos con el fin de convertir estas sustancias lipofílicas en compuestos hidrofílicos, para facilitar su excreción y así disminuir su vida media. Estas transformaciones químicas complejas presentes en el organismo se han denominado biotransformación y se asocian en general, a una pérdida de actividad y a un aumento del carácter hidrofílico de las moléculas, lo que favorece su excreción renal, debido a que, sin esta biotransformación estas moléculas se acumularían en los organismos dañándolos seriamente [Ioannides C, 2002; Parkinson *et al.*, 2008].

Los sistemas enzimáticos aptos para transformar los fármacos se encuentran en la mucosa intestinal (proteasas, lipasas, descarboxilasas), en el suero sanguíneo (esterasas), en los pulmones (oxidases), en el sistema nervioso (monooxidasas, descarboxilasas) y principalmente, en el hígado [Ioannides C, 2002; Parkinson *et al.*, 2008]. Es este órgano, el que lleva a cabo en mayor proporción la biotransformación de compuestos químicos, debido a sus características funcionales y estructurales, como la gran irrigación sanguínea hepática a través de la vena porta y arteria hepática (equivalente a un tercio del gasto cardíaco). Sus vasos sanguíneos y senos venosos contienen aproximadamente 500 mL de sangre y el endotelio de sus vasos sanguíneos posee fenestraciones que permiten el contacto estrecho entre la sangre y las células del parénquima hepático. Esto finalmente, posibilita la captación rápida de sustancias, en especial las lipofílicas [Guyton A, 2005] y de este modo, las moléculas son extraídas

de la circulación por las células hepáticas, alcanzando las enzimas de biotransformación presentes en las membranas de los retículos endoplasmáticos lisos o rugosos y en las mitocondrias.

Las reacciones de biotransformación sobre la molécula xenobiótica se pueden clasificar, considerando la actividad farmacológica que resulte de esta, en reacciones de *activación*, en las cuales el fármaco inactivo se transforma en el organismo en un derivado activo, denominándose a la molécula en cuestión profármaco o precursor. Puede ocurrir un *cambio de la actividad*, en cuyo caso el fármaco es transformado en un metabolito que puede ser más o menos activo o reacciones de *inactivación*, lo que implica la transformación del fármaco activo en un metabolito inactivo. Todas estas reacciones tienen, sin embargo, en común que los productos derivados de la biotransformación son más hidrosolubles que la molécula original.

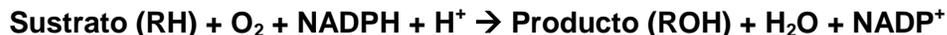
Las reacciones de biotransformación se dividen convencionalmente en dos grupos, llamados respectivamente de fase I y de fase II o conjugación [Ioannides C, 2002; Parkinson *et al.*, 2008]. Las reacciones de fase I pueden ser de oxidación, reducción o hidrólisis. Estas reacciones exponen o introducen un grupo funcional (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH o -COOH) a los cuales se pueden unir posteriormente moléculas endógenas polares. Son catalizadas por monooxigenasas como las flavoproteínas y las citocromo P450 NADPH reductasas. Las reacciones de fase II consisten en general en la unión de los grupos funcionales, ya sea, directamente a los compuestos químicos o indirectamente, a metabolitos de la fase I, con moléculas endógenas ionizables polares como el ácido glucurónico, glutatión, sulfatos, glicina u otros aminoácidos. Estas reacciones son catalizadas por enzimas microsomales (UDP-glucuronil transferasas), mitocondriales, citosólicas (sulfottransferasas, N-acetiltransferasas, metil-transferasas) o su combinación (glutatión-S-transferasas). La reacción más importante entre las de fase II es la conjugación de ácido glucurónico, en la forma de UDP, a un grupo fenol o hidroxilo en la molécula receptora. Estas reacciones producen compuestos biológicos altamente polares, por lo general inactivos [Ioannides C, 2002; Parkinson *et al.*, 2008].

Las oxigenasas son una clase de enzimas presentes en todos los tipos de células y tienen como sustrato el oxígeno molecular. No sólo transfieren electrones al oxígeno molecular, sino que además catalizan su inserción en moléculas orgánicas. Se

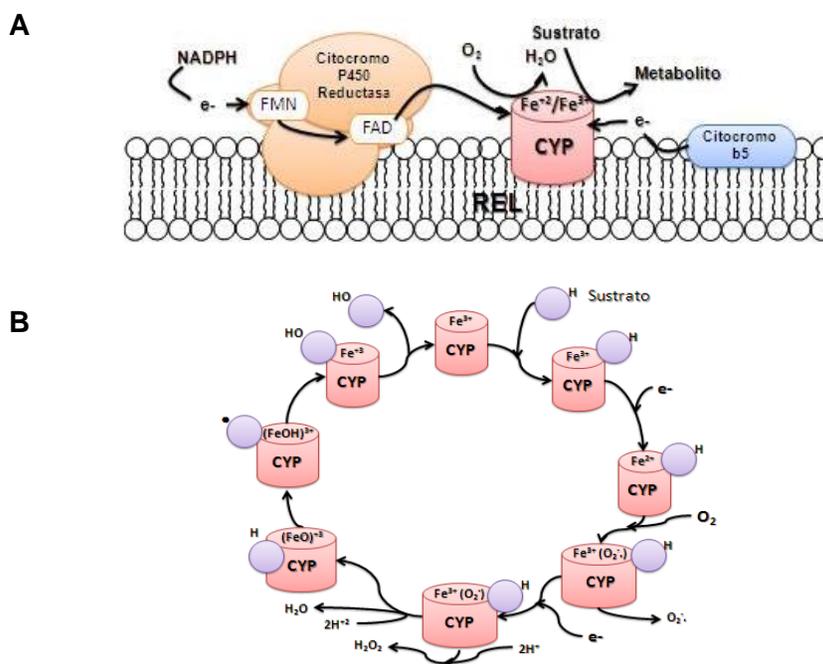
dividen en dos clases: las monooxigenasas u oxidasas de función mixta, que catalizan la inserción de un átomo de oxígeno en un sustrato orgánico, mientras que el otro átomo de la molécula es reducido a agua. Tienen la capacidad de catalizar tanto hidroxilaciones, como la ruptura oxidativa de enlaces C-N o C-O, y son las enzimas del retículo endoplasmático liso (microsomias) las más importantes en la fase I del metabolismo de xenobióticos [Nelson *et al.*, 1990; Guengerich F, 2005] y las dioxigenasas, que catalizan la inserción de dos átomos de oxígeno al sustrato [Nelson *et al.*, 1990]. Las monooxigenasas, que contienen un grupo hemo, son las más numerosas y se conocen bajo el nombre de citocromos P450 (CYP), siendo las enzimas más importantes para la biotransformación de xenobióticos [Nelson *et al.*, 1990]. Estas enzimas se han designado así, debido a que al ser reducidas por el ditionito de sodio se fijan al monóxido de carbono y desarrollan un pigmento rosa que tiene una  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción de 450 nm [Ioannides C, 2002; Parkinson *et al.*, 2008]. Se cree que esta enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas evolucionó en parte debido a la guerra biológica que han librado plantas y animales durante millones de años [González *et al.*, 1990].

Todas las enzimas del sistema CYP están ligadas a membranas facilitando su interacción con otras enzimas [Parkinson *et al.*, 2008; Guengerich F, 2005]. El hierro del grupo hemo presente en ella (como protoporfirina IX) está usualmente en estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y ligado a un residuo de cisteína (Cys) ubicado cerca del extremo carboxi-terminal de la proteína. Al reducirse a su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se une a un oxígeno molecular o a monóxido de carbono (Figura 1) [Parkinson *et al.*, 2008; Guengerich F, 2005; Paine *et al.*, 2005]. Durante la catálisis el CYP se une directamente al sustrato y al oxígeno molecular, pero no interactúa directamente con el NADPH o el NADH. En el retículo endoplasmático, los electrones son entregados desde el NADPH al citocromo P450 por medio de una flavoproteína, llamada NADPH-citocromo P450 reductasa. En esta flavoproteína los electrones son transferidos del NADPH al CYP vía FMN y FAD [Parkinson *et al.*, 2008; Shaik *et al.*, 2005]. El citocromo  $b_5$  puede donar el segundo de los electrones requeridos por el citocromo P450 aumentando la  $V_{\text{max}}$  y disminuyendo la  $K_m$  de las reacciones del CYP [Parkinson *et al.*, 2008; Shaik *et al.*, 2005].

La reacción básica catalizada por el CYP es una monooxigenación en la cual un átomo de oxígeno se incorpora en un sustrato (RH) y el otro se reduce a agua, con la ayuda de los equivalentes reductores derivados de NADPH, según el siguiente esquema [Parkinson *et al.*, 2008; Shaik *et al.*, 2005]:



El citocromo P450 puede catalizar diferentes reacciones de oxidación [Parkinson *et al.*, 2008; Ortiz de Montellano *et al.*, 2005]: hidroxilación de un carbono alifático o aromático, epoxidación de un doble enlace, oxigenación y N-hidroxilación de un heteroátomo (S-, N- e I-), desalquilación de un heteroátomo (O-, S-, y N-), transferencia de un grupo oxidativo, ruptura de enlaces éster y deshidrogenación.



**Figura 1. Citocromo P450: Localización y ciclo catalítico.** A) Localización: La enzima Citocromo P450 reductasa (que contiene FAD y FMN como grupos prostéticos, para la transferencia de electrones) y el citocromo b5 en la membrana del retículo endoplasmático liso junto con un esquema de la reacción básica que tiene lugar en este complejo enzimático. B) Ciclo catalítico básico: La unión del sustrato al citocromo P450 inicia la reacción que continúa con la reducción del Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Posteriormente el oxígeno molecular se une al citocromo P450 y uno de sus átomos es reducido a agua mientras que el otro se une al sustrato hidroxilándolo, lo que regenera el citocromo P450 a su estado original. Los electrones son donados por la citocromo P450 reductasa y/o el citocromo b5 [Paine *et al.*, 2005; Makris *et al.*, 2005].

## 1.1. Farmacogenética

La variabilidad interindividual en el metabolismo y respuesta a fármacos está determinada por factores genéticos, fisiológicos, fisiopatológicos y ambientales [Evans *et al.*, 1999; Pirmohamed *et al.*, 2003]. La farmacogenética es la disciplina que estudia las variaciones genéticas que causan respuestas variables a fármacos, presentes en transportadores, enzimas metabolizadoras y receptores de fármacos en los individuos, lo que permite el diseño de una terapia farmacológica personalizada, es decir, la elección del fármaco apropiado y su dosis correcta [Evans *et al.*, 1999; Ingelman-Sundberg M, 2001]. Es bien sabido que la mayoría de las enzimas de metabolismo de fase I y II de fármacos son polimórficas, causando ya sea la supresión, disminución (metabolizadores pobres) o aumento (metabolizadores ultrarrápidos) del metabolismo de fármacos y por consiguiente la genotipificación predictiva podría ser beneficiosa en el 10-20% de los fármacos usados, en especial en aquellos con un índice terapéutico estrecho o en los que se debe asegurar una concentración plasmática mínima para que cumplan el efecto requerido, como los antineoplásicos, antiepilépticos y anticonceptivos orales [Evans *et al.*, 1999; Ingelman-Sundberg M, 2001; Schuetz E, 2001].

Por otro lado, la diferencia entre individuos en la expresión o actividad de las enzimas CYP se debe a factores genéticos, fisiológicos, patológicos y/o ambientales [Guengerich F, 2005; Ingelman-Sundberg M, 2001; Schuetz E, 2001; Pirmohamed *et al.*, 2003]. El aumento de la actividad de esta, puede deberse a: duplicación del gen (sobreexpresión), la exposición a factores ambientales, como xenobióticos (inducción de la síntesis o activación de esta) o polimorfismos en los genes que codifican la enzima (aumento de la expresión o mayor actividad catalítica) [Ingelman-Sundberg M, 2001; Schuetz E, 2001]. La disminución de la actividad de esta, puede deberse a: polimorfismos en los genes que codifican la enzima (disminución de la expresión o menor actividad catalítica o falta total de actividad de la enzima), exposición a un factor ambiental, como una enfermedad infecciosa o xenobiótico (supresión de la expresión, inhibición o inactivación de la enzima) [Ingelman-Sundberg M, 2001; Schuetz E, 2001; Pirmohamed *et al.*, 2003]; por ejemplo la inducción de la síntesis de CYP por fenobarbital, ocasiona un aumento del metabolismo del etinilestradiol que provoca la

disminución de los niveles plasmáticos del fármaco y falla terapéutica del anticonceptivo lo que se traduce finalmente en embarazos no deseados [Janz *et al.*, 1974]. Otro caso lo constituye un estudio *in vivo* que muestra que el voriconazol causa un incremento en la concentración plasmática en voluntarios sanos, pero no cambios farmacodinámicos observados [Saari *et al.*, 2006].

Un polimorfismo se define como la presencia de alelos múltiples en una población determinada [Huxley J, 1995; Clark W, 1976] y puede causar la supresión, reducción, alteración o aumento en la actividad de un fármaco. El efecto neto de un polimorfismo en enzimas CYP sobre la farmacocinética de un fármaco dado dependerá del aclaramiento fraccional del mismo, es decir, de la importancia que tenga la isoforma de CYP en el metabolismo del fármaco [Ingelman-Sundberg M, 2001; Ingelman-Sundberg M, et al., 1999]. Una razón que puede explicar este hecho es que el metabolismo de un fármaco, a las bajas concentraciones de sustrato que se alcanzan en el organismo, a menudo se determina por la enzima P450 que tiene la mayor afinidad por el fármaco en cuestión [Ingelman-Sundberg M, 2001]. Se han descrito un gran número de polimorfismos en los genes que codifican los distintos citocromos.

Los seres humanos tienen 57 genes CYP y 58 pseudogenes ordenados en 18 familias y 42 subfamilias [Nebert *et al.*, 2002; Guéguen *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009]. Estas proteínas están ordenadas en familias y subfamilias según el porcentaje de identidad de su secuencia de aminoácidos. Las enzimas microsomales hepáticas del complejo CYP que realizan la biotransformación de xenobióticos pertenecen a tres familias, CYP1, CYP2 y CYP3. Las enzimas que comparten  $\geq 40\%$  de identidad se asignan a una familia particular designada con un número arábigo, mientras que aquellas enzimas que comparten  $\geq 55\%$  de identidad conforman una subfamilia designada con una letra (Tabla 1) [Parkinson *et al.*, 2008; Shaik *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 1994; Clarke S, 1998; Smith *et al.*, 1998].

**Tabla 1.** Enzimas CYP y su importancia relativa en la metabolización de fármacos en el hígado humano.

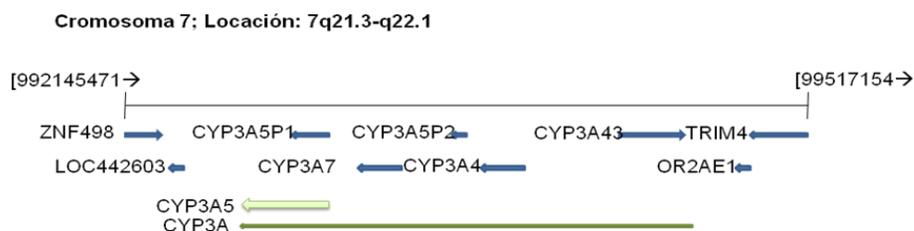
| CYP  | Abundancia en hígado (%) | Variabilidad Interindividual | Expresión             | Metabolismo de Fármacos (%) | Activación de precarcinógenos |
|------|--------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1A2  | 10                       | 30                           | Inducible polimórfico | 4                           | Sí                            |
| 2A6  | 5                        | 100                          | Polimórfico           | <1                          | Sí                            |
| 2B6  | 1                        | 50                           | Inducible             | <1                          |                               |
| 2C8  | <1                       | 30                           | Polimórfico           | <1                          |                               |
| 2C9  | 15                       | 30                           | Polimórfico           | 11                          | Sí                            |
| 2C19 | 4                        | 30                           | Polimórfico           | 6                           |                               |
| 2D6  | 4                        | 200                          | Polimórfico           | 25                          |                               |
| 2E1  | 10                       | 50                           | Inducible polimórfico | 4                           | Sí                            |
| 3A4  | 30                       | 80                           | Inducible polimórfico | 50                          | Sí                            |
| 3A5  | <1                       | ?                            | Inducible polimórfico | <1                          | ?                             |

[Shimada *et al.*, 1994; Clarke S, 1998; Smith *et al.*, 1998; <<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>>]

## 1.2. CYP3A4

La familia CYP3 tiene cuatro miembros en el ser humano (CYP3A4, 3A5, CYP3A7 y CYP3A43) [Finta *et al.*, 2000]. Es considerada la familia de citocromos P450 más importante en el metabolismo de xenobióticos debido a que CYP3A4 es la enzima con más altos niveles de expresión en el hígado y el intestino y a su amplia especificidad de sustrato [Guengerich F, 2005; Shimada *et al.*, 1994]. CYP3A7 es expresada principalmente en hígado fetal [Kitada *et al.*, 1987], mientras que CYP3A43 se expresa en bajos niveles, siendo encontrada en hígado, riñón, próstata y páncreas [Domanski *et al.*, 2001]. Las secuencias aminoacídicas muestran una similitud de secuencia y estructura. Todos los genes de esta familia se encuentran agrupados en el cromosoma 7q21-q22 y poseen 13 exones, conservando una estructura exón-intrón muy similar [Finta *et al.*, 2000]. Además de los cuatro genes mencionados se encuentran dos pseudogenes (CYP3AP2 y CYP3AP1) entre CYP3A4 y CYP3A7, y entre CYP3A7 y CYP3A5, respectivamente [Finta *et al.*, 2000] (Figura 2).

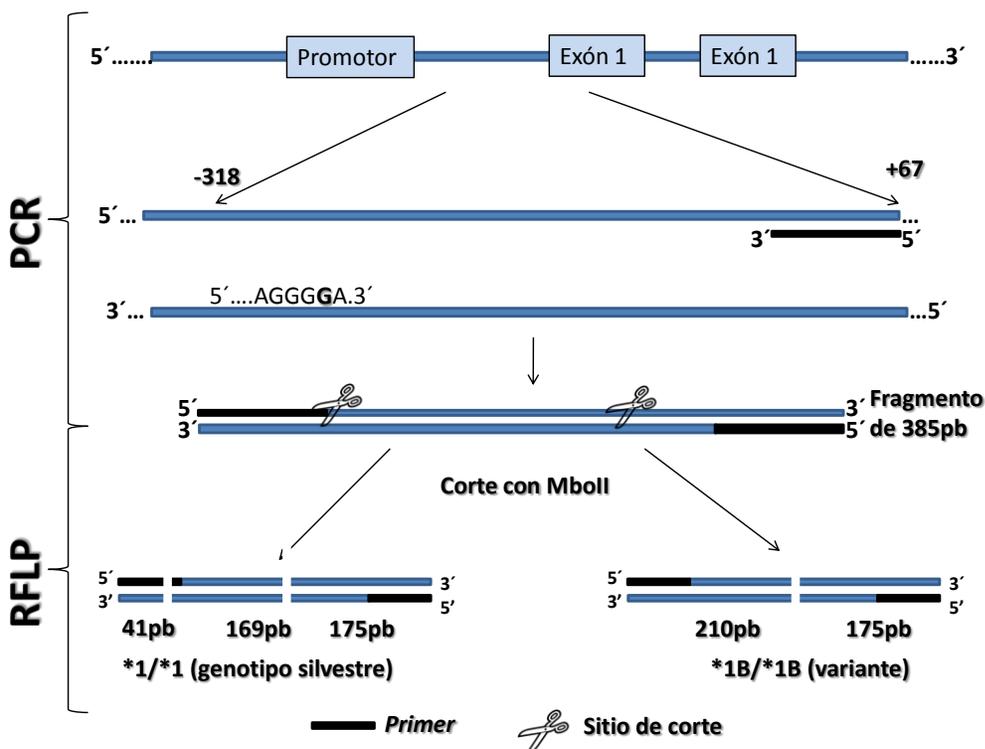
Las enzimas CYP3A constituyen aproximadamente el 30% del conjunto de enzima CYP hepática y son responsables del metabolismo de cerca de la mitad de los fármacos comúnmente utilizados, lo que implica que estas enzimas presentan una baja especificidad por el sustrato esto las hace más propensas a ser inhibidas reversiblemente o irreversiblemente por una amplia variedad de fármacos [Genguerich F, 2005; Shimada *et al.*, 1994; Thummel *et al.*, 1998]. Debido a su importancia en el metabolismo de fármacos es necesario conocer los factores que modulan su actividad, ya que existe una evidente variabilidad interindividual en ella. Esto explica diferencias de hasta 10 veces en el metabolismo *in vivo* de fármacos que son sustratos de estos citocromos [Guengerich F, 1999]. Estas enzimas son inducidas por numerosos fármacos, tales como: fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, rifampicina y dexametasona. Inhibidores conocidos de estas enzimas son los antimicóticos tipo imidazol (ketoconazol y clotrimazol), antibióticos macrólidos (eritromicina y troleandomicina), el gestodeno (un análogo de etinilprogesterona) y ciertas agliconas u otros compuestos presentes en el jugo del pomelo [Parkinson *et al.*, 2008; Guengerich F, 2005].



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura del locus CYP3A.** Arriba las entradas GenBank que cubren el locus indicado. Las flechas gruesas muestran la dirección de los genes CYP3A. GenelD: 1576 [NCBI: CYP3A4, 2010].

El gen CYP3A4 (Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4) está localizado en el cromosoma 7q21.3-q22.1, tiene 27.592 pares de bases y 13 exones [Finta *et al.*, 2000; Keshava *et al.*, 2004]. En su región 5' no traducida presenta un sitio de unión a AP-3, a p53, al factor nuclear del hepatocito 4, dos elementos de unión al factor nuclear del hepatocito 5, un elemento de respuesta a glucocorticoide y un elemento de respuesta a estrógeno [Hashimoto *et al.*, 1993]. La proteína correspondiente es conocida también como CYP11A4/nifedipino oxidasa/NF-25/P-450-PCN1 [Guengerich F, 2005, Shimada *et al.*, 1994; Keshava *et al.*, 2004].

Uno de los polimorfismos, descrito por primera vez en el gen CYP3A4 asociado con cáncer avanzado de próstata, y denominado CYP3A4\*1B (nombre trivial CYP3A4-V), consiste en el cambio de un sólo nucleótido (A→G) en la posición -292 en la región promotora 5' (rs2740574), en un motivo de secuencia conocido como el elemento de respuesta específico para nifedipino [Rebeck *et al.*, 1994]. También, se ha descrito que es uno de los polimorfismos fármaco-relevantes [Plant *et al.*, 2003] (Figura 3). *In vitro* exhibe dos veces menor actividad enzimática que el genotipo común CYP3A4 wt/wt [Amiramini *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002], aunque estudios *in vivo* no han demostrado que la variante CYP3A4\*1B esté asociada a disminución de la actividad enzimática [Wandel *et al.*, 2000]. Para hispano-americanos se ha informado frecuencias del alelo mutado de 9,3% [Ball *et al.*, 1999] y de 11% [Paris *et al.*, 1999] (Tabla 2).



**Figura 3. Esquema del sitio de corte de la enzima de restricción *MbolI*.** Identificación del polimorfismo 5'PR del gen CYP3A4 (Figura adaptada de Cavalli *et al.*, 2001).

**Tabla 2.** Frecuencias genotípica y alélicas CYP3A4\*1B en otras poblaciones.

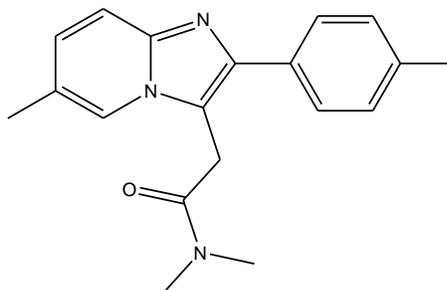
| Grupo étnico         | n   | F. alélica |       | F. genotípica |        |         |
|----------------------|-----|------------|-------|---------------|--------|---------|
|                      |     | wt         | *1B   | wt/wt         | wt/*1B | *1B/*1B |
| Hispanos             | 44  | 0,977      | 0,023 | 0,955         | 0,045  | 0,000   |
| Europeos             | 120 | 0,975      | 0,025 | 0,950         | 0,050  | 0,000   |
| Asiáticos            | 90  | 1,000      | 0,000 | 1,000         | 0,000  | 0,000   |
| África sub-sahariana | 118 | 0,254      | 0,746 | 0,034         | 0,441  | 0,525   |
| Afroamericanos       | 28  | 0.321      | 0.679 | 0,071         | 0,500  | 0,429   |

[NCBI, SNP, rs2740574, <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2740574](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2740574)>]

### 1.3. Zolpidem

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 40% de la población mundial sufre algún tipo de problema a la hora de dormir [Roth *et al.*, 2003]. Para combatir esta alteración del sueño las benzodiazepinas, tales como el triazolam o midazolam, fueron el tratamiento de elección a corto plazo por muchos años, pero tienen efectos adversos asociados, tales como, dependencia y síndrome de abstinencia. Los nuevos hipnosedativos incluyen Zolpidem, zeleplon y zopiclona. Estos son preferidos sobre las benzodiazepinas porque es menos probable que causen tolerancia y son tan eficaces como éstas [Nowell *et al.*, 1997; Hoehns *et al.*, 1993; Langtry *et al.*, 1990].

Zolpidem es un efectivo inductor de sueño o hipnótico, agonista del componente benzodiazepínico (BZ) del complejo receptor GABA<sub>A</sub> y tiene relativa selectividad por el subtipo BZ-1 (omega-1) [Salva *et al.*, 1995], pero no está relacionado estructuralmente a las benzodiazepinas. Presenta una buena absorción y una vida media muy corta, es un fármaco de la familia imidazopiridina, disponible en el mercado farmacéutico en dosis de 5 mg y 10 mg en la forma de comprimidos recubiertos de liberación convencional y en dosis de 12,5 mg de liberación modificada, para ser administradas por vía oral (Figura 4). Zolpidem presenta débiles propiedades anticonvulsivantes y miorrelajantes y se usa preferentemente en el insomnio transitorio y de corto plazo [Salva *et al.*, 1995; Harrison *et al.*, 2005].



**Figura 4. Estructura de Zolpidem.** N, 6-trimetil-2-p-tolilimidazo [1,2-a] piridina -3-acetamida L-(+).

Las características farmacocinéticas de Zolpidem demuestran una rápida y buena absorción cuando se lo administra por vía oral a voluntarios sanos. La concentración plasmática máxima se alcanza entre las 0,5 y 3 horas después de su administración. A las dosis terapéuticas tiene una farmacocinética lineal y no se modifica luego de la administración repetida. Su biodisponibilidad absoluta es aproximadamente de 70% para dosis de 5 mg a 20 mg. Su distribución es adecuada presentando una unión a proteínas plasmáticas de  $92 \pm 0,1\%$  y un volumen de distribución en el adulto de  $0,54 \pm 0,02$  l/kg que disminuye a  $0,34 \pm 0,05$  L/kg en los más ancianos. Luego de los 45 minutos de su administración se encuentra 80% a 90% de las dosis en SNC; tiene además alta afinidad por los tejidos granulares y grasos [Drover D, 2004; Greenblatt *et al.*, 2006; Weinling *et al.*, 2006].

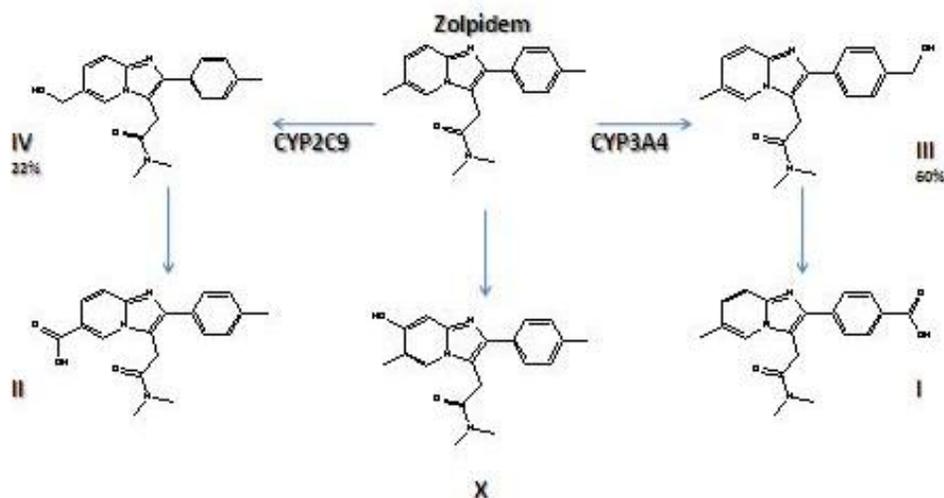
La biotransformación de la droga es hepática, aproximadamente el 60% de la biotransformación del Zolpidem es llevada a cabo por CYP3A4 [Von Moltke *et al.*, 1999], siguiendo 4 vías principales y, como resultado final, se obtienen 10 metabolitos inactivos. 1) Oxidación del grupo benzilo, primero una hidroxilación formando el metabolito III, luego, una oxidación del grupo benzol, formando un ácido carboxílico (metabolito I), responsable de la metabolización de alrededor de 51,5% de la dosis. El metabolito resultante se elimina por la orina. 2) Oxidación del grupo imidazopiridínico con formación de otro ácido carboxílico (metabolito II), el 11,5% de la dosis administrada se metaboliza por esta vía. 3) Oxidación del grupo amida (esta vía metabólica no fue encontrada en seres humanos). 4) Hidroxilación del grupo imidazopiridínico, con el resultado del metabolito X, encontrado sólo en seres humanos (Figura 5) [Pichard *et al.*, 1995; Von Moltke *et al.*, 1999].

Luego de 15 días de administración diaria de 20 mg por vía oral, la vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) de Zolpidem en voluntarios sanos es de 1 hora 50 minutos. Entre 79% y 96% de la dosis aparecen en forma de metabolitos inactivos en bilis, heces y orina; la eliminación renal es de 48% a 67% de la dosis oral dentro de las primeras 24 horas [Bianchetti *et al.*, 1988; Pichard *et al.*, 1995; Drover D, 2004; Greenblatt *et al.*, 2006; Weinling *et al.*, 2006].

Hay evidencia de efectos adversos dosis-relacionados con el uso de Zolpidem, particularmente ciertos eventos del SNC; éstos podrían en teoría ser menores si se toma el producto inmediatamente antes de acostarse o ya en la cama y ocurren más frecuentemente en pacientes ancianos; estos son: somnolencia diurna, reducción de la alerta, confusión, fatiga, cefalea, mareos, debilidad muscular, alteración de la marcha o diplopía y reacciones paradójicas o de tipo psiquiátrico. Estos fenómenos ocurren predominantemente al inicio de la terapia. La incidencia de efectos adversos fue de 6% en pacientes que recibían una dosis de 10 mg y de 23,3% en quienes recibían 20 mg. Ocasionalmente se han informado otros efectos como: alteraciones gastrointestinales, cambios en la libido, astenia, o reacciones cutáneas [Drover D, 2004; Greenblatt *et al.*, 2006; Weinling *et al.*, 2006].

Von Moltke y colaboradores en el año 1999 determinaron, por estudios *in vitro*, que la biotransformación de Zolpidem es realizada por CYP3A4 (60%), CYP2C9 (22%), CYP1A2 (14%), CYP2D6 y CYP2C19 (menos del 3%) (Figura 5). Olubodun y colaboradores en el 2003 estudiaron si la farmacocinética de Zolpidem era modulada por la testosterona. Para esto administraron 5 mg de Zolpidem por vía oral a voluntarios sanos jóvenes y ancianos de 22 a 42 años y de 61 a 85 años, respectivamente. Ellos observaron que el clearance fue menor entre los hombres, la  $C_{m\acute{a}x}$  y  $t_{1/2}$  fueron mayores para ancianos que jóvenes, respectivamente. Entre las mujeres, para las ancianas el clearance fue menor y la  $C_{m\acute{a}x}$  fue mayor que en las jóvenes y el  $t_{1/2}$  no había diferencia. Sólo en los hombres se observó una clara correlación entre el clearance y la cantidad de testosterona libre en el plasma.

A pesar que se han realizado estudios *in vitro* que demuestran que la biotransformación es realizada por CYP3A4 (60%) y CYP2C9 (22%), aún no se demuestra que la presencia del polimorfismo de CYP3A4\*1B altere efectivamente los parámetros farmacocinéticos en humanos sometidos a monodosis o tratamiento prolongado de Zolpidem.



**Figura 5. Biotransformación de Zolpidem.** Según estudios *in vitro* en microsomas y citosol de hepatocitos humanos realizados por Pichard en el año 1995 y Moltke en el año 1999 [Adaptación de Pichard *et al.*, 1995; Von Moltke *et al.*, 1999].

## 2. HIPOTESIS

*“El polimorfismo CYP3A4\*1B afecta los parámetros farmacocinéticos de Zolpidem, en voluntarios sanos sometidos a una monodosis del medicamento, causando la disminución de su metabolismo, lo que se traduce en un aumento de la concentración plasmática máxima, del tiempo de vida media, del área bajo la curva y disminución de su constante de eliminación”.*

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia del polimorfismo CYP3A4\*1B en un grupo de voluntarios sanos sometidos a una monodosis de Zolpidem, y asociar la presencia de estas variantes a cambios en sus parámetros farmacocinéticos más relevantes.

## 4. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 4.1. Implementar la detección de las variantes genéticas generadas por la presencia del polimorfismo CYP3A4\*1B, mediante PCR convencional y digestión con enzimas de restricción.
- 4.2. Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo CYP3A4\*1B en una muestra de población chilena sana, hombres y mujeres.
- 4.3. Establecer la frecuencia del polimorfismo CYP3A4\*1B en un grupo de voluntarios sanos sometidos a una monodosis de Zolpidem.
- 4.4. Determinar los niveles plasmáticos de Zolpidem mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de modo de analizar su farmacocinética en el grupo de estudio.
- 4.5. Relacionar por métodos estadísticos apropiados, los diferentes genotipos del polimorfismo genético CYP3A4\*1B y los parámetros farmacocinéticos: concentración plasmática máxima, tiempo de vida media, área bajo la curva y constante de eliminación.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Materiales

En la extracción de sangre periférica y purificación del ADN se utilizó un sistema comercial de purificación de ADN genómico de sangre periférica, (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Para la PCR se utilizaron partidores, agua DPC, dNTPs, *Taq* ADN Polimerasa, Tris-HCl, KCl y cloruro de magnesio (Invitrogen, Brasil). Marcador de peso molecular 100-1000pb Hyperladder IV (Bioline, Taunton, MA, USA). La purificación de los productos de PCR se realizó con un sistema comercial de purificación, FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen). En el estudio de los fragmentos de restricción de largo polimórfico basado en PCR (PCR-RFLP) se utilizó la enzima de restricción *MboII* (Fermentas, Hanover, USA). Se observó el patrón de banda en geles de agarosa y poliácridamida (Bioline, Taunton, MA, USA).

Se administró a los voluntarios una monodosis de Somno® (Zolpidem) que fue adquirido en el comercio establecido.

En la determinación de la concentración plasmática de Zolpidem se utilizó Zolpidem (Materia prima de Laboratorio Saval trazado respecto a un estándar primario), mirtazapina (Materia prima de Laboratorio Recalcine trazado respecto a un estándar primario), fosfato dihidrogeno de potasio y acetonitrilo (Merck, Santiago, Chile).

### 5.2. Metodología

#### 5.2.1. Reclutamiento de los Voluntarios

Se estudió la frecuencia del polimorfismo de CYP3A4\*1B, en población chilena sana (253 personas) y se seleccionaron voluntarios (32 personas) para el estudio farmacocinético que se realizó en el IFT con el medicamento Zolpidem. Estos individuos debieron cumplir con los criterios de inclusión y exclusión detallados más adelante.

## 5.2.2. Análisis Genotípico

### 5.2.2.1. Extracción de sangre periférica y purificación del ADN

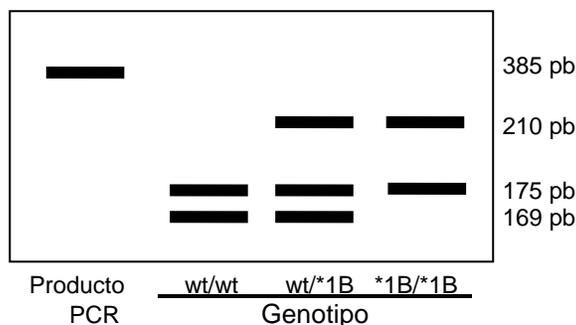
Luego de firmar un consentimiento informado y completar una ficha de antecedentes familiares (Anexo 1), se tomaron muestras de sangre periférica de todos los voluntarios y se aisló el ADN de leucocitos periféricos utilizando el método de Miller *et al.*, (1988) adaptado en el laboratorio o mediante un sistema comercial de purificación de ADN genómico, para realizar posteriormente el procedimiento de PCR-RFLP para el estudio del polimorfismo propuesto.

### 5.2.2.2. Determinación de la frecuencia genotípica y alélica de CYP3A4\*1B

Se utilizó el método de Cavalli *et al.*, 2001 para amplificar la región 5'PR de CYP3A4, que consistió en realizar una PCR con los partidores: *Forward* (5'-GGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGGA-3') y *Reverse* (5'-CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG-3'). Se amplificó la región promotora 5' del gen humano CYP3A4 (nucleótidos -318 a +67) produciendo un amplicón de 385 pb (Figura 6) de longitud que contiene un sitio de corte polimórfico (posición 41) y otro constitutivo (posición 210) para la enzima de restricción *MbolI*. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, con una concentración de 2,5  $\mu$ g de ADN, 2,0  $\mu$ M de cada partidor, 10 mM de dNTPs, 125 U de *Taq* ADN Polimerasa, tampón 10X (20 mM Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM KCl) y cloruro de magnesio 6 mM. El protocolo de la PCR consta de un paso inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno compuesto de tres fases: de desnaturación a 95 °C durante 60 segundos, de apareamiento a 63 °C durante 60 segundos y de extensión a 72 °C por 60 segundos. Por último se completa la reacción con un ciclo final a 72 °C durante 7 minutos.

Posteriormente, el amplicón fue sometido a digestión durante 2 horas con la enzima *MbolI*. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 16  $\mu$ L, de los cuales 5  $\mu$ L corresponden al producto de PCR y 5 U de enzima de restricción *MbolI*. Se espera obtener, para los sujetos homocigotos para el genotipo silvestre (wt/wt) dos fragmentos de 175 y 169 pb, para los homocigotos del polimorfismo (\*1B/\*1B) dos

fragmentos de 210 y 175 pb y finalmente, para el genotipo heterocigoto (wt/\*1B) se obtienen tres fragmentos de 210, 175 y 169 pb. Estos fragmentos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 16,0% (Figura 6).



**Figura 6. Representación esquemática del patrón de bandas del producto de la reacción de la PCR y de la digestión del producto de la PCR con la enzima de restricción *MbolI*.**

Posteriormente, los productos de PCR se purificaron mediante el sistema comercial y se enviaron a secuenciar a al servicio de secuenciación del departamento de ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, con el fin de corroborar que la región amplificada era la correspondiente a CYP3A4.

### **5.2.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg y Porcentaje de Mezcla Amerindio caucásica (% $M_{A-C}$ )**

Se determinó si la presencia del polimorfismo CYP3A4\*1B en la población chilena sana cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Para esto se procedió a calcular por conteo directo de cada alelo (wt y \*1B, respectivamente) y aplicar la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1 \quad \text{Donde } p \text{ es igual a wt y } q \text{ es igual a } *1B.$$

Si wt/wt : wt/\*1B : \*1B/\*1B aparecen en una relación  $p^2 : 2pq : q^2$  y al sumarlos obtenemos la unidad, entonces se considera que se encuentran en equilibrio.

Para determinar el % de mezcla amerindio-caucásica (%M<sub>A-C</sub>), que permite establecer el nivel de mestizaje de la población, se determinó el grupo sanguíneo a todos los voluntarios y luego se calculó la frecuencia alélica para el sistema ABO, mediante al equilibrio Hardy-Weinberg (ecuación 2-4) y ecuación de Bernstein (ecuación 5-10) [Acuña M, *et al*, 2000] como se describe a continuación:

$$p^2 + 2pr + r^2 = (p + r)^2 = F[A] + F[O] \quad (2)$$

$$q^2 + 2qr + r^2 = (q + r)^2 = F[B] + F[O] \quad (3)$$

$$r^2 = F[O] \quad (4)$$

$$p = 1 - (F[B] + F[O])^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

$$q = 1 - (F[A] + F[O])^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

$$r = (F[O])^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

$$p' = p \left(1 + \frac{D}{2}\right) \quad (8)$$

$$q' = q \left(1 + \frac{D}{2}\right) \quad (9)$$

$$r' = \left(r + \frac{D}{2}\right) \left(1 + \frac{D}{2}\right) \quad (10)$$

Ecuación 2 a 3, Equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema ABO, donde F[A], F[B], F[O] es la frecuencia alélica para A, B y O, respectivamente. Luego al despejar p y q, se obtiene las ecuaciones de la 5 a la 7 para simplificar los cálculos. Entonces, si p+q+r=1, y se corrige la desviación D=1- (p+q+r) (ecuación 8-10).

Al reemplazar en las ecuaciones 5 a 7 con la frecuencias de A, B y O y calcular D. Luego, reemplazar en ecuaciones 8 a 10 se obtiene la frecuencia alélica para A, B y O de la población estudiada (Tabla 5). Finalmente, se reemplazó la frecuencia alélica en la ecuación 11.

$$\%M_{A-C} = \frac{|F.Población\ de\ estudio - F.Españoles|}{|F.Mapuches - F.Españoles|} \quad (11)$$

Donde F es la frecuencia alélica, F. Mapuche es igual a 1, F. Española es igual a 0,6465.

### **5.2.3. Farmacocinética de Zolpidem**

El estudio farmacocinético se realizó en el Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad del IFT, del Programa de Farmacología Molecular y Clínica del ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue sometido a autorización por el Comité de Ética para estudios en seres humanos de la Facultad de Medicina (Anexo 2).

#### **5.2.3.1. Voluntarios**

Se solicitó a todos los voluntarios su Consentimiento Informado y su autorización para tomar los exámenes de VIH (Anexo 3). A continuación, se seleccionó del grupo de población chilena sana un grupo de voluntarios sanos adultos originarios de Chile, cuyas edades fluctúen entre los 21 y 55 años, con apellidos hispanoamericanos a los cuales se les realizó un examen físico completo y análisis de laboratorio clínico, los cuales incluyeron: hemograma, VHS, orina completa, prueba de hepatitis B y C, VIH, *screening* de drogas de abuso, glicemia, uremia, proteinemia, fosfatasa alcalinas, bilirrubinemia, transaminasa oxálica y pirúvica y creatinemia, además, en el caso de las mujeres se les realizó un test de embarazo.

Se tomaron los siguientes criterios de selección e inclusión de los voluntarios para el estudio:

- a.** Grupo de hombres y mujeres sanos de edades entre 21 y 55 años con apellidos hispanoamericanos y masa corporal (IMC) entre 18 y 30.
- b.** No fumadores.
- c.** No consumidores de drogas de abuso ni de alcohol.
- d.** Sin alergias a medicamentos.
- e.** Sin terapias concomitantes y no haber ingerido fármacos a lo menos dos meses antes del estudio.
- f.** Con resultados de los exámenes de laboratorio en rangos normales y declarados aptos para el estudio por el médico después del examen físico.

Los voluntarios estuvieron en ayunas (mínimo 12 horas) e ingirieron una dosis oral única de un comprimido de 10 mg de Zolpidem con 250 mL de agua potable estando de pie. El fármaco es un producto aprobado y registrado en el Instituto de Salud Pública (ISP).

### **5.2.3.2. Recolección de muestras**

Enfermeras Universitarias recolectaron muestras de 5 mL de sangre en tubos de ensayo de vidrio, los cuales se secaron previamente en estufa después de agregarles 100  $\mu$ L de oxalato de potasio al 30%. Ello fue realizado a través de una bránula antebraquial provista de llave de tres pasos, la que se mantuvo permeable con solución de heparina sódica como anticoagulante.

Las muestras fueron obtenidas a los siguientes intervalos de tiempo en horas: tiempo 0 (antes de administrar la droga), y 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 10,0 horas post dosis. El plasma se obtuvo mediante agitación suave del tubo y centrifugación a 3.500 rpm por cinco minutos y posteriormente se almacenó en congelador a  $-40$  °C hasta el momento de su análisis.

### **5.2.3.3. Aspectos éticos y de seguridad**

- **Ética:** Los procedimientos empleados en los tratamientos a los voluntarios se realizaron respetando rigurosamente los acuerdos internacionales respecto a investigación de fármacos en seres humanos. Se dispuso de las autorizaciones éticas correspondientes y todos los procedimientos fueron realizados bajo las guías de buenas prácticas clínicas [Declaración de Helsinki 2008; FDA, Guidance for Industry 1996].
- **Seguridad:** Durante ambos procedimientos del estudio los voluntarios estuvieron en contacto con los médicos responsables del proyecto y en los días de tratamiento en que los voluntarios estuvieron recluidos 12 horas, fueron atendidos por todo un equipo biomédico del Centro. En la eventualidad de que se presentaran reacciones adversas al medicamento, dicha situación fue debidamente abordada por el médico responsable o Director.

#### **5.2.3.4. Determinación de la concentración plasmática de Zolpidem**

Se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección de fluorescencia, basado en el método de Nirogi *et al.*, 2006. Este método fue validado en el laboratorio y definido respecto a sensibilidad, especificidad, linealidad, recuperación, límites de detección, cuantificación, exactitud, precisión y reproducibilidad (intradías e interdías). El estándar interno utilizado fue mirtazapina a una concentración de 18 ng/mL.

La separación de los analitos se realizó en un equipo HPLC Shimadzu LC-20 AT, desgasificador DGU-20 As, auto-sampler SIL-20 A, módulo de comunicación CBM-20 A, detector de fluorescencia RF-10 A XL y horno de columna CTO-20 A. Se utilizó una columna C<sub>18</sub>, Shim-pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm) a 40 °C.

La fase móvil consistió en tampón fosfato 20 mM pH 3,0:acetonitrilo (70:30 v/v), a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL. Se detectó el analito a una longitud de onda de 320 nm y 388 nm, para excitación y emisión, respectivamente.

Los parámetros farmacocinéticos se determinaron con el programa estadístico pkexamine de stata 10.0.

#### 5.2.4. Análisis estadístico

La determinación del número de muestras representativas de la población Chilena para obtener un resultado estadísticamente significativo fue determinado con el programa estadístico nQuery Advisor 4.0. Para esto se consideró un  $\alpha$  de un 5%, las dos colas de la curva de Gauss, una potencia de 80%, y un rango de presencia de la variable en la población chilena entre 3 y 10%. Con ello se logró establecer un tamaño de muestra mínimo de 110 personas.

Para relacionar las variables farmacocinéticas con los genotipos estudiados, se utilizó el programa estadístico STATA 10. A los datos de los parámetros farmacocinéticos se aplicó una prueba de Shapiro Wilk, para determinar si éstos se comportaban de manera normal o no. Si se comportaban de manera normal se les aplicó un modelo de regresión lineal.

El modelo fue el siguiente:

$$Y = \alpha + \beta_1 \text{gen} + \beta_2 \text{genero} + \beta_3 \text{imc} + \beta_4 \text{edad} + e$$

Donde  $y$  es el parámetro farmacocinético,  $\alpha$  es el promedio cuando el resto de las incógnitas se hace 0,  $\beta_1$  a  $\beta_3$  son los pesos de cada variable ajustada en el modelo y  $e$  es el error.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis Genotípico

#### 6.1.1. Voluntarios

Se reclutaron 253 personas sanas a las que se informó en qué consistía el estudio. Estas personas leyeron y firmaron un consentimiento informado, posteriormente se les tomó una muestra de sangre periférica.

La población de estudio incluyó hombres y mujeres de mayores de 18 años y menores de 73 años. El promedio de edad fue de  $31,7 \pm 12,8$  años, con un índice de masa corporal de  $24,5 \pm 3,2$  Kg/m<sup>2</sup> (Tabla 3).

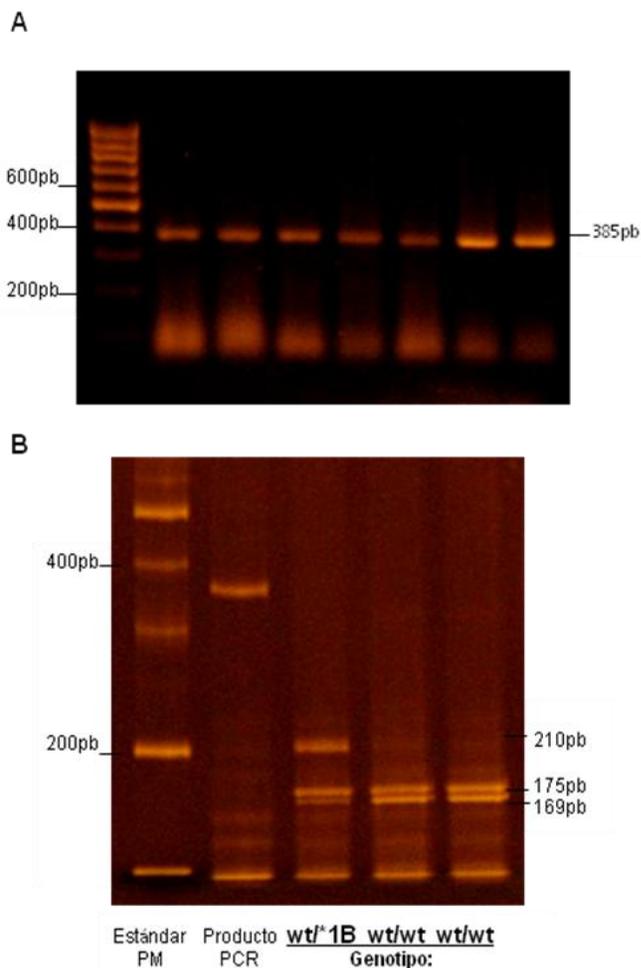
**Tabla 3.** Características de la población estudiada.

| Genero                  | Mujeres         | Hombres         | Total           |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Número                  | 155             | 98              | 253             |
| Edad / años             | $33,6 \pm 13,6$ | $28,7 \pm 10,8$ | $31,7 \pm 12,8$ |
| Peso / kg               | $61,8 \pm 9,1$  | $74,9 \pm 10,1$ | $66,8 \pm 11,4$ |
| Altura / m <sup>2</sup> | $1,60 \pm 0,06$ | $1,73 \pm 0,07$ | $1,65 \pm 0,09$ |
| IMC / Kgm <sup>-2</sup> | $24,1 \pm 3,3$  | $25,0 \pm 2,9$  | $24,5 \pm 3,2$  |

Los datos están expresados como promedios  $\pm$  DE. IMC: Índice de masa corporal

#### 6.1.2. Frecuencia del polimorfismo CYP3A4\*1B en un grupo de población Chilena sana

Se purificó el DNA y se procedió a determinar el genotipo de CYP3A4 de cada una de las personas (Figura 7) como se indica en la metodología y la frecuencia de la presencia del polimorfismo \*1B se determinó por conteo directo de cada una de los genotipos (Tabla 4).



**Figura 7. Patrón electroforético del polimorfismo genético estudiado:**

**A.** Productos de la PCR, banda a los 385 pb en un gel de agarosa al 1,2%.

**B.** Productos de la RFLP, digestión del producto de la PCR con la enzima de restricción *MbolI* en un gel de poliacrilamida al 16%. Estándar de peso molecular de 100 pb. Después de la digestión se observaron fragmentos de 175 y 169 pb para el genotipo silvestre, de 210, 175 y 169 pb para el genotipo heterocigoto para \*1B y no se obtuvo ningún voluntario que presentaron el genotipo homocigoto para \*1B.

**Tabla 4.** Frecuencia genotípica y alélica de la población chilena sana estudiada.

| Frecuencia | Genotípica |          |           | Alélica    |     |
|------------|------------|----------|-----------|------------|-----|
|            | wt / wt    | wt / *1B | *1B / *1B | wt         | *1B |
| N          | 225        | 28       | 0         | 448        | 28  |
| %          | 88,9       | 11,1     | 0         | 94,5       | 5,5 |
| Total      | 253 (100%) |          |           | 506 (100%) |     |

**A0,945/G0,055**

**N:** número de voluntarios que participan en el estudio. **wt** o **\*1:** Alelo silvestre o wild type, **\*1B:** Alelo mutado. **wt/wt:** genotipo silvestre, **wt/\*1B:** Heterocigoto \*1B, **\*1B/\*1B:** Homocigoto \*1B/\*1B.

Posteriormente, se purificaron seis productos de PCR de diferentes voluntarios (2 wt/wt y 4 wt/\*1B) como se indica en la metodología y se enviaron a secuenciar. Las secuencias nucleotídicas se compararon con las presentes en la literatura (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, BLAST Human Sequences, BLASTN>).

Se determinó que las seis secuencias nucleotídicas al ser comparadas en BLAST coincidían con CYP3A4 de *Homo sapiens*, con un E-value de  $1e^{-151}$  a  $7e^{-150}$  (NT\_007933.15, NW\_001839065.2, NW\_923574.1 y NT\_079595.2) (Tabla 5).

**Tabla 5:** Alineamiento de secuencias con base de datos de la NCBI.

| Muestra | E-Valor     | Región de Homología         | Identidad         | Gap           |
|---------|-------------|-----------------------------|-------------------|---------------|
| A       | $2e^{-150}$ | 38 bp at 5' side:<br>CYP3A4 | 312/319<br>(97%)  | 3/319<br>(0%) |
| B       | $2e^{-150}$ | 38 bp at 5' side:<br>CYP3A4 | 310/317<br>(97%)  | 2/317<br>(0%) |
| C       | $2e^{-151}$ | 38 bp at 5' side:<br>CYP3A4 | 309/315<br>(98%)  | 0/315<br>(0%) |
| D       | $1e^{-146}$ | 38 bp at 5' side:<br>CYP3A4 | 309/319<br>(96%)  | 4/319<br>(1%) |
| E       | $7e^{-150}$ | 37 bp at 5' side:<br>CYP3A4 | 311/319<br>(97%)  | 1/319<br>(0%) |
| F       | $2e^{-145}$ | 37 bp at 5' side:<br>CYP3A4 | 289/289<br>(100%) | 0/289<br>(0%) |

[<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>]

### 6.1.3. Equilibrio Hardy-Weinberg y porcentaje de mezcla amerindio caucásica (% $M_{A-C}$ )

Se determinó si la presencia del polimorfismo CYP3A4\*1B en la población chilena sana cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Para esto se procedió a calcular por conteo directo de cada alelo, wt y \*1B respectivamente. Al remplazar p y q en la ecuación (1), donde  $p = wt = 0,945$  y  $q = *1B = 0,055$  se obtiene un resultado igual a 1, por lo que el polimorfismo cumple con el equilibrio Hardy-Weinberg.

Para determinar el % de mezcla amerindio-caucásica (% $M_{A-C}$ ), que permite establecer el nivel de mestizaje de la población, se determinó a todos los voluntarios el grupo sanguíneo y luego se calculó la frecuencia alélica para el sistema ABO, mediante al equilibrio Hardy-Weinberg (ecuación 2-4) y ecuación de Bernstein (ecuación 5-10) (Tabla 6) [Acuña M, et al, 2000] como se describe en la metodología.

A continuación, al reemplazar en las ecuaciones 5 a 7 el número de personas con grupo A, B y O, se obtiene la frecuencia alélica para A, B y O de la población estudiada (Tabla 6). Finalmente, se reemplazó la frecuencia alélica en la ecuación 11, donde F. Población de estudio es igual a 0,7120 para el grupo sanguíneo O.

Se encontró que en la población estudiada hay aproximadamente un 18,5 % de mezcla amerindio-caucásica (Tabla 6).

**Tabla 6.** Distribución de los grupos sanguíneos, frecuencia alélica para el Sistema ABO y %Mezcla amerindio-caucásica.

| <b>Grupo Sanguíneo</b>    | <b>AB</b> | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>O</b> | <b>Total</b> |
|---------------------------|-----------|----------|----------|----------|--------------|
| Chilenos                  | 5         | 88       | 32       | 128      | 253          |
| <b>Frecuencia alélica</b> | <b>A</b>  |          | <b>B</b> |          | <b>O</b>     |
| Chilenos                  | 0,2051    |          | 0,0758   |          | 0,7120       |
| Españoles*                | 0,2864    |          | 0,0670   |          | 0,6465       |
| <b>%M<sub>A-C</sub></b>   | <b>A</b>  |          | <b>B</b> |          | <b>O</b>     |
| %                         | -11,3     |          | 0,9      |          | 18,5         |

[\*Acuña M, *et al.*, 2000]

## 6.2. Farmacocinética de Zolpidem

### 6.2.1. Voluntarios

De un grupo de voluntarios reclutados, se seleccionaron 32 voluntarios que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión para el estudio farmacocinético.

Se determinó que 28 presentan el genotipo silvestre para CYP3A4 (wt/wt) y 4 presentan el genotipo heterocigoto para \*1B (wt/\*1B). No se encontraron personas con genotipo homocigoto para \*1B (\*1B/\*1B) (Tabla 7 y Anexo 4).

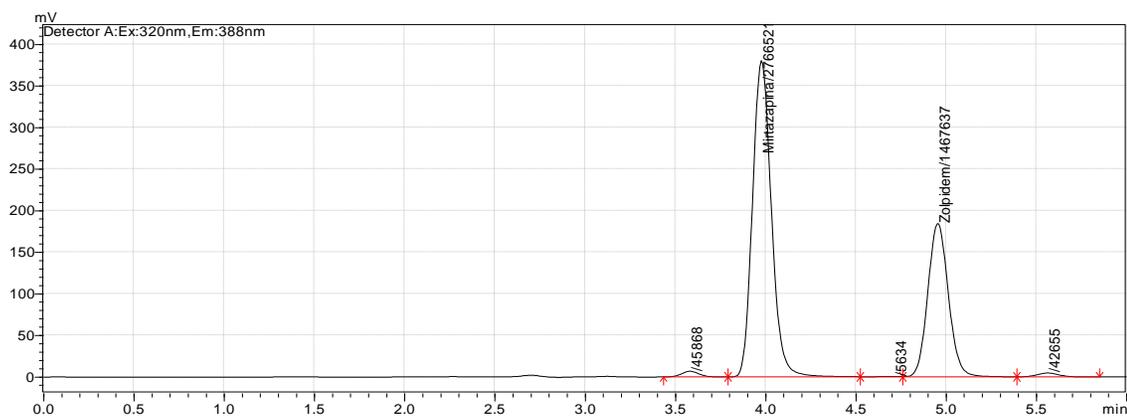
**Tabla 7.** Características demográficas de los voluntarios sometidos a una monodosis de Zolpidem.

| Genotipo                           | wt/wt       | wt/*1B    | *1B/*1B |
|------------------------------------|-------------|-----------|---------|
| Mujeres                            | 16          | 2         | 0       |
| Hombres                            | 12          | 2         | 0       |
| Total                              | 28          | 4         | 0       |
| Edad /años                         | 26 ± 7      | 26 ± 1    | 0       |
| Peso / Kg                          | 69 ± 11     | 68 ± 13   | 0       |
| Talla / m                          | 1,67 ± 0,09 | 1,7 ± 0,1 | 0       |
| IMC / Kg <sup>m<sup>-2</sup></sup> | 24 ± 2      | 23 ± 2    | 0       |

Los datos están expresados como promedios ± DE.

### 6.2.2. Determinación de la concentración plasmática de Zolpidem en el tiempo

A cada voluntario participante del estudio se le administró una monodosis de 10 mg de Zolpidem en ayuno de 12 horas. Se midió la concentración plasmática de Zolpidem en el tiempo (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 10,0 horas) mediante el HPLC. En la Figura 8 se observa un cromatograma de la detección de Zolpidem mediante HPLC. En la tabla 8 se muestra la concentración plasmática de Zolpidem promedio vs el tiempo para cada uno de los genotipos (Anexo 5 y 6, Figura 9).



**Figura 8. Cromatograma de detección de Zolpidem.** Se observa el tiempo de retención del estándar (mirtazapina) y del Zolpidem, aproximadamente 4 minutos y 5 minutos, respectivamente.

En la tabla 8 se observan los parámetros farmacocinéticos ( $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $ABC_{0 \rightarrow 10}$ ,  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  y  $K_e$ ) obtenidos de las curvas de la concentración de Zolpidem en el tiempo y discriminados según su genotipo.

Al analizar la curva farmacocinética promedio de los voluntarios con genotipo heterocigoto para CYP3A4\*1B (wt/\*1B) respecto los con genotipo *wild type* para CYP3A4\*1B (wt/wt) y comparar los parámetros farmacocinéticos, no se observan diferencias significativas entre ellos (Figura 9, Tabla 8).

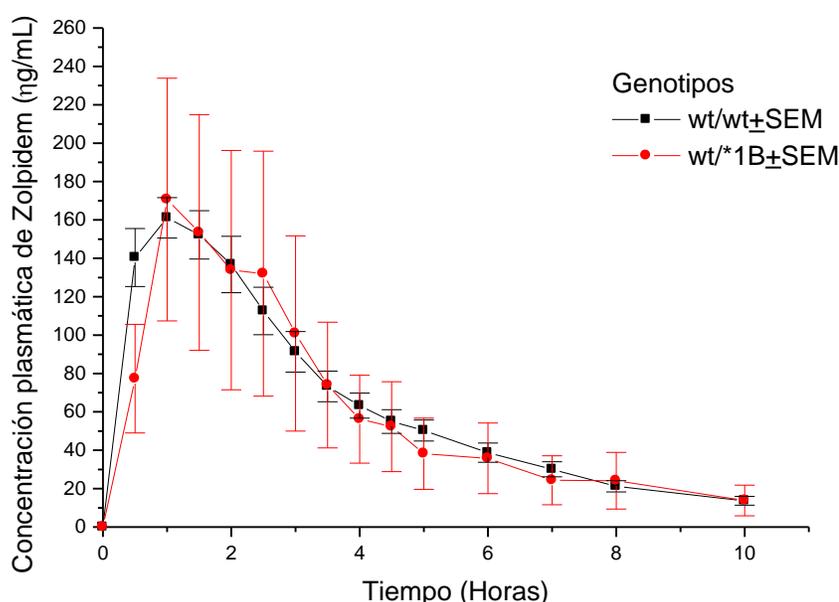


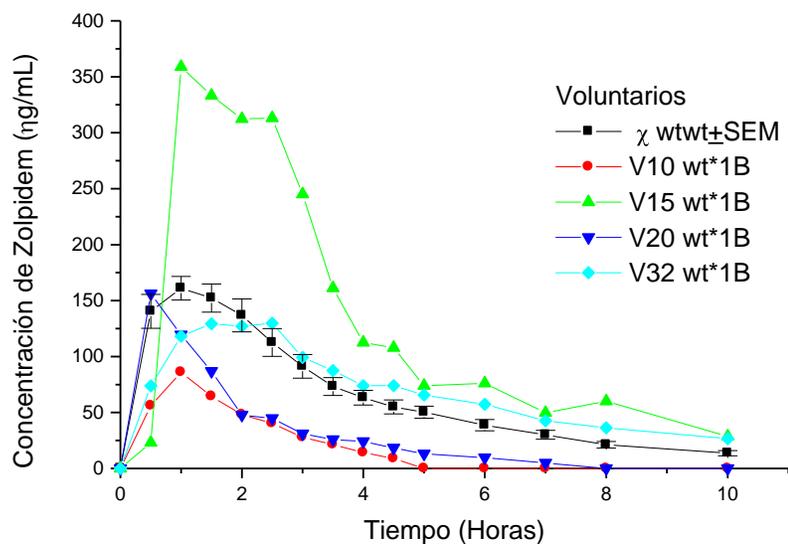
Figura 9. Curva farmacocinética según genotipo para CYP3A4.

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos de Zolpidem de los voluntarios según su genotipo.

|  | wt/wt     | wt/*1B    | Total     |
|--|-----------|-----------|-----------|
| Número de sujetos                      | 28        | 4         | 32        |
| $C_{m\acute{a}x}$ / ng/mL              | 199 ± 62  | 183 ± 121 | 197 ± 70  |
| $t_{m\acute{a}x}$ / h                  | 1,0 ± 0,5 | 1,3 ± 0,8 | 1,1 ± 0,5 |
| $K_e$ / h <sup>-1</sup>                | 0,3 ± 0,1 | 0,5 ± 0,3 | 0,3 ± 0,2 |
| $t_{1/2}$ / horas                      | 3 ± 2     | 2 ± 2     | 2 ± 2     |
| $ABC_{0 \rightarrow 10}$ / ng*h/mL     | 661 ± 304 | 610 ± 492 | 655 ± 323 |
| $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ / ng*h/mL | 745 ± 383 | 663 ± 553 | 735 ± 398 |

Los datos están expresados como promedios ± DE.  $C_{m\acute{a}x}$ : Concentración máxima,  $t_{m\acute{a}x}$ : tiempo en que se produce la  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $K_e$ : constante de eliminación,  $t_{1/2}$ : tiempo de vida media y  $ABC$ : Área bajo la curva.

Dado que no se observaron diferencias significativas al comparar los voluntarios con genotipo *wild type* con respecto a los con genotipo heterocigoto, se realizó la curva farmacocinética de los voluntarios que presentaban el genotipo heterocigoto para CYP3A4\*1B (*wt/\*1B*) para visualizar las diferencias individuales respecto de la curva farmacocinética promedio de los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4\*1B (*wt/wt*) (Figura 10). En esta figura se puede observar que el voluntario 15 tiene una  $C_{m\acute{a}x}$  (359 vs  $199 \pm 62$ ),  $ABC_{0 \rightarrow 10}$  (1.272 vs  $661 \pm 304$ ),  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  (1.406 vs  $745 \pm 383$ ) mayor, una  $K_e$  (0,2 vs  $0,3 \pm 0,1$ ) menor y sin diferencias en la  $t_{1/2}$  (3,06 vs  $3,0 \pm 2,0$ ) que los voluntarios con genotipo *wild type*, respectivamente y el voluntario 32 tiene una  $C_{m\acute{a}x}$  (129 vs  $199 \pm 62$ ) y  $K_e$  (0,15 vs  $0,3 \pm 0,1$ ) menor y un  $t_{1/2}$  (4,4 vs  $3,0 \pm 2,0$ ) mayor que los voluntarios con genotipo *wild type*, respectivamente y sin diferencias para los otros parámetros. En cambio, los voluntarios 10 y 20 presentan sus parámetros farmacocinéticos muy diferentes de lo esperado, incluso mucho menores que los *wild type* con  $C_{m\acute{a}x}$  (86 y 156 vs  $199 \pm 62$ ),  $ABC_{0 \rightarrow 10}$  (181 y 299 vs  $661 \pm 304$ ),  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  (188 y 302 vs  $745 \pm 383$ ) y  $t_{1/2}$  (0,7 y 0,95 vs  $3,0 \pm 0,2$ ) y mayor  $K_e$  (0,8 y 0,7 vs  $0,3 \pm 0,1$ ), respectivamente. Considerando que todos tienen un IMC similar, excepto el voluntario 10 que tiene un IMC menor por lo que se esperaría observar que la  $C_{m\acute{a}x}$  debería ser aún mayor, si consideramos que no influyen factores adicionales, tales como alteraciones en la absorción o polimorfismos en otros transportadores (Tablas 8 y 9).



**Figura 10. Comparación de la curva farmacocinéticas promedio para el genotipo silvestre versus las curvas farmacocinéticas para cada voluntario con genotipo heterocigoto.**

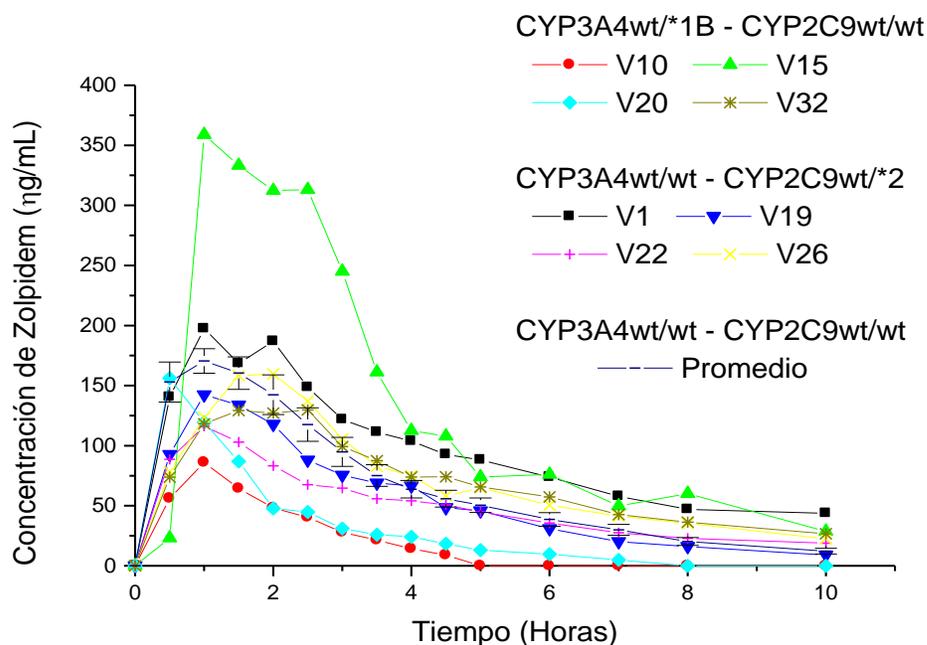
Luego, se comparó la influencia de la enzima CYP2C9 que biotransforma Zolpidem en un 22%. Específicamente se comparó el polimorfismo \*2 (CYP2C9\*2) con la variante wt, debido a que otros estudios en el laboratorio habían genotipificado a estos mismos voluntarios para este polimorfismo. El alelo silvestre o *wild type* es conocido como CYP2C9\*1, además existen dos alelos adicionales descritos, CYP2C9\*2 (rs1799853) y \*3 (rs1057910). En ambos alelos una sustitución de una base nitrogenada conlleva el cambio de un aminoácido por otro en la proteína. En el caso de CYP2C9\*2 (Arg144Cys), la mutación provoca que la variante CYP2C9\*2 muestra alrededor de un 12% de la actividad de la enzima *wild type*. En las poblaciones caucásicas se ha encontrado una frecuencia alrededor de un 19% para CYP2C9wt/\*2 y un 3% para CYP2C9\*2/\*2, similar a lo encontrado en el laboratorio (11,5% para wt/\*2 y un 0,4% para \*2/\*2, de 260 personas analizadas) [Yasar *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1995; García-Martín *et al.*, 2001].

Para correlacionar los voluntarios con genotipo *wild type* (wt/wt) con respecto a los con genotipo heterocigoto (wt/\*2) para CYP2C9\*2, se realizó la curva farmacocinética de los voluntarios que presentaban el genotipo CYP3A4wt/\*1B/2C9wt/wt y CYP3A4wt/wt/2C9wt/\*2, de modo de visualizar las diferencias individuales respecto de la curva farmacocinética promedio de los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4\*1B/2C9\*2 (Figura 11).

Entre los voluntarios con genotipo 3A4wt/\*1B/2C9wt/wt, se detectó que el voluntario 15 tiene una  $C_{m\acute{a}x}$  (359 vs  $206 \pm 63$ ),  $ABC_{0 \rightarrow 10}$  (1.2732 vs  $661 \pm 321$ ),  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  (1.406 vs  $726 \pm 386$ ) mayor y una  $K_e$  (0,2 vs  $0,3 \pm 0,1$ ) menor que los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4/2C9, respectivamente (Tabla 9). El voluntario 32 tiene una  $C_{m\acute{a}x}$  (130 vs  $206 \pm 63$ ),  $K_e$  (0,15 vs  $0,3 \pm 0,1$ ) menor y  $t_{1/2}$  (4,4 vs  $3,0 \pm 2,0$ ) mayor que los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4/2C9, respectivamente (Tabla 9). No se encontraron sin diferencias para los otros parámetros.

En cambio, en los voluntarios 10 y 20 sus parámetros farmacocinéticos son diferentes de lo esperado. En cuanto a la  $C_{m\acute{a}x}$  (86 y 156 vs  $206 \pm 63$ ),  $ABC_{0 \rightarrow 10}$  (181 y 299 vs  $661 \pm 321$ ),  $ABC_{0 \rightarrow \infty}$  (188 y 302 vs  $726 \pm 386$ ) y  $t_{1/2}$  (0,77 y 0,95 vs  $3,0 \pm 2,0$ ) son menores y para la  $K_e$  (0,8 y 0,7 vs  $0,3 \pm 0,1$ ) mayor que los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4/2C9, respectivamente (Tabla 9).

Entre los voluntarios con genotipo 3A4wt/wt/ 2C9 wt/\*2, los voluntario 1, 19, 22 y 26 presentan una menor  $C_{m\acute{a}x}$  (197, 142, 116 y 160 vs  $206 \pm 63$ ), similar o menor  $ABC_{0\rightarrow 10}$  ( 945, 533, 492 y 692 vs  $661 \pm 321$ ) y  $ABC_{0\rightarrow \infty}$  (1.433, 566, 635 y 796 vs  $726 \pm 386$ ) a excepci3n del voluntario 1, una  $K_e$  (0,1; 0,3; 0,1 y 0,2 vs  $0,3 \pm 0,1$ ) similar o menor y  $t_{1/2}$  (8, 3, 5 y 3 vs  $3 \pm 2$ ) similar o mayor que los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4/2C9, respectivamente (Tabla 9).



**Figura 11. Comparaci3n de curvas farmacocin3ticas seg3n genotipo CYP3A4/2C9.** Curva promedio para los voluntarios con genotipo CYP3A4wt/wt/ 2C9wt/wt, y la curva para cada voluntario con CYP3A4 wt/\*1B/ 2C9wt/wt y CYP3A4wt/wt/2C9 wt/\*2.

**Tabla 9.** Parámetros Farmacocinéticos de los voluntarios sometidos a una monodosis de 10 mg de Zolpidem según genotipo CYP3A4 y CYP2C9.

| Parámetros Farmacocinéticos           | wt*1B / wwt |      |      |      | wtwt / wt*2 |      |      |      | wtwt / wwt |       |
|---------------------------------------|-------------|------|------|------|-------------|------|------|------|------------|-------|
|                                       | 10          | 15   | 20   | 32   | 1           | 19   | 22   | 16   |            |       |
| <b>Genero</b>                         | 1           | 1    | 2    | 2    | 1           | 2    | 2    | 2    |            |       |
| <b>Edad</b>                           | 24          | 27   | 27   | 26   | 28          | 26   | 24   | 23   | 27         | ± 8   |
| <b>IMC</b>                            | 21          | 24   | 24   | 24   | 29          | 25   | 25   | 23   | 24         | ± 3   |
| <b>C<sub>máx</sub> / ng/mL</b>        | 86          | 359  | 156  | 130  | 197         | 142  | 117  | 160  | 206        | ± 63  |
| <b>t<sub>máx</sub> / h</b>            | 1,0         | 1,0  | 0,5  | 2,5  | 1,0         | 0,97 | 0,93 | 1,97 | 1,0        | ± 0,5 |
| <b>K<sub>e</sub> / h<sup>-1</sup></b> | 0,90        | 0,23 | 0,73 | 0,16 | 0,09        | 0,23 | 0,13 | 0,22 | 0,3        | ± 0,1 |
| <b>t<sub>½</sub> / horas</b>          | 0,77        | 3,06 | 0,95 | 4,44 | 7,97        | 2,49 | 5,34 | 3,26 | 3          | ± 2   |
| <b>ABC<sub>0-10</sub> / ng*h/mL</b>   | 181         | 1272 | 299  | 690  | 945         | 533  | 492  | 692  | 661        | ± 321 |
| <b>ABC<sub>0-∞</sub> / ng*h/mL</b>    | 188         | 1406 | 302  | 757  | 1433        | 566  | 635  | 766  | 726        | ± 386 |

**Vol.:** Voluntario. **Género:** 1= Mujer, 2= Hombre. **C<sub>máx</sub>:** Concentración máxima. **t<sub>máx</sub>:** Tiempo en que se alcanza la C<sub>máx</sub>. **K<sub>e</sub>:** Constante de eliminación. **t<sub>½</sub>:** tiempo de vida media. **ABC:** área bajo la curva. **∞:** infinito.

### 6.3. Análisis estadístico

Para relacionar las variables farmacocinéticas con los genotipos estudiados se aplicó una prueba de Shapiro Wilk a los datos de los parámetros farmacocinéticos (Anexo 5). Los datos no se comportaron de manera normal, debido a esto se transformaron a logaritmo. A cada parámetro farmacocinético transformado se aplicó una prueba de Shapiro Wilk nuevamente; la mayoría de los parámetros fueron normales, por lo tanto aplica una prueba paramétrica como la regresión lineal. Luego, a los datos transformados logarítmicamente se aplicó un modelo de regresión lineal ( $Y = \alpha + \beta_1 \text{gen} + \beta_2 \text{genero} + \beta_3 \text{imc} + \beta_4 \text{edad} + e$ ).

Cada coeficiente de regresión representa la pendiente de la variable. Un valor no significativo indica que no hay asociación estadística con el parámetro evaluado, es decir las pendientes entre estas variables son paralelas (si cambia una, la otra no cambia). Los signos negativos indican una relación negativa y los positivos en relación positiva, respectivamente.

Primero se aplicó la regresión lineal para el CYP3A4 ( $Y = \alpha + \beta_1 \text{CYP3A4} + \beta_2 \text{genero} + \beta_3 \text{imc} + \beta_4 \text{edad} + e$ ), en que los resultados se observan en la Tabla 10. Los análisis muestran que para el genotipo CYP3A4wt/\*1B no se aprecia efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros evaluados.

**Tabla 10.** Modelos de regresión lineal para los parámetros farmacocinéticos y el efecto de la presencia de la variante genética CYP3A4\*1B ajustado por edad, género e índice de masa corporal.

| Parámetro.             | Gen    | Coeficiente de regresión | Error Estándar | p-value      | IC 95%      |             |
|------------------------|--------|--------------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|
|                        |        |                          |                |              | IC inferior | IC superior |
| Ln C <sub>máx</sub>    | wt/*1B | -0,1752614               | 0,1512457      | <b>0,256</b> | -0,4850743  | 0,1345514   |
| Ln ABC <sub>0→10</sub> | wt/*1B | -0,2235485               | 0,2383156      | <b>0,356</b> | -0,711716   | 0,2646189   |
| Ln ABC <sub>0→∞</sub>  | wt/*1B | -0,2284546               | 0,2650415      | <b>0,396</b> | -0,7713676  | 0,3144583   |
| Ln K <sub>e</sub>      | wt/*1B | 0,154564                 | 0,2913424      | <b>0,600</b> | -0,4422239  | 0,7513519   |
| Ln t <sub>máx</sub>    | wt/*1B | 0,0850298                | 0,2740155      | <b>0,759</b> | -0,4762656  | 0,6463251   |

Luego, se aplicó la regresión lineal para CYP2C9 ( $Y = \alpha + \beta_1 \text{CYP2C9} + \beta_2 \text{genero} + \beta_3 \text{imc} + \beta_4 \text{edad} + e$ ), para CYP3A4 en conjunto con CYP2C9 ( $Y = \alpha + \beta_1 \text{CYP2C9} + \beta_2 \text{CYP3A4} + \beta_3 \text{genero} + \beta_4 \text{imc} + \beta_5 \text{edad} + e$ ) y para CYP3A4/2C9 ( $xi = \alpha + i \text{CYP3A4/2C9} + \beta_1 \text{CYP3A4} + \beta_2 \text{genero} + \beta_3 \text{imc} + \beta_4 \text{edad} + e$ ), los resultados se observan en la Tabla 11 (Anexo 6).

Los análisis muestran que para el genotipo CYP2C9wt/\*2, CYP3A4wt/\*1B y CYP2C9wt/\*2, y para CYP3A4wt/\*1B/ 2C9wt/\*2 no se aprecia efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros evaluados.

**Tabla 11.** Efecto de la presencia de la variante genética CYP3A4, CYP2C9, CYP3A4-CYP2C9 y CYP3A4/2C9 sobre los parámetros farmacocinéticos ajustado por edad, género e índice de masa corporal.

| Gen<br>Parámetro        | CYP3A4 | CYP2C9 | CYP 3A4 Y CYP2C9 |  | CYP3A4/2C9 |
|-------------------------|--------|--------|------------------|--|------------|
|                         |        |        | p-value          |  |            |
| Ln C <sub>máx</sub>     | 0,256  | 0,554  | 0,234 / 0,474    |  | 0,191      |
| Ln ABC <sub>0→10</sub>  | 0,356  | 0,211  | 0,420 / 0,247    |  | 0,846      |
| Ln ABC <sub>0→inf</sub> | 0,396  | 0,110  | 0,478 / 0,131    |  | 0,624      |
| Ln K <sub>e</sub>       | 0,600  | 0,065  | 0,720 / 0,077    |  | 0,366      |
| Ln t <sub>máx</sub>     | 0,759  | 0,169  | 0,649 / 0,164    |  | 0,218      |

## 7. DISCUSIÓN

Se sabe que el metabolismo de los sustratos de las enzimas de la subfamilia CYP3A y el nivel de expresión de estas enzimas en hígado, intestino entre otros tejidos tienen una gran variabilidad *in vivo* [Guengerich F, 2005; Shimada *et al.*, 1994]. Las variaciones genéticas conocidas podrían explicar entre un 10-20% de estos casos, sin embargo, faltan estudios que correlacionen los numerosos polimorfismos encontrados en los genes que codifican para la superfamilia de enzimas del CYP con las variaciones en los parámetros farmacocinéticos de fármacos [Guengerich F, 1999].

Se logró Implementar la PCR-RFLP para la detección de las variantes genéticas generadas por la presencia del polimorfismo CYP3A4\*1B. La ventaja de la técnica utilizada radica en que se amplifica la región promotora 5' del gen humano CYP3A4 produciendo un amplicón de 385 pb de longitud que contiene un sitio de corte polimórfico y otro constitutivo para la enzima de restricción *MbolI*. Al tener un sitio de corte constitutivo, éste funciona como control interno del corte de la enzima, asegurando la identificación correcta del genotipo.

Se consiguió caracterizar a la población chilena para el polimorfismo de CYP3A4 (CYP3A4\*1B) que consiste en un *SNP* presente en la región 5' del promotor del gen (-292) que al parecer produce alteraciones en la expresión, disminuyendo la cantidad de enzima presente [Rebbeck *et al.*, 1994; Plant *et al.*, 2003; Amiramini *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002].

Se secuenció seis productos de PCR de diferentes voluntarios. Las secuencias nucleotídicas se compararon con las bases de datos de la NCBI y se logró corroborar que la región amplificada correspondía a la región promotora del gen de CYP3A4.

La frecuencia genotípica del polimorfismo obtenida en 253 chilenos sanos fue de 88,9% para el genotipo silvestre (wt/wt), 11,1% para el heterocigoto (wt/\*1B) y no se encontraron individuos homocigotos mutados (\*1B/\*1B), aún aumentando el número de sujetos a más del doble de lo originalmente calculado como tamaño muestral (110), y considerando que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. La frecuencia alélica fue de un 0,945 para el alelo silvestre (\*1) y un 0,055 para el alelo

mutado (\*1B), similar a la reportada para población caucásica e hispana [Ball *et al.*, 1999 y Paris *et al.*, 1999]. Este hecho podría atribuirse a la selección de voluntarios con un porcentaje de mezcla amerindio caucásica de un 18,5%, es decir, con escasa ascendencia amerindio.

Se logró determinar mediante HPLC los niveles plasmáticos de zolpidem. Estos fueron similares a los que se describen en la literatura y las concentraciones plasmáticas alcanzadas están dentro del rango terapéutico. Los parámetros farmacocinéticos analizados fueron  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{1/2}$ , ABC y  $K_e$ . La farmacocinética de zolpidem se comporta de acuerdo a lo ya establecido, a mayor  $K_e$  menor  $C_{m\acute{a}x}$ , ABC y  $t_{1/2}$ , y viceversa. Se obtuvieron parámetros farmacocinéticos similares a lo que describe la literatura para la  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{1/2}$ , ABC y  $K_e$ , cuando se administra 10 mg de zolpidem a voluntarios sanos con IMC normales (20-25 Kg $m^{-2}$ ) [Saari *et al.*, 2006].

En este trabajo se postuló que los polimorfismos CYP3A4\*1B podrían explicar la variabilidad observada en los parámetros farmacocinéticos de Zolpidem, aunque sin olvidar que las variaciones en los parámetros farmacocinéticos también podrían explicarse además por otros factores fisiológicos, patológicos y medio ambientales así como por interacciones entre medicamentos. Al respecto el análisis estadístico para establecer la relación entre el genotipo y los parámetros farmacocinéticos de las 32 personas estudiadas (28 para wt/wt y 4 para wt/\*1B) no mostró una asociación estadísticamente significativa.

Al no observar diferencias significativas en la comparación de los voluntarios con genotipo *wild type* con respecto a los con genotipo heterocigoto, se realizó la curva farmacocinética de los voluntarios que presentaban el genotipo heterocigoto para CYP3A4\*1B (wt/\*1B) con el fin de visualizar las diferencias individuales respecto de la curva farmacocinética promedio de los voluntarios con genotipo *wild type* para CYP3A4\*1B (wt/wt) (Figura 10). Se puede observar que el voluntario 15 tendría una metabolización más lenta (mayor  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC; menor  $K_e$ ) que los voluntarios con genotipo *wild type*. En cambio, el voluntario 10 y 20 tendrían una metabolización más rápida (menor  $C_{m\acute{a}x}$  y ABC; mayor  $K_e$ ), resultado muy diferente de lo esperado considerando que tienen similar IMC y si suponemos que no existen problemas de absorción o polimorfismos en otros transportadores.

Luego, se comparó la influencia de otra enzima que participa en la biotransformación de Zolpidem, como es CYP2C9, responsable del 22% de la metabolización de este fármaco. Se analizó específicamente el polimorfismo \*2, debido a que los voluntarios estaban genotipificados para este polimorfismo. Al correlacionar los voluntarios con genotipo *wild type* (wt/wt) con aquellos que presentan el genotipo heterocigoto (wt/\*2), con respecto a sus parámetros farmacocinéticos, no se encontraron diferencias que permitan predecir estadísticamente los niveles plasmáticos de Zolpidem. Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas, sí existe una tendencia que sólo podría ser corroborada disponiendo de un mayor número de individuos heterocigotos tratados con el fármaco y con mutados, de modo de establecer la presencia de metabolizadores rápidos o lentos de Zolpidem, o en su defecto realizando un estudio dirigido que analice los parámetros farmacocinéticos de Zolpidem exclusivamente en individuos portadores del alelo mutado. En este aspecto, es necesario destacar que en muchos genes que presentan este tipo de variantes de manera heterocigota el alelo activo tiende a suplir la función del alelo deficiente lo que puede explicar la falta de diferencias significativas. Ello se podría dilucidar si en estudios posteriores se pudiera disponer de individuos doble mutados (homocigotos) en los que el efecto debería ser más claro.

No hemos encontrado estudios en la literatura que describan la farmacocinética de Zolpidem en la población chilena. Tampoco se encontraron en la literatura estudios de otra población que demuestren la correlación entre el polimorfismo CYP3A4\*1B con sus parámetros farmacocinéticos. Por lo tanto, este es el primer trabajo realizado en una población chilena que caracteriza CYP3A4\*1B y correlaciona las frecuencias de esta variante genética con los niveles plasmáticos del fármaco Zolpidem. Tal y como fue señalado con anterioridad, consideramos que la ausencia de correlación entre los genotipos estudiados y los parámetros farmacocinéticos medidos podría deberse en parte, al tamaño reducido de la muestra de individuos que presentaban al menos un alelo presente o a la ausencia de individuos homocigotos mutados. Sin embargo, resulta muy importante destacar que el objetivo fundamental que persigue un estudio farmacogenético es la caracterización de la respuesta individual, por lo que los hallazgos de individuos con niveles plasmáticos mayores del fármaco y que presentan el alelo CYP3A4 mutado resultan relevantes para su farmacoterapia personalizada.

## 8. CONCLUSIONES

- 1) Se logró Implementar mediante PCR-RFLP la detección de las variantes genéticas generadas por la presencia del polimorfismo CYP3A4\*1B.
- 2) Se caracterizó genóticamente a un grupo de 253 voluntarios sanos para el polimorfismo CYP3A4\*1B. La frecuencia genotípica obtenida fue de 0,889 para el genotipo silvestre (wt/wt), 0,111 para los heterocigotos (wt/\*1B) y no se encontraron individuos homocigotos mutados (\*1B/\*1B). Este resultado es similar a lo reportado para población caucásica e hispana y el hecho de no encontrar individuos homocigotos mutados podría atribuirse a la selección de voluntarios con un porcentaje de mezcla aborígen caucásica de un 18,5%, es decir, con escasa ascendencia amerindia.
- 3) Se logró determinar mediante HPLC los niveles plasmáticos de zolpidem. Estos fueron similares a los que se describen en la literatura y las concentraciones plasmáticas alcanzadas están dentro del rango terapéutico.
- 4) Los parámetros farmacocinéticos analizados fueron  $C_{máx}$ ,  $t_{máx}$ ,  $t_{1/2}$ , ABC y  $K_e$ . La farmacocinética de zolpidem se comporta de acuerdo a lo ya establecido, a mayor  $K_e$  menor  $C_{máx}$ , ABC y  $t_{1/2}$ , y viceversa. Estos parámetros farmacocinéticos fueron similares a lo que describe en la literatura científica para una dosis de 10 mg de zolpidem a voluntarios sanos.
- 5) No se encontró correlación estadísticamente significativa entre los genotipos estudiados CYP3A4\*1B y parámetros farmacocinéticos ( $C_{máx}$ ,  $t_{1/2}$ , ABC y  $K_e$ ) en 32 personas estudiadas (28 para wt/wt y 4 para wt/\*1B).
- 6) A pesar de los resultados de significancia del análisis estadístico, se puede apreciar una clara tendencia que sólo podría ser corroborada si se dispusiera de un mayor número de individuos tratados con el fármaco (metabolizadores rápidos o lentos de zolpidem) o realizando un estudio dirigido que analice los parámetros farmacocinéticos de zolpidem en individuos previamente caracterizados como portadores del alelo mutado.

- 7) La ausencia de individuos homocigotos mutados para el polimorfismo podría explicar la falta de diferencias estadísticamente significativas dado que en muchos genes que presentan este tipo de variantes de manera heterocigoto, el alelo activo tiende a suplir la función del alelo deficiente.
- 8) Si bien la descripción comparativa de los grupos aún no permite establecer de manera enfática una relación entre el polimorfismo y los parámetros farmacocinéticos, el conocimiento del genotipo y las curvas farmacocinéticas individuales puede ser utilizado para establecer una farmacoterapia personalizada en cada individuo, dada la gran variabilidad observada (Anexo 7).

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Acuña M, Llop E, y Rothhammer F, 2000, Composición genética de la población chilena: las comunidades rurales de los valles de Elqui, Limarí y Choapa, *Rev. Méd. Chile*, 128: 6.
- Amiramini B, Weber B, y Rebbeck T, 2000, Regulation of reporter gene expression by a CYP3A4 promoter variant in primary human hepatocytes, *P. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 60: 114.
- Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron F *et al.*, 1999, Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 66(3): 288-94.
- Bianchetti G, Dubruc C, Thiercelin J, Bercoff E, Bouchet J, Emeriau J, Galperine I, Lambert D, Vandiel B, y Thebault J, 1988, Clinical pharmacokinetics of Zolpidem in various physiological and pathological conditions. *En*: Sauvanet, J.P., Langer, S.Z., Morselli, P.L. (Eds.), *Imidazopyridines in Sleep Disorders*. Raven. Press., New York, pp.155–163.
- Cavalli S, Hirata M, y Hirata R, 2001, Detection of Mbol polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4, *Clin. Chem.*, 47: 348-351.
- Clark W, 1976, The environment and the genotype in polymorphism, *Zoo. J. Linn. Soc.*, 58: 255–262.
- Clarke S, 1998, In vitro assessment of human cytochrome P-450, *Xenobiotica*, 28: 1167-1202.
- Declaración de Helsinki, realizada por la asociación médica del mundo, principios éticos que involucran las investigaciones medicas en seres humanos. 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008.
- Domanski T, Finta C, Halpert J, y Zaphiropoulos P, 2001, cDNA Cloning and Initial Characterization of CYP3A43, a Novel Human Cytochrome P450, *Mol. Pharmacol.*, 59: 386-392.
- Drover D, 2004, Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Short-Acting Hypnotics, Zolpidem, Zaleplon, Zolpidem and Zopiclone, *Clin. Pharmacokinet.*, 43(4): 227-238.
- Evans W, y Relling M, 1999, Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*, 286: 487-491.
- Finta C, y Zaphiropoulos P, 2000, The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons, *Gene*, 260: 13-23.
- García-Martín E, Martínez C, Ladero J, Gamito F y Agúndez J, 2001, High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57: 47–49.
- González F, y Nebert D, 1990, Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant "warfare", molecular drive and human genetic differences in drug oxidation, *Trends Genet.*, 6:182-186.
- Greenblatt D, Legangneux E, Harmatz J, Weinling E, Freeman J, Rice K, y Zammit G, 2006, Dynamics and Kinetics of a Modified-Release Formulation of Zolpidem: Comparison With Immediate-Release Standard Zolpidem and Placebo, *J. of Clin. Pharmacol.*, 46: 1469-1480.

- Gray I, Nobile C, Muresu R, Ford S y Spurr N, 1995, A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24, *Genomics*, 28: 328-332.
- Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro J, Batt A-M, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P y Souidi M, 2006, Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 64 (6): 535-48.
- Guengerich F, 2005, Human Cytochrome P450 Enzymes. En: Ortiz de Montellano P, y De Voss J, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3<sup>a</sup> Edition, KluwerAcadennic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, pp. 377-530.
- Guengerich F, 1999, Cytochrome P450 3A4: Regulation and Role in drug metabolism, *Annu. Rev. Pharmacol.*, 39: 1-17.
- Guidance for Industry, 1996, E6 Good Clinical Practice: consolidate guidance, US., Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, ICH.
- Guyton A, y Hall J, 2005, *Textbook of human physiology*, 11<sup>a</sup> edición, WB Saunders, capitulo 70, pp. 797-802.
- Harrison T, y Keating G, 2005, Zolpidem: a review of its use in the management of insomnia. *CNS Drugs*, 19: 65–89.
- Hashimoto H, Toide K, y Kitamura R, 1993, Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in humans livers, and its transcriptional control, *Eur. J. Biochem.*, 218: 585-595.
- Hoehns J, y Perry P, 1993, Zolpidem: a nonbenzodiazepine hypnotic for treatment of insomnia. *Clin. Pharm.*, 12: 814-828.
- Huxley J, 1955, Morphism and evolution, *Heredity*, 9: 1-52.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, y McLellan R, 1999, Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment, *Trends Pharmacol. Sci.*, 20: 342-349.
- Ingelman-Sundberg M, 2001, Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy, *J. Intern. Med.*, 250: 1690-1698.
- Ioannides C, 2002, Xenobiotic Metabolism: An Overview. En: Ioannides C, *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics (current toxicology)*, Ed. C. Ioannides. John Wiley y Sons, pp. 1-32.
- Janz D, y Schmidt D, 1974, Antiepileptic drugs and failure of oral contraceptives, *Lancet*, 1113.
- Keshava C, McCanlies E, y Weston A, 2004, CYP3A4 Polymorphisms: Potential Risk Factors for Breast and Prostate Cancer: a HuGE, Review. *Am. J. Epidemiol.*, 160: 825-841.
- Kitada M, Kamataki K, Itahashi K, Rikihisa T, y Kanakubo Y, 1987, P-450 HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal livers is the 16 alpha hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate, *J. Biol. Chem.*, 262: 13534-13537.
- Langtry H, y Benfield P, 1990, Zolpidem: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential, *Drugs*, 40: 291-313.
- Liu T, Lin S, Chen T, y Chang J, 2002, Polymorphism analisis of CYP3A5 in myeloid leukemia. *Oncol. Report.*, 9: 327-329.

- Makris T, Denisov I, Schlichting L, y Sligar S, 2005, Activation of Molecular Oxygen by Cytochrome P450. En: Ortiz de Montellano P, y De Voss J, Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3<sup>a</sup> edición, KluwerAcadennic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, pp. 153.
- Miller S, Dykes D, y Polesky H, 1988, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.*, 16: 1215.
- NCBI, CYP3A4, Contexto genómico < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1576>> [consulta 8 de marzo 2010].
- NCBI, SNP, rs2740574, <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2740574](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2740574)> [consulta 12 de marzo 2010].
- Nelson D y Cox M, 1990, Lehninger's Principles of Biochemistry, 4<sup>a</sup> edición, Freeman y Company, capítulo 21: 787-832.
- Nebert D, y Russell D, 2002, Clinical importance of the cytochromes P450, *Lancet*, 360: 1155-1162.
- Nirogi R, Kandikere V, Shrivasthava W, y Mudigonda K, 2006, Quantification of Zolpidem in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Biomed. Chromatogr.*, 20: 1103–1108.
- Nowell PD, Mazumbar S, Buysse D, *et al.*, 1997, Benzodiazepines and Zolpidem for chronic insomnia: a meta-analysis of treatment efficacy, *JAMA*, 278: 2170-2176.
- Olubodun J, Ochs H, Von Moltke L, Roubenoff R, Hesse L, Harmatz J, Shader R y Greenblatt D, 2003, Pharmacokinetic properties of Zolpidem in elderly and young adults: possible modulation by testosterone in men, *J. Clin. Pharmacol.*, 56: 297–304.
- Ortiz de Montellano P y De Voss J, 2005, Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes. En: Ortiz de Montellano P, y De Voss J, Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3<sup>a</sup> edición, KluwerAcadennic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, pp. 183-246.
- Paine M, Scrutton N, Munro A, Gutierrez A, Roberts G, y Wolf C. Electron Transfer Partners of Cytochrome P450. En: Ortiz de Montellano P, y De Voss J, Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 3<sup>a</sup> edición, KluwerAcadennic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, pp. 115-148.
- Paris P, Kupelian P, Hall J, y *et al.*, 1999, Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients, *Cancer Epidem. Biomar.*, 8: 901-905.
- Parkinson A, y Ogilvie B, 2008, Biotransformation of Xenobiotics. En: Cassaret y Doull's, Toxicology, 7<sup>a</sup> edición, McGraw-Hill, New York, USA, pp. 161-305.
- Pichard L, Gillet G, Bonfils C, Domergue J, Thenot J, y Maurel P, 1995, Oxidative metabolism of Zolpidem by human liver cytochrome P450S, *Drug Metab. Dispos.*, 23: 1253– 1262.
- Pirmohamed M, y Park B, 2003, Cytochrome P450 polymorphisms and adverse drug reactions, *Toxicology*, 192: 23-32.
- Plant N, y Gibson G, 2003, Evaluation of the toxilological relevance of CYP3A4 inducción, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 6: 50-56.

- Rebeck T, Jaffe J, Walker A, Wein A, y Malkowicz S, 1994, Modification of Clinical Presentation of Prostate tumors by a Novel Genetic Variant in CYP3A4, *J. Natl. Cancer*, 190: 1225-1229.
- Roth T, y Roehrs T, 2003, Insomnia: epidemiology, characteristics, and consequences. *Clin. Cornerstone*, 5: 5-15.
- Saari T, Laine K, Leino K, Valtonen M, Neuvonen P, y Olkkola K, 2006, Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem in healthy subjects, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 63: 116-120.
- Salva P, y Costa J, 1995, Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Zolpidem, therapeutic implications, *Clin. Pharmacokinet*, 29: 142-53.
- Shaik S, y De Visser S, 2005, Computational Approaches to Cytochrome P450 Function. En: Ortiz de Montellano P, y De Voss J, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3ª edición, KluwerAcadennic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, pp. 45-86.
- Saari T, Laine K, Leino K, Valtonen M, Neuvonen P y Olkkola K, 2006, Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of Zolpidem in healthy subjects, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 63: 116-120.
- Schuetz E, 2001, Induction of cytochromes P450, *Curr. Drug. Metab.*, 2 (2):139-147.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, y Guengerich F, 1994, Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 270: 414-423.
- Smith D, Abel S, Hyland R, y Jones B, 1998, Human Cytochrome P-450s: Selectivity and Measurement *in vivo*, *Xenobiotica*, 12: 1905-1128.
- Thummel K, y Wilkinson G, 1998, *In vitro* and *in vivo* drug interactions involving human CYP3A, *Annu. Rev. Pharmacol.*, 38: 389-430.
- Von Moltke L, Greenblatt D, Granda B, Duan S, Grassi J, Venkatakrisnan K, Harmatz J, y Shader R, 1999, Zolpidem Metabolism *in vitro*: responsible cytochromes, chemical inhibitors, and *in vivo* correlations, *J. Clin. Pharmacol.*, 48: 89-97.
- Wandel C, Witte J, Hall J, Stein C, Wood A, y Wilkinson G, 2000, CYP3A4 activity in African American and European American men: population differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 68: 82-91.
- Weinling E, McDougall S, Andre F, Bianchetti G, y Dubruc C, 2006, Pharmacokinetic profile of a new modified release formulation of Zolpidem designed to improve sleep maintenance, *Clin. Pharmacol.*, 20: 397-403.
- Yasar U, Eliasson E, Dahl M-L, Johansson I, Ingelman-Sundberg M y Sjoqvist F, 1999, Validation of methods for CYP2C9 genotyping: Frequencies of mutant alleles in a Swedish population, *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, 254 (3): 628-631.
- Zhou S, Liu J y Chowbay B, 2009, Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact, *Drug. Metab. Rev.*, 41 (2): 89-295.

## 10. ANEXOS

### Anexo 1: Consentimiento informado para análisis genético.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

##### **Colaboración en un estudio para evaluar factores genéticos y metabólicos que inciden en la efectividad de los medicamentos**

Estimado señor(a).

Nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su colaboración en el proyecto de investigación **“PARAMETROS FARMACOCINETICOS Y VARIANTES GENETICAS EN SU METABOLISMO”**.

Este estudio tiene por objetivo obtener valiosa información que en un futuro permitirá diseñar tratamientos farmacológicos personalizados, que disminuyan los efectos adversos, mejoren la eficacia y permitan evitar costos innecesarios a los usuarios.

Su colaboración en estos proyectos consiste en la donación voluntaria de una muestra sanguínea, de aproximadamente 10 mL, la cual será extraída con un sistema estéril y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo. La única molestia eventual la constituye la aparición de un pequeño hematoma en la zona de toma de muestra, en algunos casos.

Estos estudios serán realizados en el Instituto de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y su investigador responsable es el Dr. Luis Quiñones Sepúlveda (Teléfono: 6817756, fax: 7323878, e-mail: lquinone@med.uchile.cl).

Para oficializar su colaboración voluntaria en este tipo de estudio, usted deberá llenar una ficha clínica que incluye datos de identificación personal e historia médica. Tanto la información de la ficha, como los resultados obtenidos en este estudio son absolutamente confidenciales y pueden ser dados a conocer por el Instituto solamente a usted, una vez se encuentren disponibles.

Si usted considera inadecuada o peligrosa su participación en el estudio tiene el derecho de rechazarlo, situación que será comprendida por el equipo investigador.

Declaro conocer los términos de la solicitud de una muestra sanguínea para los estudios previamente descritos y autorizo voluntariamente el uso de ésta, entendiéndolo el beneficio potencial que tendrá para la población general.

Investigador Responsable:  
Dr. Luis Quiñones Sepúlveda, BQ., PhD  
Teléfono: 6817756  
e-mail: lquinone@med.uchile.cl

Fecha:.....

Nombre Donante:.....

.....  
RUT y Firma del donante

**Gracias por su colaboración**

## FICHA CLÍNICA CONTROLES

GRUPO SANGUINEO:  N° FICHA:

### I.- IDENTIFICACIÓN:

FECHA MUESTRA:  R.U.T.:  Fecha de Nacimiento

| APELLIDO PATERNO     | APELLIDO MATERNO     | NOMBRES              |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| DIRECCION            | TELEFONOS            | E-mail               |

### II.- ANTECEDENTES FAMILIARES:

|                               |                             |                             |                                  |                           |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Padre, enfermedad:            | Sí <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | No sabe <input type="checkbox"/> | Tipo <input type="text"/> |
| Abuelos paternos, enfermedad: | Sí <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | No sabe <input type="checkbox"/> | Tipo <input type="text"/> |
| Madre, enfermedad:            | Sí <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | No sabe <input type="checkbox"/> | Tipo <input type="text"/> |
| Abuelos Maternos, enfermedad: | Sí <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | No sabe <input type="checkbox"/> | Tipo <input type="text"/> |
| Hermano, enfermedad           | Sí <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | No sabe <input type="checkbox"/> | Tipo <input type="text"/> |
| Hijo, enfermedad              | Sí <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | No sabe <input type="checkbox"/> | Tipo <input type="text"/> |

### III.- EXPOSICIÓN A AGENTES TÓXICOS:

Fumador Sí  No  Cigarrillos/día  Tiempo

Ex-Fumador Cigarrillos/día  Tiempo

Alcohol Sí  No  Copas/día  Copas/f. de semana  Tiempo

Ex-Bebedor Copas/día  Copas/f. de semana  Tiempo

### IV.- ESTRATO SOCIO-ECONOMICO

Numero de personas que componen grupo familiar:

Nivel aproximado de renta del grupo familiar (marque con una cruz en el casillero):

|                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| menos de \$135.000        | <input type="checkbox"/> |
| \$135.000 – \$500.000     | <input type="checkbox"/> |
| \$501.000 – \$1.000.000   | <input type="checkbox"/> |
| \$1.001.000 – \$2.000.000 | <input type="checkbox"/> |
| Más de \$2.000.000        | <input type="checkbox"/> |

### V. OBSERVACIONES:

## Anexo 2: Protocolo de aprobación de proyectos clínicos.



**GOBIERNO DE CHILE**  
Servicio de Salud Metropolitano Oriente  
Comité de Ética Científico

### PROTOCOLO DE APROBACIÓN DE PROYECTOS CLÍNICOS

Con fecha 02 de Septiembre de 2008 el CEC del S.S.M. Oriente analizó y aprobó el Proyecto IINOVA-CORFO 2007, patrocinado por Laboratorios SAVAL S.A. , titulado:

“ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y CLÍNICO DE UNA FORMULACIÓN DE ZOLPIDEM DE LIBERACIÓN CONTROLADA”

y que conducirá el Dr. Rómulo Melo Monsalve y Colaboradores , con la participación de las siguientes instituciones:

- Dpto. de Ciencias Neurológicas , Facultad de Medicina, Universidad de Chile Instituto de Neurocirugía, Servicio de Salud Metropolitano Oriente;
- Laboratorio de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Se analizó y aprobó los siguientes documentos del Proyecto:

1. Proyecto de Investigación Proyecto IINOVA- CORFO 2007, fechado en Junio de 2008;
2. Resumen Ejecutivo del Proyecto;
3. Consentimiento Informado para Investigación Clínica , fechado , firmado y timbrado por el CEC del S.S.M. Oriente el 02 -Septiembre-2008;
4. CV del Investigador Principal DR. Rómulo Melo Monsalve y Colaboradores.;

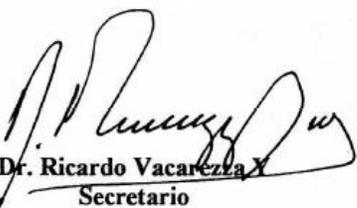
Tomó conocimiento de:

5. Carta de Mauricio Lara F Jefe Unidad de Estudios Clínicos , Dpto. Médico Laboratorios SAVAL S.A.;
6. Carta de Osvaldo Macías M. Intendente de Seguros - Por Orden del Superintendente;
7. Carta del Dr. Patricio Loayza Coordinador Clínico Instituto de Neurocirugía;
8. DRUGDEX® Evaluations.

Envío la nómina de los miembros del CEC del S.S.M. Oriente que participaron en el análisis y aprobación del Proyecto antes señalado:

|                             |                               |                            |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Dr. Gustavo Díaz Pérez      | Neurocirujano                 | Inst. Nac. de Neurocirugía |
| Dra. María Esther Meroni    | Geriatra                      | Inst. Nac. de Geriatria    |
| Dr. Jorge Plasser Troncoso  | Cirujano -Oncólogo            | Hospital del Salvador      |
| Dr. Manuel Sedano Lorca     | Gineco-Obstetra               | Hospital Dr. Luis Tisné #  |
| Dr. Luis Soto Román         | Utiólogo                      | Inst. Nacional del Tórax   |
| Dr. Andrés Stuardo Luengo   | Neurólogo- Presidente         | Hospital del Salvador      |
| Dr. Ricardo Vacarezza Yávar | Hematólogo- Secretario        | Hospital del Salvador      |
| Dra. Liliana Vicherat Mauro | Inmunóloga                    | Inst. Nac. del Tórax       |
| Sra. Elena Núñez Migone     | Enfermera- Coordinadora       | S.S.M.O. #                 |
| Sra. Angélica Sotomayor     | Abogado                       | No institucional           |
| Sr. Hugo Gutiérrez Guerra   | Representante de la Comunidad | No institucional           |

#: No participó en la discusión

  
 Dr. Ricardo Vacarezza Yávar  
 Secretario



Santiago, 02 de Septiembre de 2008

### Anexo 3: Consentimiento informado para análisis farmacocinéticos.



Instituto de Neurocirugía  
Dr. A. Asenjo

Facultad de Medicina  
Universidad de Chile



#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA

#### “ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y CLÍNICO DE UNA FORMULACIÓN DE ZOLPIDEM DE LIBERACIÓN CONTROLADA”

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dr. Rómulo Melo, Neurocirujano

1. Se me ha invitado a participar en un proyecto de investigación para determinar si dos productos farmacéuticos de liberación controlada pueden ser intercambiables (bioequivalencia), es decir, que se pueda ocupar uno u otro y de este modo tener mayores alternativas para elegir en el tratamiento del insomnio.

Este estudio permitirá saber si una nueva formulación de liberación controlada de zolpidem, medicamento para inducir el sueño, aún mantiene sus efectos en la mañana, luego de ser usado por un tiempo corto. Asimismo, permitirá conocer la forma en que el medicamento es eliminado del cuerpo, mediante su detección en la sangre y evaluar cómo se comporta cuando se toma junto con alimentos.

2. Al participar en este estudio, puedo ser asignado al azar a cualquiera de los siguientes grupos:

- **Grupo I:** En este grupo se evaluará si el medicamento es intercambiable y cómo se comporta con alimentos, luego de una dosis.
- **Grupo II:** En este grupo se estudiará cómo el medicamento es eliminado del cuerpo luego de usarlo durante una semana. Además se evaluarán sus efectos en la mañana.

3. Al participar en este estudio, yo estoy de acuerdo en:

#### Antes del estudio: (Grupos I y II)

- Me tomarán muestras de sangre y orina en ayunas para análisis de Laboratorio Clínico.
- Los análisis que se realizarán antes del estudio, incluyen detección de hepatitis B y C, SIDA y drogas de abuso. En el caso de las mujeres, se realizará además un test de embarazo.
- Me realizarán un examen médico completo.

**Durante el estudio:****Grupo I:**

El estudio constará de cuatro periodos de catorce horas con un intervalo entre uno y otro de 4 días en donde se realizarán los siguientes procedimientos:

- El día que me indiquen, me presentaré a las 7:30 AM en ayunas de 12 horas.
- Una enfermera universitaria me instalará una bránula en el antebrazo (dispositivo de recolección de sangre).
- Se me administrará al azar un comprimido de Zolpidem de 10 ó 12,5 mg. con 250 mL de agua, con o sin alimento.
- El producto a administrar estará rotulado como A-1, A-2, B o C, los cuales se alternarán en cada uno de los 4 periodos en que participaré.
- En cada sesión la Enfermera Universitaria me extraerá 15 muestras de 5 mL de sangre cada media hora por un periodo de 5 horas, luego 3 muestras durante las siguientes 3 horas y 1 muestra a las 10 horas después de la administración del medicamento.
- Se me proporcionará una dieta diseñada por una Nutricionista, acorde al estudio que consiste en desayuno, almuerzo, once-comida, y una dieta especial (alta en grasas) en la sesión que requiera administración del medicamento con alimento que consiste en, huevos revueltos en mantequilla y tocino, 200 mL de leche entera, 2 tostadas con mantequilla y 100 gramos de papas fritas.
- Todos estos procedimientos serán supervisados por un médico, el cual además, evaluará mi estado de salud en forma permanente, haciéndose responsable en caso de una reacción no deseada.

**Grupo II:**

El estudio constará de tres visitas, la primera y segunda de 2 horas de duración y la tercera de 14 horas. Estas visitas serán a lo largo de una semana donde se me realizarán los siguientes procedimientos:

- La primera visita me presentaré a las 8:30 am en dependencias del Instituto de Neurocirugía.
- Se me realizarán pruebas neurológicas para ver mis reflejos, mi equilibrio, mi concentración y deberé contestar cuestionarios semejantes a los usados en los test de inteligencia.
- Se me entregará un frasco con 7 comprimidos de Zolpidem 12,5 mg de liberación controlada con la indicación de ingerir un comprimido al día justo antes de dormir durante 6 días.
- La segunda visita será el quinto día de esa semana y me presentaré a las 8:30 am, en dependencias del Instituto de Neurocirugía.
- Se me realizarán las mismas pruebas neurológicas para ver mis reflejos mi equilibrio y mi concentración que me realizaron el primer día.
- La tercera visita me presentaré a las 20:00 pm en dependencias del Instituto de Neurocirugía, donde pasaré la noche en el servicio de pensionado.
- Una enfermera universitaria me instalará una bránula en el antebrazo (dispositivo de recolección de sangre).
- Se me administrará un comprimido de Zolpidem de 12,5 mg con 250 mL de agua.
- Durante la sesión la Enfermera Universitaria me extraerá 15 muestras de 5 mL de sangre cada media hora por un periodo de 5 horas, luego 3 muestras durante las siguientes 3 horas y 1 muestra a las 10 horas después de la administración del comprimido.

- Todos estos procedimientos serán supervisados por un médico, el cual además, evaluará mi estado de salud en forma permanente, haciéndose responsable en caso de una reacción no deseada.
4. Yo entiendo que los posibles riesgos por los medicamentos que se utilizarán en el estudio son: Mareos y vértigos 5,2%, somnolencia 5,2%; dolor de cabeza 3%; náuseas y vómitos 2,5%; fatiga 2,4%; alteraciones en la memoria 1,8%; pesadillas 1,6%; confusión 1,6%; sensación de resaca 1,4%; depresión 1,2%; dolores gastrointestinales 1,1% y sequedad de boca 1,1%.  
Es posible que producto de la toma de las muestras de sangre aparezca en la zona del antebrazo un pequeño hematoma (moretón) el cual no representará mayor riesgo.
  5. Los posibles beneficios que tendré en este estudio son:  
Recibiré, al finalizar mi participación en el estudio, \$50.000 (cincuenta mil pesos) como compensación; además de las comidas y colaciones en los días de tratamiento, y una evaluación completa de mi estado de salud. Si lo requiero, puedo solicitar copia de los informes de los exámenes de laboratorio realizados.
  6. Cualquier consulta que yo quiera hacer con relación a mi participación en este estudio será contestada por: Dr. Iván Saavedra o Dr. Luis Quiñones, en los teléfonos 6817756 ó 2264039.
  7. Yo podré retirarme de este estudio en cualquier momento sin ser obligado(a) a dar razones y sin que esto me perjudique en mi calidad de paciente o usuario(a).
  8. Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelado y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial.
  9. En el caso de presentarse algún evento adverso como resultado del estudio, la atención y el tratamiento médico serán proporcionados sin ningún costo para mí, preferentemente en esta institución y, en cualquier caso, bajo la responsabilidad médica y legal del investigador o médico responsable que firma este consentimiento.
  10. Mi consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzado u obligado.

Firma del voluntario sano: .....

Firma del investigador: .....

Firma del director del establecimiento: .....

Fecha: .....

**Anexo 4.** Características generales. Genotipo y Parámetros Farmacocinéticos del los voluntarios sometidos a una monodosis de 10 mg de Zolpidem.

| Vol       | Peso /kg    | Talla /m    | IMC /kg·m <sup>2</sup> | Edad      | Género   | Grupo sanguíneo | CYP 3A4      | C <sub>max</sub> /ng·mL <sup>-1</sup> | t <sub>max</sub> /h | K <sub>e</sub> /h <sup>-1</sup> | t <sub>1/2</sub> /h | ABC <sub>0-∞</sub> /ng·mL·h | ABC <sub>0-ti</sub> /ng·mL·h |
|-----------|-------------|-------------|------------------------|-----------|----------|-----------------|--------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1         | 78,5        | 1,65        | 28,8                   | 28        | 1        | A               | wt/wt        | 197,42                                | 1,02                | 0,0870                          | 7,97                | 944,5                       | 1.432,5                      |
| 2         | 79          | 1,75        | 25,8                   | 41        | 2        | A               | wt/wt        | 120,34                                | 1,00                | 0,3517                          | 1,97                | 394,1                       | 410,1                        |
| 3         | 55,8        | 1,57        | 22,6                   | 21        | 1        | AB              | wt/wt        | 264,25                                | 0,50                | 0,3069                          | 2,26                | 704,2                       | 734,0                        |
| 4         | 86          | 1,75        | 28,2                   | 27        | 2        | AB              | wt/wt        | 151,03                                | 1,00                | 0,4536                          | 1,53                | 331,2                       | 342,8                        |
| 5         | 80          | 1,75        | 26,1                   | 22        | 1        | O               | wt/wt        | 211,92                                | 1,03                | 0,2901                          | 2,39                | 727,9                       | 778,7                        |
| 6         | 57,2        | 1,64        | 21,3                   | 22        | 2        | O               | wt/wt        | 135,72                                | 1,05                | 0,3892                          | 1,78                | 460,5                       | 474,2                        |
| 7         | 62          | 1,62        | 23,6                   | 47        | 1        | O               | wt/wt        | 181,91                                | 0,53                | 0,3545                          | 1,96                | 727,5                       | 763,4                        |
| 8         | 73          | 1,80        | 22,5                   | 23        | 2        | O               | wt/wt        | 201,53                                | 1,52                | 0,5013                          | 1,38                | 606,8                       | 616,0                        |
| 9         | 61,8        | 1,61        | 23,8                   | 25        | 1        | A               | wt/wt        | 333,17                                | 2,00                | 0,4524                          | 1,53                | 992,1                       | 1.025,2                      |
| <b>10</b> | <b>57</b>   | <b>1,66</b> | <b>20,7</b>            | <b>24</b> | <b>1</b> | <b>O</b>        | <b>wt*1B</b> | <b>85,97</b>                          | <b>1,02</b>         | <b>0,8947</b>                   | <b>0,77</b>         | <b>181,3</b>                | <b>187,9</b>                 |
| 11        | 63,5        | 1,63        | 23,8                   | 20        | 1        | O               | wt/wt        | 221,84                                | 1,00                | 0,2625                          | 2,64                | 992,0                       | 1.102,7                      |
| 12        | 55,5        | 1,54        | 23,4                   | 40        | 1        | B               | wt/wt        | 374,1                                 | 2,03                | 0,2439                          | 2,84                | 1632,9                      | 1.791,6                      |
| 13        | 55          | 1,59        | 21,8                   | 29        | 1        | A               | wt/wt        | 203,78                                | 0,50                | 0,4381                          | 1,58                | 436,1                       | 444,1                        |
| 14        | 69,8        | 1,62        | 26,6                   | 36        | 1        | B               | wt/wt        | 195,81                                | 0,50                | 0,4537                          | 1,53                | 557,9                       | 573,5                        |
| <b>15</b> | <b>58,5</b> | <b>1,58</b> | <b>23,6</b>            | <b>27</b> | <b>1</b> | <b>O</b>        | <b>wt*1B</b> | <b>358,82</b>                         | <b>1,02</b>         | <b>0,2262</b>                   | <b>3,06</b>         | <b>1271,8</b>               | <b>1.406,3</b>               |
| 16        | 64          | 1,70        | 22,1                   | 21        | 2        | B               | wt/wt        | 157,54                                | 0,67                | 0,4345                          | 1,60                | 335,9                       | 359,8                        |
| 17        | 81,6        | 1,83        | 24,4                   | 26        | 2        | O               | wt/wt        | 171,17                                | 0,97                | 0,3992                          | 1,74                | 417,92                      | 427,7                        |
| 18        | 59          | 1,53        | 25,2                   | 38        | 1        | O               | wt/wt        | 220,88                                | 0,50                | 0,4121                          | 1,68                | 694,5                       | 716,8                        |
| 19        | 77,5        | 1,76        | 25                     | 26        | 2        | O               | wt/wt        | 142,32                                | 0,97                | 0,2789                          | 2,49                | 533,4                       | 565,9                        |
| <b>20</b> | <b>72,5</b> | <b>1,74</b> | <b>23,9</b>            | <b>27</b> | <b>2</b> | <b>O</b>        | <b>wt*1B</b> | <b>156,15</b>                         | <b>0,52</b>         | <b>0,7321</b>                   | <b>0,95</b>         | <b>299,0</b>                | <b>302,1</b>                 |
| 21        | 92          | 1,76        | 29,7                   | 21        | 2        | A               | wt/wt        | 181,68                                | 0,45                | 0,0889                          | 7,80                | 549,0                       | 738,2                        |
| 22        | 92,5        | 1,76        | 29,9                   | 24        | 2        | A               | wt/wt        | 116,16                                | 0,93                | 0,1299                          | 5,34                | 492,1                       | 635,3                        |
| 23        | 60,8        | 1,53        | 26                     | 22        | 1        | O               | wt/wt        | 176,99                                | 1,48                | 0,2523                          | 2,75                | 601,9                       | 658,4                        |
| 24        | 77,8        | 1,82        | 23,5                   | 24        | 2        | A               | wt/wt        | 155,26                                | 0,48                | 0,3838                          | 1,81                | 383,8                       | 393,1                        |
| 25        | 66,5        | 1,63        | 25                     | 25        | 1        | O               | wt/wt        | 285,24                                | 0,52                | 0,0700                          | 9,90                | 971,4                       | 1.502,4                      |
| 26        | 68          | 1,73        | 22,7                   | 23        | 2        | O               | wt/wt        | 159,64                                | 1,97                | 0,2191                          | 3,16                | 692,1                       | 796,0                        |
| 27        | 65,5        | 1,53        | 28                     | 22        | 1        | O               | wt/wt        | 192,35                                | 1,00                | 0,2548                          | 2,72                | 488,9                       | 506,2                        |
| 28        | 48          | 1,55        | 20                     | 22        | 1        | A               | wt/wt        | 240,52                                | 2,03                | 0,2228                          | 3,11                | 1062,8                      | 1.197,1                      |
| 29        | 68          | 1,74        | 22,5                   | 23        | 2        | A               | wt/wt        | 124,9                                 | 1,02                | 0,3795                          | 1,83                | 280,5                       | 290,7                        |
| 30        | 61          | 1,71        | 20,9                   | 27        | 1        | A               | wt/wt        | 278,38                                | 1,03                | 0,3984                          | 1,74                | 1073,3                      | 1.124,5                      |
| 31        | 64          | 1,65        | 23,5                   | 23        | 1        | O               | wt/wt        | 178,66                                | 1,03                | 0,3435                          | 2,02                | 433,7                       | 451,8                        |
| <b>32</b> | <b>84,5</b> | <b>1,89</b> | <b>23,7</b>            | <b>26</b> | <b>2</b> | <b>A</b>        | <b>wt*1B</b> | <b>129,79</b>                         | <b>2,50</b>         | <b>0,1560</b>                   | <b>4,44</b>         | <b>689,8</b>                | <b>757,1</b>                 |

**Vol.:** Voluntario. **Género:** 1= Mujer, 2= Hombre. **C<sub>max</sub>:** Concentración máxima. **t<sub>max</sub>:** Tiempo en que se alcanza la C<sub>max</sub>. **K<sub>e</sub>:** Constante de eliminación. **t<sub>1/2</sub>:** tiempo de vida media. **ABC:** área bajo la curva. ∞: infinito.

**Anexo 5. Farmacocinética de Zolpidem de cada voluntario.**

| Tiempo (horas) | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11     |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0              | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| 0,5            | 140,42 | 65,04  | 264,25 | 69,50  | 152,68 | 55,33  | 181,91 | 86,74  | 9,04   | 56,08  | 151,02 |
| 1              | 197,42 | 120,34 | 184,68 | 151,03 | 211,92 | 135,72 | 169,49 | 95,59  | 125,72 | 85,97  | 221,84 |
| 1,5            | 168,51 | 102,71 | 150,32 | 113,33 | 174,53 | 99,25  | 163,58 | 201,53 | 302,95 | 64,44  | 202,16 |
| 2              | 186,84 | 85,95  | 154,47 | 69,63  | 142,11 | 88,91  | 158,80 | 155,29 | 333,17 | 48,11  | 193,04 |
| 2,5            | 148,68 | 69,79  | 147,94 | 59,51  | 128,58 | 86,52  | 125,22 | 135,83 | 280,84 | 40,36  | 153,07 |
| 3              | 121,80 | 54,96  | 111,18 | 34,91  | 81,76  | 83,88  | 99,33  | 93,63  | 215,85 | 27,88  | 135,15 |
| 3,5            | 111,29 | 32,67  | 70,48  | 35,84  | 75,78  | 76,87  | 90,42  | 76,52  | 125,72 | 21,32  | 127,34 |
| 4              | 103,73 | 43,72  | 56,29  | 29,78  | 69,93  | 58,60  | 76,61  | 67,22  | 101,96 | 14,22  | 100,49 |
| 4,5            | 92,66  | 29,12  | 43,90  | 21,54  | 70,37  | 53,71  | 56,49  | 61,10  | 83,00  | 8,93   | 98,64  |
| 5              | 88,10  | 32,10  | 39,61  | 22,85  | 52,72  | 43,92  | 54,82  | 44,96  | 69,07  | 0,00   | 80,97  |
| 6              | 73,85  | 27,52  | 30,67  | 15,44  | 44,57  | 24,57  | 36,27  | 45,37  | 38,77  | 0,00   | 85,67  |
| 7              | 57,80  | 16,30  | 25,15  | 8,64   | 33,58  | 18,35  | 41,09  | 21,47  | 53,58  | 0,00   | 62,43  |
| 8              | 47,02  | 12,11  | 14,54  | 0,00   | 29,43  | 11,39  | 24,78  | 14,37  | 37,02  | 0,00   | 46,00  |
| 10             | 43,63  | 5,54   | 9,64   | 0,00   | 14,32  | 5,28   | 13,03  | 4,48   | 14,88  | 0,00   | 29,32  |
| Tiempo (horas) | 12     | 13     | 14     | 15     | 16     | 17     | 18     | 19     | 20     | 21     | 22     |
| 0              | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   |
| 0,5            | 340,43 | 203,78 | 195,81 | 23,11  | 157,54 | 109,13 | 220,88 | 92,70  | 156,15 | 181,68 | 88,62  |
| 1              | 301,09 | 126,86 | 131,66 | 358,82 | 139,01 | 171,17 | 195,24 | 142,32 | 119,48 | 171,40 | 116,16 |
| 1,5            | 345,36 | 86,99  | 105,89 | 333,21 | 105,02 | 116,63 | 185,99 | 133,82 | 86,93  | 122,82 | 103,00 |
| 2              | 374,10 | 76,44  | 89,95  | 312,38 | 86,16  | 79,50  | 125,35 | 117,82 | 47,82  | 79,36  | 83,28  |
| 2,5            | 299,49 | 67,05  | 90,92  | 313,16 | 64,29  | 51,53  | 115,59 | 88,01  | 44,75  | 79,49  | 67,47  |
| 3              | 264,14 | 55,34  | 84,42  | 245,12 | 51,80  | 51,87  | 95,08  | 75,46  | 31,08  | 58,42  | 64,65  |
| 3,5            | 211,20 | 46,51  | 70,13  | 161,24 | 27,37  | 40,45  | 75,21  | 68,95  | 25,93  | 59,47  | 55,85  |
| 4              | 167,39 | 41,77  | 57,12  | 112,49 | 19,32  | 38,54  | 63,43  | 66,47  | 24,09  | 41,25  | 54,04  |
| 4,5            | 139,61 | 35,97  | 52,63  | 107,85 | 18,17  | 29,31  | 43,71  | 48,46  | 18,31  | 49,68  | 50,69  |
| 5              | 133,14 | 31,66  | 44,68  | 73,96  | 14,37  | 33,21  | 40,39  | 45,75  | 13,12  | 42,89  | 44,87  |
| 6              | 114,31 | 20,30  | 29,68  | 76,12  | 0,00   | 22,46  | 36,10  | 30,98  | 9,72   | 30,39  | 35,64  |
| 7              | 85,60  | 12,39  | 32,19  | 49,85  | 0,00   | 13,41  | 30,17  | 20,10  | 4,92   | 21,83  | 27,51  |
| 8              | 53,47  | 8,03   | 12,22  | 60,15  | 0,00   | 7,66   | 20,77  | 16,10  | 0,00   | 19,66  | 22,90  |
| 10             | 40,72  | 0,00   | 7,86   | 28,68  | 0,00   | 4,03   | 9,04   | 8,94   | 0,00   | 16,88  | 18,84  |
| Tiempo (horas) | 23     | 24     | 25     | 26     | 27     | 28     | 29     | 30     | 31     | 32     |        |
| 0              | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   |        |
| 0,5            | 66,38  | 155,26 | 285,24 | 78,37  | 182,01 | 233,38 | 65,18  | 88,39  | 150,99 | 73,85  |        |
| 1              | 162,15 | 113,48 | 205,91 | 123,34 | 192,35 | 183,60 | 124,90 | 278,38 | 178,66 | 118,23 |        |
| 1,5            | 176,99 | 103,33 | 191,98 | 158,14 | 119,46 | 186,75 | 115,07 | 249,53 | 127,58 | 129,22 |        |
| 2              | 130,25 | 69,09  | 187,68 | 159,64 | 109,27 | 240,52 | 78,63  | 203,85 | 105,40 | 127,18 |        |
| 2,5            | 84,13  | 47,73  | 166,61 | 137,02 | 75,29  | 180,34 | 55,69  | 191,40 | 64,08  | 129,79 |        |
| 3              | 90,06  | 35,07  | 122,17 | 105,63 | 62,65  | 136,25 | 28,32  | 188,41 | 42,31  | 99,25  |        |
| 3,5            | 77,50  | 44,27  | 109,13 | 82,87  | 45,92  | 115,59 | 23,66  | 124,99 | 19,26  | 87,51  |        |
| 4              | 66,43  | 39,16  | 102,49 | 74,92  | 35,98  | 93,50  | 23,01  | 117,51 | 19,46  | 73,90  |        |
| 4,5            | 56,42  | 31,38  | 75,16  | 58,04  | 25,05  | 117,12 | 15,00  | 116,10 | 17,63  | 74,05  |        |
| 5              | 50,01  | 30,93  | 75,16  | 64,96  | 28,92  | 105,55 | 14,44  | 98,10  | 25,25  | 65,69  |        |
| 6              | 28,49  | 17,89  | 59,87  | 50,40  | 17,03  | 89,13  | 8,28   | 79,95  | 23,43  | 57,29  |        |
| 7              | 28,45  | 10,79  | 44,62  | 41,40  | 9,42   | 57,09  | 5,58   | 67,67  | 18,82  | 42,64  |        |
| 8              | 23,54  | 7,13   | 43,44  | 35,34  | 6,69   | 44,44  | 0,00   | 38,49  | 10,19  | 36,36  |        |
| 10             | 14,08  | 3,61   | 36,91  | 22,54  | 4,49   | 30,16  | 0,00   | 21,19  | 6,59   | 26,69  |        |

**Anexo 6.** Modelos de regresión lineal para el efecto de la presencia de la variante genética CYP2C9, CYP3A4-CYP2C9 y CYP3A4/2C9 sobre los parámetros farmacocinéticos ajustado por edad, género e índice de masa corporal.

| Parámetro.             | Gen       | Coeficiente de regresión | Error Estándar | p-value      | IC 95%      |             |
|------------------------|-----------|--------------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|
|                        |           |                          |                |              | IC inferior | IC superior |
| Ln C <sub>máx</sub>    |           | -0,0972284               | 0,1623361      | <b>0,554</b> | -0,4297587  | 0,2353019   |
| Ln ABC <sub>0→10</sub> |           | 0,3179593                | 0,2482157      | <b>0,211</b> | -0,1904875  | 0,8264061   |
| Ln ABC <sub>0→∞</sub>  | 2C9wt/*2  | 0,4469037                | 0,2704718      | <b>0,110</b> | -0,1071328  | 1,00094     |
| Ln K <sub>e</sub>      |           | -0,5570705               | 0,2904689      | <b>0,065</b> | -10,152069  | 0,0379281   |
| Ln t <sub>máx</sub>    |           | 0,3948908                | 0,2798516      | <b>0,169</b> | -0,1783592  | 0,9681408   |
| Ln C <sub>máx</sub>    |           | -0,1866326               | 0,1533457      | 0,234        | -0,5012719  | 0,1280067   |
|                        |           | -0,1173617               | 0,1618065      | 0,474        | -0,4493613  | 0,2146378   |
| Ln ABC <sub>0→10</sub> |           | -0,1947773               | 0,2378796      | 0,420        | -0,682866   | 0,2933114   |
|                        |           | 0,2969473                | 0,2510047      | 0,247        | -0,2180717  | 0,8119664   |
| Ln ABC <sub>0→∞</sub>  | 3A4wt/*1B | -0,1871098               | 0,2599251      | 0,478        | -0,720432   | 0,3462124   |
|                        | 2C9wt/*2  | 0,4267189                | 0,2742665      | 0,131        | -0,1360294  | 0,9894671   |
| Ln K <sub>e</sub>      |           | 0,1016519                | 0,2811285      | 0,720        | -0,4751762  | 0,6784801   |
|                        |           | -0,5461046               | 0,2966398      | 0,077        | -1,154759   | 0,06255     |
| Ln t <sub>máx</sub>    |           | 0,124593                 | 0,2704467      | 0,649        | -0,4303179  | 0,6795039   |
|                        |           | 0,4083315                | 0,2853687      | 0,164        | -0,1771967  | 0,9938596   |
| Ln C <sub>máx</sub>    |           | -0,1540668               | 0,114967       | <b>0,191</b> | -0,3895662  | 0,0814325   |
| Ln ABC <sub>0→10</sub> |           | 0,0363934                | 0,1852635      | <b>0,846</b> | -0,3431017  | 0,4158885   |
| Ln ABC <sub>0→∞</sub>  | 3A4/2C9   | 0,1014647                | 0,2047967      | <b>0,624</b> | -0,3180423  | 0,5209717   |
| Ln K <sub>e</sub>      |           | -0,2028728               | 0,2209801      | <b>0,366</b> | -0,65553    | 0,2497844   |
| Ln t <sub>máx</sub>    |           | 0,2579848                | 0,2045202      | <b>0,218</b> | -0,1609558  | 0,6769253   |

**Anexo 7.** Curva de concentración plasmática de Zolpidem en el tiempo de todos los voluntarios.

