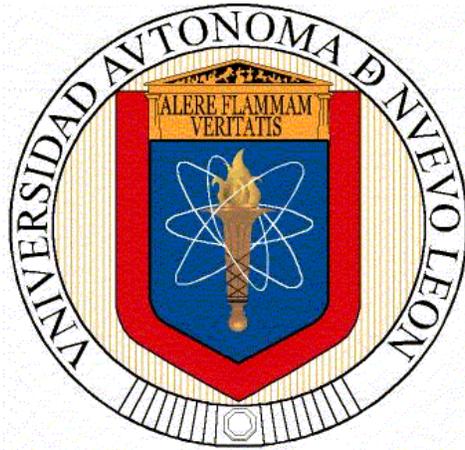


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RESVERATROL SOBRE EL
PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA SIMVASTATINA**

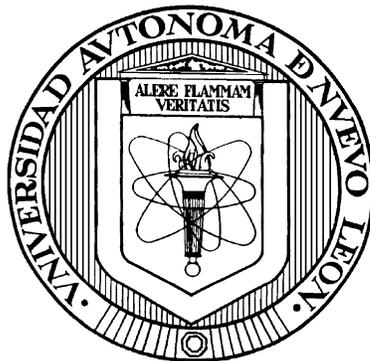
POR:

M.C.P. PEDRO LENNON SÁENZ CHÁVEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACOLOGÍA
Y TOXICOLOGÍA**

JULIO 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RESVERATROL SOBRE
EL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA SIMVASTATINA**

POR:

M.C.P. PEDRO LENNON SÁENZ CHÁVEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA**

JULIO 2015

DEDICATORIA

A mi esposa y mis hijos:

Son mi mundo entero y mi “raison d’être”.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Pedro Francisco Sáenz y María Guadalupe Chávez, quienes me enseñaron la importancia de estudiar, trabajar y de cuidar de tu familia.

A mi esposa, Esthela Margarita, por su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

A la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas, directora de tesis, por su gran apoyo en la realización de esta tesis.

A la comisión de tesis: la Dr. C. Teresa Zanatta, el Dr. C. Christian Badillo y el Dr. C. Eduardo Tamez de la O, sus comentarios y asesorías fueron vitales para este proyecto. Al Ph. D. Marco Vinicio Gómez Meza por su apoyo en la realización del análisis estadístico

A mis maestros, el Dr. C. Víctor Tamez y el Dr. med. Juan Antonio Cuellar por sus enseñanzas dentro y fuera del aula.

Mis compañeros(as) de doctorado: Triana, Argentina, Diana, Tatiana, Sandra; somos un equipo, somos colegas y siempre estuvieron ahí para ayudarme durante las materias y los seminarios.

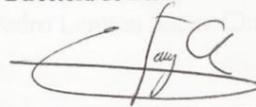
Al Dr. Oscar Torres Alanís (q.e.p.d.), mi mayor influencia en la carrera de medicina. Le agradezco que me enseñara este camino de la ciencia e investigación.

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE
RESVERATROL SOBRE EL PERFIL
FARMACOCINETICO DE LA SIMVASTATINA**

Aprobación de la Tesis:



Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Directora de Tesis



Dr. C. EDUARDO JAVIER TAMEZ DE LA O
Co-Director de la Tesis



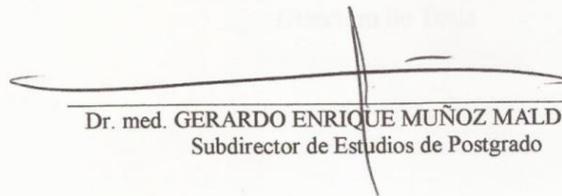
Dr. C. MARIA TERESA ZANATTA CALDERÓN
Comisión de Tesis



Dr. C. CHRISTIAN TADEO BADILLO CASTAÑEDA
Comisión de Tesis



Ph. D. MARCO VINICIO GÓMEZ MEZA
Comisión de Tesis



Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RESVERATROL SOBRE EL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA SIMVASTATINA

Presentado por
M.C.P. Pedro Lennon Sáenz Chávez

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas.

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Directora de Tesis

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del estudio: **EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE RESVERATROL
SOBRE EL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA SIMVASTATINA**

Número de páginas: 121

La medicina herbolaria es muy utilizada en nuestro país y muchas veces el médico no interroga al paciente por remedios herbolarios que pudiera estar consumiendo de manera concomitante con los fármacos convencionales. Las personas consumen estos remedios por la creencia de que son de origen natural y no producen daño. Existe evidencia de interacciones entre los remedios herbolarios y los fármacos convencionales. Las interacciones ocurren cuando el uso de 2 o más medicamentos o sustancias de origen natural interfiere en la farmacocinética o farmacodinámica de alguno de ellos. El resveratrol es un polifenol aislado de la uva y de otras plantas como el *Polygonum cuspidatum* al que se le han atribuido, entre otras funciones, actividad antitumoral, actividad para bajar de peso, incremento de longevidad y protección cardiovascular. El resveratrol se encuentra a la venta sin prescripción médica y por las propiedades que se le atribuyen y ser de origen natural existe la posibilidad de que sea consumido por tiempo prolongado por pacientes que estén recibiendo fármacos como la simvastatina que es un inhibidor de HMG CoA reductasa usado en el tratamiento de las dislipidemias, generalmente por tiempo prolongado. Se ha reportado que el resveratrol inhibe al CYP3A4 enzima responsable del metabolismo de la simvastatina por lo que la administración concomitante con éste fármaco puede producir una interacción metabólica con incremento de las concentraciones plasmáticas y mayor riesgo de toxicidad.

Objetivo. Evaluar el efecto del resveratrol sobre el perfil farmacocinético ($C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$ y ABC) de la simvastatina.

Material y métodos. El estudio fue prospectivo, longitudinal, abierto, a una dosis única de simvastatina 40mg administrada por vía oral, en dos períodos bajo condiciones de ayuno, en 8 de sujetos de investigación sanos de ambos géneros. En la primera fase se administró la simvastatina, se tomaron 17 muestras sanguíneas en un lapso de 24 h y se determinó su perfil farmacocinético (basal), en la segunda fase los sujetos recibieron 500mg de resveratrol diariamente durante 30 días y en la tercera fase se determinó de nuevo el perfil farmacocinético de simvastatina. Se evaluó además la tolerabilidad de resveratrol mediante exámenes de laboratorio (BH, perfil bioquímico y examen general de orina).

Resultados. El resveratrol(500mg durante 30 días) fue bien tolerado, no produjo ninguna alteración clínicamente significativa en los exámenes de laboratorio y no se reportaron efectos adversos en ningún sujeto. Al comparar los parámetros farmacocinéticos de simvastatina, obtenidos antes y después de la administración de resveratrol, se observó un incremento en el $C_{m\acute{a}x}$ (6.47 vs 20.23 ng/mL respectivamente), en el ABC_0-t (28.27 vs 97.95 ng/mL/hr respectivamente) y en el $ABC_0-\infty$ (33.79 vs 118.64 ng/mL/hr).

Conclusiones. El resveratrol interactuó con el metabolismo de la simvastatina y produjo un incremento en sus concentraciones plasmáticas. Existe la posibilidad de que los pacientes que estén consumiendo simvastatina y resveratrol simultáneamente tengan un mayor riesgo de desarrollar los efectos adversos (hepatotoxicidad, rabdomiólisis) reportados con el uso crónico de este fármaco.

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas
Directora de Tesis

INDICE

Capitulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Medicina tradicional y herbolaria	1
1.2 Interacciones farmacológicas	3
1.2.1 Interacciones farmacocinéticas	4
1.2.1.1 Interacciones a nivel de absorción	4
1.2.1.2 Interacciones a nivel de unión a proteínas	4
1.2.1.3 Interacciones a nivel de metabolismo	5
1.2.2 Interacciones farmacodinámicas	8
1.2.3 Herbolaria e interacciones farmacológicas	9
1.3 Resveratrol	11
1.3.1 Fuentes de resveratrol	11
1.3.2 Cinética del resveratrol	12
1.3.3 Propiedades farmacológicas del resveratrol	12
1.4 Efecto de resveratrol sobre enzimas metabólicas	15
1.5 Enfermedades cardiovasculares	15
1.5.1 Tratamiento de las dislipidemias	16
1.6 Inhibidores de la HMG CoA reductasa	16
1.6.1 Metabolismo de las estatinas	18
1.7 Evaluación de interacciones medicamentosas	19
JUSTIFICACION	21
OBJETIVOS	22
Objetivo General	
Objetivos Específicos	

2. MATERIAL Y METODOS	23
2.1 Material	23
2.1.1 Material General	23
2.1.2 Equipos	24
2.1.3 Reactivos	24
2.2 Métodos	25
2.2.1 Diseño experimental	25
2.2.1.1 Tipo de estudio	25
2.2.1.2 Consideraciones éticas	25
2.2.1.3 Tamaño de muestra	26
2.2.1.4 Población	26
2.2.1.5 Criterios de inclusión	27
2.2.1.6 Criterios de exclusión	28
2.2.2 Medicamentos del estudio	31
2.2.2.1 Simvastatina	31
2.2.2.2 Resveratrol	32
2.2.3 Preparación de las cápsulas de Resveratrol	32
2.2.4 Administración de medicamentos	33
2.2.5 Fases del estudio	33
2.2.5.1 Primera fase	33
2.2.5.2 Segunda fase	34
2.2.5.3 Tercera fase	35
2.2.5.4 Frecuencia de toma de signos vitales	35
2.2.5.5 Revisión de efectos adversos	36
2.2.6 Muestras recolectadas	36
2.2.6.1 Almacenamiento de las muestras obtenidas	37
2.2.7 Procedimiento para la determinación de Simvastatina	37
2.2.7.1 Método analítico	38

2.2.7.2 Determinación de concentraciones plasmáticas de Simvastatina	38
2.2.7.3 Técnica analítica de medición	39
2.2.7.4 Preparación de soluciones	40
2.2.7.5 Procesamiento de muestras	41
2.2.7.6 Validación del método analítico	42
2.2.7.6.1 Selectividad	
2.2.7.6.2 Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas	43
2.2.7.6.3 Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas	44
2.2.7.6.4 Límite inferior de cuantificación	45
2.2.7.6.5 Curva de calibración	46
2.2.7.6.6 Precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad	47
2.2.7.6.7 Precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad	48
2.2.7.6.8 Estabilidad de la muestra	48
2.2.7.6.8.1 Estabilidad a largo plazo	49
2.2.7.6.8.2 Estabilidad de la muestra procesada	50
2.2.7.6.8.3 Estabilidad en el automuestreador	51
2.2.7.6.8.4 Estabilidad en función de ciclos de congelación y descongelación	51
2.2.7.6.8.5 Estabilidad del analito en solución	
2.2.7.7 Análisis de muestras biológicas	
2.2.7.8 Control de calidad de la corrida analítica	
2.2.7.9 Criterios de reanálisis de muestras biológicas	
2.2.8 Análisis farmacocinético y estadístico	

3. RESULTADOS	60
3.1 Variables demográficas de los sujetos	60
3.2 Toma de signos vitales y alimentos	61
3.2.1 Signos vitales	61
3.2.2. Alimentos	67
3.3 Resultados de perfiles bioquímicos de los sujetos de investigación	67
3.4 Número de muestras recolectadas	73
3.5 Desviaciones al protocolo	73
3.6 Efectos adversos	73
3.7 Resultados de la validación del método analítico	74
3.7.1 Selectividad	74
3.7.2 Límite de Cuantificación	75
3.7.3 Repetibilidad	76
3.7.4 Reproducibilidad	76
3.7.5 Curva de calibración	77
3.7.6 Estabilidad de las muestras	79
3.8 Resultados del análisis de muestras biológicas	79
3.9 Resultados del análisis estadístico	96
4. DISCUSIÓN	98
4.1 Validación	99
4.2 Análisis de muestras biológicas	101
4.3 Eventos adversos y tolerabilidad	101
4.4 Parámetros farmacocinéticos de simvastatina	103
4.5 Análisis estadístico	105

5. CONCLUSIONES	108
6. PERSPECTIVAS	109
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	110
GLOSARIO	116
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO	123

LISTADO DE FIGURAS

Capítulo 1.

Figura 1. Fracción de los fármacos usados en la clínica que son metabolizados por las principales enzimas del citocromo P450

Figura 2. Fórmulas estructurales de estatinas disponibles en el mercado actualmente

Figura 3. Gráfica de concentración vs tiempo

Capítulo 3.

Figura 4. Gráfica de la presión arterial sistólica promedio durante el estudio

Figura 5. Gráfica de la presión arterial diastólica promedio durante el estudio

Figura 6. Gráfica de la frecuencia cardiaca promedio durante el estudio

Figura 7. Gráfica de la frecuencia respiratoria promedio durante el estudio

Figura 8. Gráfica de la temperatura promedio durante el estudio

Figura 9. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 01

Figura 10. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 02

Figura 11. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 03

Figura 12. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 04

Figura 13. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 05

Figura 14. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 06

Figura 15. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo en el Sujeto 07

Figura 16. Perfil farmacocinético promedio de Simvastatina \pm error estándar en escala normal

Figura 17. Perfil farmacocinético promedio de Simvastatina \pm error estándar en escala semilogarítmica

LISTADO DE TABLAS

Capítulo 1.

Tabla 1. Enzimas P450 presentes en el humano

Tabla 2. Fármacos inductores de enzimas metabólicas

Tabla 3. Fármacos inhibidores de citocromos.

Tabla 4. Efecto de algunos fitoterapéuticos sobre los citocromos

Tabla 5. Niveles normales de Lípidos

Tabla 6. Farmacocinética de las estatinas.

Capítulo 2.

Tabla 7. Valores normales de referencia de la Biometría Hemática, la Química sanguínea, las Pruebas de Función Hepática y la Serología

Tabla 8. Valores de referencia del Examen General de Orina.

Tabla 9. Horario de ingesta de alimentos por los sujetos de investigación

Tabla 10. Valores normales de los signos vitales

Tabla 11. Tiempo de muestreo para la fase 1

Tabla 12. Condiciones del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución con Detección de Masas en Tándem (LC-MS-MS)

Tabla 13. Condiciones del espectrómetro de masas

Tabla 14. Condiciones de la fuente de ionización

Capítulo 3.

Tabla 15. Descripción de los datos demográficos de los sujetos de estudio

Tabla 16. Frecuencia de toma de signos vitales

Tabla 17a Signos vitales tomados pre-estudio en el primer periodo

Tabla 17b Signos vitales tomados en la mañana del primer periodo

Tabla 17c Signos vitales tomados en la tarde del primer periodo

Tabla 17d Signos vitales tomados al egreso del primer periodo

Tabla 18a Signos vitales tomados pre-estudio en el segundo periodo

Tabla 18b Signos vitales tomados en la mañana del segundo periodo

Tabla 18c Signos vitales tomados en la tarde del segundo periodo

Tabla 18d Signos vitales tomados al egreso del segundo periodo

Tabla 19a y 19b. Resultados de exámenes de perfil bioquímico previo al tratamiento con Resveratrol.

Tabla 20a y 20b. Resultados de exámenes de perfil bioquímico posterior al tratamiento con Resveratrol.

Tabla 21. Comparación entre perfiles de lípidos al inicio y al final del estudio

Tabla 22. Valores promedio de parámetros de perfil bioquímico

Tabla 23. Resultados, criterios de aceptación y evaluación de la selectividad

Tabla 24a. Datos obtenidos para la evaluación de repetibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 24b. Resultados y evaluación de repetibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tablas 25a Datos obtenidos para la evaluación de reproducibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 25b. Resultados y evaluación de reproducibilidad para el límite inferior de cuantificación.

Tabla 26a Resultados y evaluación de precisión a condiciones de repetibilidad

Tabla 26b Resultados y evaluación de exactitud a condiciones de repetibilidad

Tabla 27a Resultados y evaluación de precisión a condiciones de reproducibilidad

Tabla 27b Resultados y evaluación de exactitud a condiciones de reproducibilidad

Tabla 28a Datos obtenidos para la evaluación de la curva de calibración

Tabla 28b Resultados del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración

Tabla 28c Evaluación del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración

Tabla 28d Evaluación con respecto al porcentaje de réplicas que cumplen con el criterio de aceptación.

Tabla 28e Evaluación de la exactitud de la curva de calibración por niveles.

Tabla 29. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 01

Tabla 30. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 02

Tabla 31. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 03

Tabla 32. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 04

Tabla 33. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 05

Tabla 34. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 06

Tabla 35. Concentraciones obtenidas en el análisis de Simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 07

Tabla 36. Promedio de concentraciones plasmáticas de Simvastatina

Tabla 37. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de simvastatina, transformados logarítmicamente

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
ABC	Área Bajo la Curva
ABC _{0-∞}	Área bajo la curva desde el tiempo cero al infinito
ABC _{0-t}	Área bajo la curva desde el tiempo cero al último tiempo de muestreo
Ags VHB	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
ANADEVA	Análisis de Varianza
BIP	Blanco pool
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
% CV	Porcentaje de coeficiente de variación
FMN	Factor de matriz normalizado
fL	Femtolitros
h	Hora

h/mL	Hora por mililitro
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IC	Intervalo de Confianza
ICH	International Conference on Harmonization
Pg	Picogramos
Ke	Constante de eliminación
Kg/m ²	Kilogramo por metro cuadrado
L	Litro
LS-MS-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
LIC	Límite inferior de cuantificación
LSC	Límite superior de cuantificación
MCA	Muestra control de concentración alta (SCC de concentración alta)
MCB	Muestra control de concentración baja (SCC de concentración baja)
MCM	Muestra control de concentración media (SCC de concentración media)
MTBE	MetilTerbutilEter
mL	Mililitro
µL	Microlitro
ng/mL	Nanogramó por mililitro
S	Segundo

Sa	Solución de analito en matriz limpia utilizada para adición de los extractos de matriz biológica
SC	Solución de analito en matriz limpia o biológica utilizada para documentar la evaluación de control de calidad aplicado a una metodología analítica
SCC	Muestra de control adicionada con analito, pre procesamiento
SD	Dilución de la solución madre en el solvente apropiado
SEAS	Soluciones en matriz limpia adicionada empleadas para evaluar la estabilidad del analito en solución y preparadas a los niveles limitantes de concentración aplicados a las SCs
SEML	Matriz limpia sin procesar con adición de analito.
SM	Disolución directa de la sustancia de referencia en el solvente apropiado
SPH	Matriz biológica bemozizada procesada, sin adición de analito
SPHa	Matriz biológica bemozizada procesada, con adición de analito post procesamiento
SPL	Matriz biológica lipémica procesada, sin adición de analito
SPLa	Matriz biológica lipémica procesada con adición de analito post procesamiento.
SPN	Matriz biológica normal procesada, sin adición de analito

SPNa	Matriz biológica normal procesada con adición de analito post procesamiento
SPP	Solución de pool de plasma
SSA	Matriz biológica adicionada individualmente con diversos anticoagulantes y procesada sin adición de analito.
SSF	Matriz biológica adicionada individualmente con diversos fármacos concomitantes, sin adición de analito
SV	Solución de verificación del sistema analítico de medición
r^2	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
$T_{1/2}$	Vida media plasmática
T_{max}	Tiempo máximo
VDRL	Prueba luética (diagnóstico de sífilis)
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

1.1 Medicina tradicional y herbolaria

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la medicina tradicional como la suma total de los conocimientos, habilidades, y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias indígenas a las diferentes culturas, que son usadas para mantener la salud, así como para prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales.

De acuerdo a la OMS, hasta un 80% de la población en Asia y África usan plantas medicinales como medicina complementaria o alternativa, esto mismo se ha reportado hasta en 70% de la población en los países desarrollados de occidente¹.

Las personas que usan este tipo de medicina alternativa no saben que los remedios herbolarios pueden alterar el efecto de los fármacos convencionales o que tienen efectos dañinos por sí solos, más bien, creen que la medicina herbolaria está libre de riesgos por ser natural².

En un estudio realizado por Romero y colaboradores en el Instituto Mexicano del Seguro Social, en el cual se encuestó a médicos para averiguar su grado de conocimiento de remedios herbolario se encontró que sólo un 55.7% de médicos tenía información sobre remedios herbolarios, el 80% fueron clasificados con conocimiento básico (el más bajo)

de los remedios herbolarios. El médico rara vez interroga por estos medicamentos en la historia clínica³.

Ernst en 2004, reportó que hasta un 67% de las mujeres usan medicina herbolaria como tratamiento de síntomas perimenstruales⁴.

Slevin reportó en el 2012 que aproximadamente 73% de pacientes con enfermedad vascular aguda usan algún suplemento de vitaminas y minerales, 20% usan productos herbales y 35% aminoácidos de manera concomitante con sus fármacos convencionales. El médico rara vez interroga por el consumo de estos medicamentos en la historia clínica⁵.

DeSmet reportó que el uso de las terapias alternativas usualmente retrasa el inicio de un tratamiento médico e incluso disminuye la adherencia al mismo⁶.

La mayoría de las recomendaciones sobre el uso de estos remedios no proviene de un médico o especialista, sino de amigos o familiares⁷.

Algunos remedios herbolarios comúnmente utilizados son: *Panax ginseng* (Ginseng), *Allium sativum* (Ajo), *Serenoa repens* (Palma enana), *Psidium guajava* (Guayaba), *Matricharia chamomilla* (Manzanilla), *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan), *Ginkgo biloba*, *Echinacea purpura*, *Polygonum cuspidatum*, *Glycyrriza glabrata* (Regaliz), entre otros⁸.

1.2 Interacciones farmacológicas

Existen dos procesos importantes dentro de la farmacología médica denominados farmacocinética y farmacodinamia.

La farmacocinética estudia la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos, mientras que la farmacodinamia estudia los efectos de las sustancias químicas en el organismo y comúnmente se le conoce como mecanismo de acción⁹.

Generalmente los pacientes toman 2 o más medicamentos juntos, no tienen conocimiento de que la administración concomitante de varios medicamentos o de medicamentos con productos herbolarios puede producir una interacción entre ellos.

Se conoce como interacción medicamentosa a la alteración de la farmacocinética y/o farmacodinamia de un medicamento ocasionada por la administración conjunta con otro medicamento, suplemento alimenticio, vitaminas, productos herbolarios usados como fitoterapia o dieta entre otros^{9,10}.

Con la mayoría de estas interacciones se han reportado efectos menores y moderados, pero las pocas reacciones severas que se pudieron evitar son de gran importancia¹¹.

Estas interacciones pueden repercutir en la farmacocinética y/o en la farmacodinamia de uno o ambos fármacos involucrados y puede ocurrir desde la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación. El resultado usualmente es de actividad farmacológica disminuida, pero también pueden ocurrir potenciaciones de efectos adversos e incluso

incremento en la toxicidad de uno o ambos fármacos, como en el caso del uso de los inhibidores de la Hidroximetil Glutaril Coenzima A reductasa(estatinas) combinados con fármacos inhibidores de enzimas metabólicas de la familia del CYP3A4⁶.

1.2.1 Interacciones farmacocinéticas

Son las interacciones que ocurren en la absorción, distribución o en el metabolismo. Incrementan o disminuyen la velocidad de la eliminación de uno o de ambos fármacos^{12, 13}.

1.2.1.1 Interacción a nivel de absorción

Un fármaco puede causar un incremento o disminución de la absorción de otro fármaco en la luz intestinal. Son ejemplos clásicos la ranitidina cuyo efecto antiácido impide la absorción de fármacos y las resinas secuestradoras de ácidos biliares como la colestiramina, cuyo efecto en luz intestinal disminuye absorción de muchos medicamentos como el propranolol y las estatinas^{9, 12}.

1.2.1.2 Interacción a nivel de unión a proteínas

Los fármacos con alto grado de unión a proteínas plasmáticas, como la albúmina y la glucoproteína alfa 1 ácida, pueden desplazar a otros de su sitio de unión, por ejemplo la warfarina o la glibenclamida, incrementando así la fracción libre y por ende su toxicidad^{9, 13}.

1.2.1.3 Interacción a nivel de metabolismo

El efecto de inhibición o de inducción que pueden tener los fármacos u otras sustancias como los remedios herbolarios sobre las enzimas metabólicas, especialmente las de la familia de citocromos P450 puede llevar a una disminución o incremento de la vida media de eliminación de otro fármaco, produciendo toxicidad (por la acumulación del fármaco) o un efecto subterapéutico (por incremento en su eliminación)⁹.

La inhibición de las enzimas metabólicas conlleva a una acumulación del fármaco o sustancia mientras que la inducción enzimática produce más metabolitos hidrosolubles, incrementa su eliminación y por ende produce un efecto farmacológico disminuido o nulo.

El sistema enzimático del citocromo P450 es una familia de enzimas metabólicas cuya función es la biotransformación de los fármacos u otras sustancias en el hígado. Se han identificado más de 50 isoenzimas, pero son el CYP3A4, el CYP2D6 y el CYP2C9 las que más actividad y más sustratos poseen (Figura 1). Las enzimas del citocromo se expresan en hígado, riñón, intestino, pulmón y SNC⁹. El hígado contiene la mayor cantidad de CYP que metabolizan fármacos y otras sustancias lo que asegura el metabolismo eficaz de primer paso^{9, 12}.

Los citocromos se denominan con el sufijo CYP seguida de un número que denota la familia, una letra que indica la subfamilia y otro número que designa la isoforma. Por lo tanto, CYP3A4 corresponde a la familia 3, subfamilia A e isoforma 4⁹.

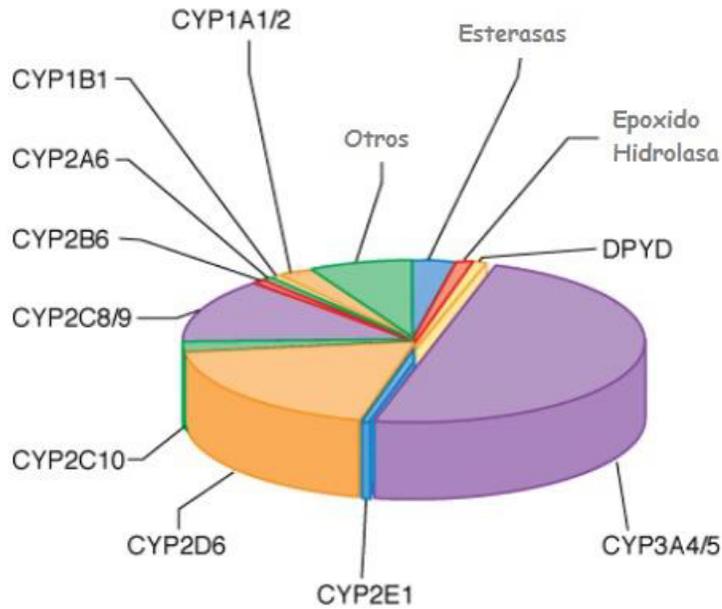


Figura1. Fracción de los fármacos usados en la clínica que son metabolizados por las principales enzimas del citocromo P450 ⁹

Los distintos citocromos poseen varios sustratos (Tabla 1), se considera que son promiscuos (inespecíficos), a diferencia de otras enzimas metabólicas como la Monoaminoxidasa cuyos sustratos son más específicos.

CYP	Sustratos
1A2	Paracetamol, antipirina, cafeína, tacrina, teofilina
2A6	Cumarínicos, nicotina
2B6	Artemisinina, bupropión, efavirenz, ketamina, propofol, selegilina
2D6	Clomipramina, codeína, dextrometorfano, fluoxetina, metoprolol, oxicodona, risperidona, tamoxifeno, timolol.
3A4	Paracetamol, amiodarona, astemizol, cocaína, diazepam, eritromicina, indinavir, lidocaína, lovastatina, miconazol, nifedipino, quinidina, espironolactona, simvastatina , sulfametoxazol, sufentanilo, terfendina.
2C9	Celecoxib, flurbiprofeno, losartán, fenitoína, tolbutamida

Tabla 1. Enzimas P450 presentes en el humano y algunos de los fármacos metabolizados por las mismas (sustratos).

Algunas diferencias en la velocidad del metabolismo de un fármaco son secundarias a las interacciones farmacológicas. Muy a menudo sucede cuando se administran en forma simultánea 2 fármacos y es la misma enzima que metaboliza a ambos. Por ejemplo, el antimicótico de uso frecuente ketoconazol con inhibidores de proteasa (fármacos usados en la terapia del VIH), inhibe la conversión de los últimos a metabolitos hidrosolubles, incrementando así su concentración plasmática¹².

Por otro lado, la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) es un potente inductor enzimático de enzimas CYP3A4, y al administrarse en conjunto con fármacos esteroideos como los anticonceptivos orales anula la eficacia de la dosis tradicional para evitar el embarazo. Existen otros fármacos y alimentos que actúan como inductores de las enzimas del citocromo (Tabla 2).

Fármacos Inductores

Tabaquismo

Fenobarbital

Rifampicina

Alimentos al carbón

Verduras crucíferas

Etanol

Isoniazida

Tabla 2. Fármacos inductores de enzimas metabólicas

La terfenadina, antes un antihistamínico popular, fue retirado del mercado porque su metabolismo era inhibido por sustratos del CYP3A4 como la eritromicina y por el jugo de toronja. La terfenadina es en realidad un profármaco que se convierte a su metabolito activo por medio del CYP3A4, el compuesto original en concentraciones altas genera la Torsades de Pointes (taquicardia ventricular en entorchado), que es una arritmia potencialmente letal⁹.

La inhibición del CYP3A4 es la interacción medicamentosa más común, pues hay cientos de fármacos y productos herbolarios que pueden producir este efecto de interacción^{9, 12}. Existen otros fármacos y sustancias que actúan como inhibidores de los citocromos (Tabla 3).

Fármacos Inhibidores
Claritromicina
Eritromicina
Fluconazol
Ketoconazol
Cimetidina

Tabla 3. Fármacos inhibidores de citocromos.

1.2.2 Interacciones farmacodinámicas

En cuanto al efecto producido por los fármacos, las interacciones pueden ser aditivas o sumativas, sinérgicas, de potenciación o antagonistas (competitivas y no competitivas).

La interacción aditiva ocurre cuando dos fármacos con efecto similar se administran en combinación y el efecto resultante equivale a la suma del efecto de cada uno de ellos administrado por separado. La interacción de potenciación ocurre cuando se administran 2 fármacos que actúan en distintos receptores y producen una respuesta mayor a la suma de sus efectos individuales.

El antagonismo es la interferencia de un fármaco con la acción de otro. Si la interferencia es a nivel del mismo receptor se denomina antagonismo competitivo, si es en diferentes receptores se denomina antagonismo no competitivo^{9,12}.

1.2.3 Herbolaria e interacciones farmacológicas

Existen varios constituyentes herbolarios de la dieta cuyos metabolitos intermediarios han demostrado inhibir irreversiblemente algunos citocromos, a saber: bergamotina (de la toronja), capsaicina (chiles), glabridina (regaliz), isotiocianatos (vegetales crucíferos), oleuropeina (aceite de olivo)¹⁴. Otras interacciones importantes descritas incluyen la del *Ginkgo biloba* que tiene la capacidad de inducir al CYP2C19, por lo que disminuye las concentraciones plasmáticas de fármacos como el Omeprazol. También ha sido reportado que la planta china Xiao-Chai-Hu-Tang que disminuye la biodisponibilidad oral de prednisolona⁸.

En una revisión realizada por Hu y colaboradores se encontró que, si bien hay interacciones ya demostradas, como el ejemplo de *Silybum marianum* que disminuye las concentraciones del indinavir en humanos y el *Ginkgo biloba* que produce un aumento

en sangrados al consumirlo junto con aspirina y warfarina, existen más interacciones teóricas basadas en evidencia preclínica ¹⁵.

Chen y colaboradores describieron que las vías de metabolismo de los fármacos y los fitoterapéuticos son las mismas, y es factible que existan muchas plantas y extractos que inhiban o estimulen a los citocromos responsables del metabolismo, alterando así la vida media de eliminación de los fármacos que usen la misma vía ^{16,17}.

Se ha demostrado el efecto de algunas plantas y alimentos sobre los citocromos responsables del metabolismo de fármacos (Hierba de San Juan, jugo de toronja, entre otros) por lo que han llegado a ser consideradas como una contraindicación médica ⁸. Son diversos los efectos que los fitoterapéuticos pueden tener sobre las enzimas del citocromo (Tabla 4).

	CYP3A4	CYP2E1	CYP2C9	CYP2D6	CYP2C19
Resveratrol	↓		↓	↓	
Capsaicina		↓			
<i>Allium sativum</i>	↑	↓			
Rotenona	↓				
<i>Panax ginseng</i>	↑ ↓		↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
Hierba de San Juan	↑↑				
<i>Kava kava</i>	↓	↓		↓	
<i>Ginkgo biloba</i>					↑
Jugo de Toronja	↓↓	↓	--	↓	--

Tabla 4. Efecto de algunos fitoterapéuticos sobre los citocromos. ↑: Inducción del citocromo ↓: Inhibe el citocromo ^{8, 16, 17, 18}

1.3 Resveratrol.

El resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxistilbeno) es una fitoalexina polifenólica, producida por plantas en respuesta a estrés y pertenece al grupo de los fitoestrógenos. Especialmente se ha descrito la producción de resveratrol como protección contra *Botrytis cinerea*, hongo patógeno de muchas plantas¹⁹.

Fue descubierto en 1940, catalogado en 1976 como fitoalexina y descubierto como compuesto del vino tinto en 1992. En los últimos años ha habido un auge en el ámbito de investigación de este compuesto^{18,20}.

1.3.1 Fuentes del resveratrol.

Se encuentra en el vino tinto, uvas, pistaches, nueces, cacahuates, moras, entre otros alimentos y algunas plantas como *Polygonum cuspidatum*. Se encuentra en mayor cantidad en las uvas rojas y moradas. En la naturaleza puede encontrarse como trans-, cis- y dihidro-resveratrol²¹.

Actualmente el resveratrol está disponible en el mercado en presentación de cápsulas de 500mg y se vende sin prescripción médica.

La concentración de resveratrol en el vino depende de la temporada y la cantidad de uvas en el producto²². En 1 onza de vino tinto (28.4mL) existen aproximadamente 160 microgramos de resveratrol²³. En una determinación por LC-MS se encontraron 1042nmol/g de uva, 8.6-24.8 micromol/L de vino, 1.07nmol/g en jugo de uva y 1.56 nmol/g en jugo de arándano²⁴.

1.3.2 Cinética del resveratrol.

Existe suficiente evidencia acumulada sobre la seguridad y tolerabilidad del resveratrol, así como de su perfil cinético y metabólico; quedando aún pendiente esclarecer el mecanismo de acción y ensayos clínicos apropiados sobre su efectividad en humanos²⁵.

Después de dosis repetidas tanto vía oral como parenteral en voluntarios sanos, se determinaron los parámetros farmacocinéticos del resveratrol, siendo su vida media de 9.2 horas, absorción de 70%, biodisponibilidad plasmática menor a 1%; la sulfatación en intestino delgado parece ser el paso limitante en la biodisponibilidad²⁶. Sólo una pequeña proporción del resveratrol oral pasa a circulación²⁷.

El metabolismo extenso en hígado sólo permite 1% de biodisponibilidad después de la administración oral de resveratrol. Las dosis repetidas no mejoran esta situación de manera significativa²⁶. En un estudio realizado en dosis repetidas, se determinaron los metabolitos más importantes como glucurónido y sulfato de resveratrol²⁸

1.3.3 Propiedades farmacológicas del resveratrol.

Son múltiples los efectos positivos del resveratrol ya demostrados en modelos in vitro y otros pocos en ensayos clínicos en humanos, a saber: efecto antiaterosclerótico y cardioprotector, efecto antiagregante plaquetario, anticáncer, antiviral, hipolipemiante, antioxidante y neuroprotector.

El efecto en la aterosclerosis del resveratrol involucra múltiples vías, entre las que se destaca la disminución de la agregación plaquetaria, disminución de expresión de factor de necrosis tumoral alfa, disminución de angiogénesis, disminución de lipogénesis y aumento de lipólisis entre otros ^{18,29}. El resveratrol puede inhibir el influjo de calcio a la plaqueta, bloquear el ADP e inhibir el tromboxano A2, con lo que se disminuye la agregación plaquetaria⁵.

Como parte del efecto hipolipemiante, el resveratrol inhibe la síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol en hepatocitos de ratas ³⁰. El estrés oxidativo juega un papel importante en las enfermedades cardiovasculares, disminuye la disponibilidad de óxido nítrico en los vasos sanguíneos, lo cual conlleva a disfunción endotelial. El resveratrol impide el estrés oxidativo inhibiendo la formación de especies reactivas de oxígeno y promoviendo la sintasa de óxido nítrico ³¹.

Se han reportado cambios en los perfiles de lípidos, mediante estudios realizados en roedores. Se mejora el perfil del colesterol total, no así los demás parámetros ³².

Se ha demostrado la capacidad del resveratrol de disminuir los depósitos de grasa mesentéricos y subcutáneos, siendo para esto 30mg/kg/día la dosis más eficiente ³³. En una revisión sistemática de 13 estudios sobre efecto sobre lípidos del resveratrol, en 5 de ellos no hubo cambios significativos en el perfil lipídico, en los demás si hubo disminuciones en el colesterol total y triglicéridos. Sólo en 4 se redujeron los niveles de LDL ²⁹. Existe evidencia in vitro sobre la capacidad del resveratrol de inhibir la peroxidación lipídica de LDL, evitando así su citotoxicidad^{34, 35}.

El resveratrol in vitro interactúa con múltiples dianas moleculares y tiene efectos positivos en células tumorales de mama, estómago, esófago, colon, próstata y cáncer; aún sin extrapolar estos hallazgos a los humanos ³⁴. Entre sus efectos quimiopreventivos se encuentran: inducir apoptosis en células malignas, secuestrar las células en una o más fases del ciclo celular, inhibir síntesis de ADN, además bloquear la actividad de la hidroximetilglutaril-CoA sintetasa (HMG-CoA) y la ciclooxigenasa (COX), la cual es responsable de la bioactivación de mutágenos ^{36, 37, 38, 39}, siendo estos efectos quimioprotectores no específicos al resveratrol, sino también a otros fitoestrógenos (quercetina, apigenina, curcumina y genisteína) ⁴⁰.

Otros efectos postulados para resveratrol incluyen neuroprotección en Alzheimer ^{41, 42}, actividad contra el virus de la gripe ⁴³ y efecto sobre la longevidad al interactuar con las sirtuinas (regulador silencioso de la información) ^{20, 44}.

Al ser un producto de libre venta actualmente el resveratrol se está consumiendo sin que haya aún suficiente evidencia científica para respaldar sus posibles efectos benéficos en el humano, más allá de lo que se pueda obtener en la dieta ⁴⁵.

Dados los reportes de los efectos benéficos del resveratrol sobre el estrés oxidativo, la agregación plaquetaria y los parámetros del perfil de lípidos (colesterol, LDL), se ha propuesto que puede tener un uso potencial en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. ^{5, 20}

1.4 Efecto del resveratrol sobre enzimas metabólicas

En un estudio realizado por Chow en 2010, se demostró que la ingesta de 1g de resveratrol diario durante 1 mes produjo inducción de actividad de CYP1A2, además inhibición de CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9 ¹⁷, éstos últimos son responsables del metabolismo de la mayoría de los fármacos.

1.5 Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares, entre las que se engloban; aterosclerosis, enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares y trombosis (pulmonar, cerebral, etc..) son la principal causa de muerte en el mundo, incluso la aterosclerosis ocasiona más defunciones que el cáncer, las neumopatías y la diabetes juntos ⁴⁶.

Los principales factores de riesgo incluyen incremento de LDL, disminución de HDL, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, senectud y el antecedente familiar de crisis prematura de enfermedad coronaria (varones menores de 55 años y mujeres menores de 65 años)⁹.

La asociación de mortalidad con niveles de colesterol se conoce desde hace más de 50 años; mientras mayores los niveles de colesterol, mayor el riesgo de enfermedad coronaria. Aun así, el 33% de los episodios aparecen en individuos con niveles entre 150 y 200mg/dL. ⁴⁷ (Tabla 5). El efecto de la dieta y el ejercicio sobre estos factores es, impresionante, pues han reducido hasta un 30% las LDL. ⁴⁸

	Deseable	Riesgo moderado	Riesgo alto
Colesterol	Menor a 200	200-240	Mayor a 240
HDL	Mayor a 60	40-60	Menor a 40
LDL	Menor a 100	130-159	160-190
Triglicéridos	Menor a 150	150-199	200-500
Rel. Colesterol/HDL	Menor a 3.5	3.5 a 5.0	Mayor a 5.0

Tabla 5. Niveles normales de Lípidos ⁴⁶

1.5.1 Tratamiento de las dislipidemias

En el tratamiento actual de las dislipidemias, se enlistan los siguientes tratamientos farmacológicos:

- Estatinas
- Derivados del ácido fíbrico
- Resinas secuestradoras de ácidos biliares
- Acido Nicotínico
- Ezetimibe

De estos tratamientos, las estatinas son los fármacos más utilizados en la actualidad, debido a su potente efecto sobre los niveles de LDL y Colesterol; además de los efectos demostrados sobre la función endotelial, sobre la estabilidad de placa y el rol antiagregante plaquetario que poseen ^{9, 10}.

1.6 Inhibidores de HMG CoA reductasa

Los inhibidores de HMG CoA (HidroxiMetilGlutaril Coenzima A) reductasa, también conocidos como estatinas o estatínicos, se consideran actualmente la primera línea de tratamiento para las dislipidemias ¹⁰. Estos fármacos disminuyen los niveles de

colesterol y LDL, disminuyendo así las incidencias de enfermedades cardiacas; dosis moderadas de estatínicos que disminuyan 40% las concentraciones de LDL, disminuyen hasta un 33% de eventos cardiovasculares, los regímenes intensivos que disminuyen hasta un 50% de LDL aminoran la frecuencia de episodios cardiovasculares un 50%⁴⁹.

Existen diversos fármacos estatínicos en el mercado actualmente (Figura 2), su mecanismo de acción permite incrementar el catabolismo e inhibir la síntesis de LDL, no es de sorprender que su principal efecto sobre los perfiles de lípidos sea la disminución de Colesterol total y de LDL. Todas las estatinas son de vidas medias cortas (menor a 3 horas), excepto atorvastatina, rosuvastatina y pitavastatina (mayores a 10 horas)⁹. De estas, la atorvastatina es la más potente para disminuir niveles de LDL y Colesterol de acuerdo al estudio CURVES⁵⁰.

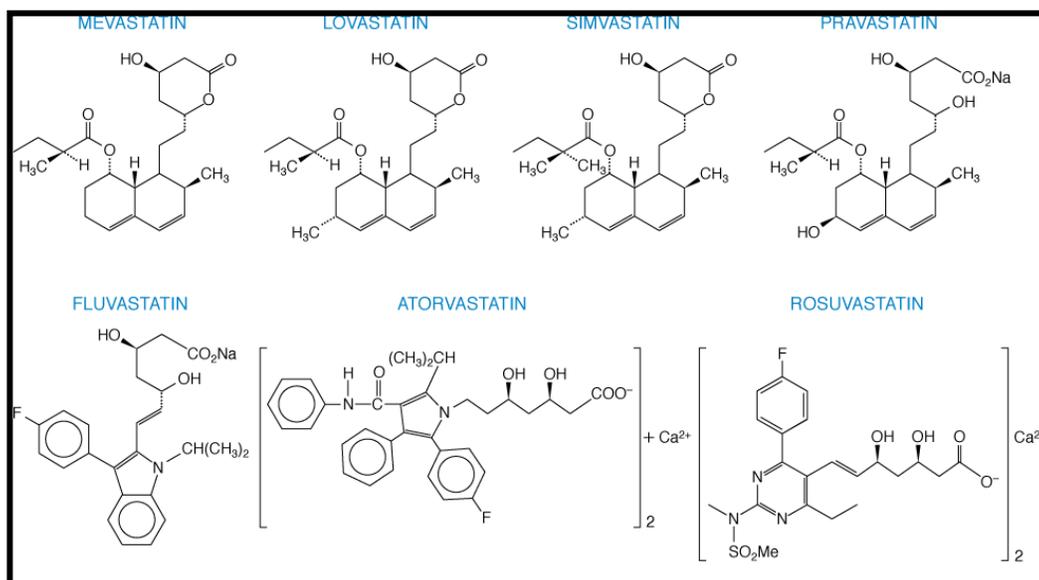


Fig. 2. Fórmulas estructurales de estatinas disponibles en el mercado actualmente⁹

1.6.1 Metabolismo de las estatinas

Las estatinas se metabolizan por medio de enzimas hepáticas del citocromo P450 (Tabla 6). Esto tiene amplia relevancia por potenciales interacciones con fármacos o sustancias que inhiban o induzcan dichos citocromos, pues está demostrado que la tasa de efectos adversos de las estatinas se incrementa con el uso concomitante de inhibidores de las enzimas metabólicas ⁵¹.

Los efectos adversos más serios de las estatinas son hepatotoxicidad, miopatía, rabdomiólisis⁹. Estos efectos adversos son raros cuando se administran como monoterapia, pero se incrementa su incidencia al combinarlos con con inhibidores metabólicos. Del grupo de las estatinas la simvastatina es el fármaco de con el que más se ha reportado la incidencia de rabdomiólisis cuando se administra en combinación con fármacos inhibidores de CYP3A4 ⁵¹.

	Lovastatina	Simvastatina	Pravastatina	Atorvastatina	Rosuvastatina	Pitavastatina
Isoenzima*	3A4	3A4	Ninguno	3A4	2C9/2C19	UGT1A3/ UGT2B7
Lipofilicidad	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
Unión a Proteínas	>95%	95-98%	50%	96%	88%	99%
Metabolitos activos	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No
Semivida (h)	3	2	1.8	7-14	13-20	12

Tabla 6. Farmacocinética de las estatinas. *Enzima del sistema Citocromo P450 responsable del metabolismo de cada fármaco¹⁰.

1.7 Evaluación de interacciones farmacológicas

La administración de dos fármacos o más de manera concomitante puede llevar a una alteración de la farmacocinética o farmacodinamia de uno ellos. A esta alteración se le denomina interacción medicamentosa y puede llevar a un incremento de la toxicidad del fármaco o disminución de su efectividad ¹¹.

Además de las posibles interacciones entre fármacos, la presencia cada vez mayor de múltiples suplementos alimenticios y fitoterapias en el mercado constituye un riesgo potencial para interacciones fármaco-fitoterapia ya que la combinación de medicina tradicional (herbolaria, fitoterapia) con la terapéutica farmacológica, es una situación cada vez más frecuente en nuestro país. Por lo anterior se requiere de estudios clínicos para establecer el riesgo potencial de estas interacciones.

La biodisponibilidad se define como la proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de su administración y el tiempo que requiere para hacerlo. Este proceso farmacocinético brinda información importante relacionada con la concentración plasmática máxima de un fármaco o $C_{m\acute{a}x}$, el tiempo máximo ó $T_{m\acute{a}x}$, que corresponde al tiempo en que se alcanza la $C_{m\acute{a}x}$ y el área bajo la curva (ABC) que es la representación de una biodisponibilidad en una gráfica de concentración por tiempo⁵². (Figura 3)

La evaluación de la posible interacción entre un fármaco y un producto herbolario se puede realizar mediante el diseño de estudios denominados de no interacción donde se compara la biodisponibilidad de un fármaco, obtenida inicialmente sin que se haya

ingerido el producto herbolario, y después de la administración de éste por un tiempo definido previamente, el diseño de estos estudios generalmente se realiza tomando como base la NOM 177 2013⁵³.

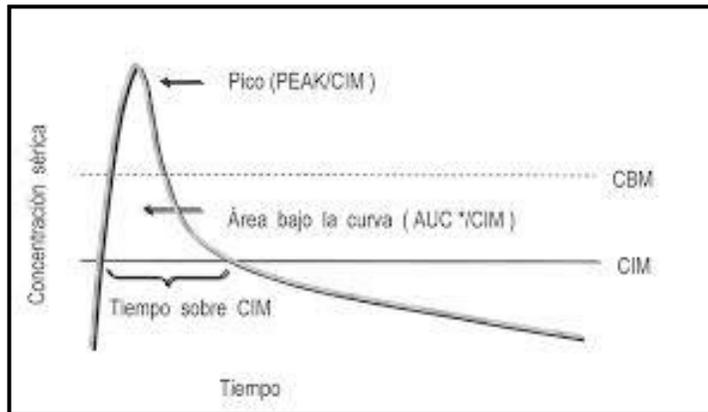


Fig. 3 Gráfica de Concentración por Tiempo

El resveratrol se encuentra disponible en el mercado y su venta no requiere prescripción médica. Debido a las propiedades cardioprotectoras que se le atribuyen y a que es de origen natural existe una alta probabilidad de que éste sea consumido de manera crónica por pacientes que también estén recibiendo fármacos como la simvastatina que es un inhibidor de HMG CoA reductasa usado en el tratamiento de las dislipidemias, por tiempo prolongado y para el cual se ha reportado hepatotoxicidad y rabdiomiólisis como efectos adversos. El resveratrol inhibe al CYP3A4, enzima responsable del metabolismo de la simvastatina por lo que la administración concomitante con éste fármaco puede producir una interacción metabólica con incremento de las concentraciones plasmáticas y mayor riesgo de toxicidad^{17, 18}.

JUSTIFICACION

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestro país y el mundo.

Se han publicado diversos artículos apoyando el uso del resveratrol en enfermedades cardiovasculares, incluyendo las dislipidemias.

Actualmente el resveratrol se encuentra disponible en el mercado sin prescripción médica y no existe un control de su consumo.

Debido a la inhibición del CYP3A4 por el resveratrol existe el riesgo de una interacción potencial con Simvastatina e incremento del riesgo de sus efectos adversos (hepatotoxicidad, rabdiomiólisis).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del resveratrol sobre el perfil farmacocinético de la simvastatina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Validar el procedimiento analítico para la cuantificación de simvastatina.
2. Administrar los tratamientos y recolectar las muestras sanguíneas
3. Cuantificar simvastatina en las muestras obtenidas
4. Determinar y comparar el perfil farmacocinético ($C_{m\acute{a}x}$, ABC) de la simvastatina administrada individualmente y en combinación con resveratrol

CAPITULO II

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Material y Equipos

2.1.1 Material

Puntillas para pipetas automáticas de 1000 μ L, Corning

Tubos de 2mL Eppendorf

Viales de vidrio ámbar de 2mL con tapas de rosca Agilent

Insertos de vidrio fondo cónico de 400 μ L, Agilent

Septas de hule/teflón, Agilent

Membranas de PVDF (Fluoruro de Polivinilideno) poro de 0.45 μ m Milipore

Columna Poroshell 120 SB C-18 3.0 x 100 mm x 2.7 μ m

Cápsulas de gel duro no. 1 Bremen

Capsule Machine “01” Capsule connection

Guantes de latex tamaño mediano y grande

Cateter intravenoso Intracath tamaño 20

Tubos para muestras sanguíneas con citrato de sodio como anticoagulante

Gradillas para los tubos colectores de muestras

Jeringas de 5mL

Torniquetes

Lentes protectores

2.1.2 Equipos

Sistema de filtración, Milipore

Vórtex IKA

Centrífuga, Beckman

Microcentrífuga, Eppendorf

Refrigerador, General Electric

Turbo Vap LV, Zymark

Ultracongelador Revco

Agitador multitubos VX-2500, VWR

Balanza analítica, Mettler Toledo AB204

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución acoplado con Espectrometría de Masas

Agilent 1100, LC/MS/MS (3Q)

Pipetas automáticas 1000 μ L, Eppendorf

2.1.3 Reactivos

Simvastatina Estándar primario USP Lote I1H070

Resveratrol cápsulas 250mg

Simvastatina (Zeid) cápsulas 20mg

Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey

Acetonitrilo grado HPLC, Tedia

MTBE (Metil Terbutil Eter) Tedia

Formato de amonio Sigma

Acido fórmico, Fermont

Metanol grado HPLC Fermont

2.2 Métodos

2.2.1 Diseño experimental

2.2.1.1 Tipo de estudio

Es un estudio de tipo prospectivo, longitudinal, simple, aleatorizado donde se compararon la C_{max}, T_{max} y ABC de simvastatina a una dosis única de 40mg administrados por vía oral contra la C_{max}, T_{max} y ABC de simvastatina a la misma dosis después de un mes de tratamiento con Resveratrol a dosis de 500mg diarios, administrados por vía oral.

Se administraron 2 tratamientos, 2 secuencias, en tres fases, bajo condiciones de ayuno, con un periodo de lavado mayor a 7 vidas medias de la simvastatina y con un número de 8 sujetos de investigación sanos de ambos géneros.

Las fases del estudio consistieron:

Fase 1. Determinación de C_{max}, T_{max} y ABC de simvastatina (Internamiento 1)

Fase 2. Administración de resveratrol durante 30 días.

Fase 3. Determinación de C_{max}, T_{max} y ABC de simvastatina después de tratamiento con resveratrol. (Internamiento 2)

2.2.1.2 Consideraciones éticas

El estudio se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la ley general de salud, la declaración de Helsinki y las buenas prácticas clínicas^{54, 55}. El protocolo fue autorizado

por el Comité de Ética en Investigación y el Comité de Investigación de la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2.1.3 Tamaño de muestra

El estudio fue realizado en 8 sujetos sanos.

2.2.1.4 Población

La selección de los sujetos de investigación se llevó a cabo de la siguiente manera: se invitó a la población en general y a estudiantes de la Universidad Autónoma de Nuevo León a participar en el protocolo clínico y los candidatos fueron inscritos en una lista con nombre y teléfonos.

A cada uno de los candidatos a participar en el estudio se les entregó por escrito la Carta de Consentimiento y se les explicó a profundidad los objetivos, diseño y métodos del estudio; los exámenes a realizar; toma de muestras, beneficios esperados y cualquier riesgo posible derivado del estudio, de tal manera que existió un entendimiento pleno sobre el estudio así como el derecho del sujeto a dejar el estudio en el momento y por las causas que determine.

Después de la información, a los sujetos que desearon continuar se les solicitó la firma de consentimiento informado, con dos testigos presentes, para la realización de su evaluación como aspirante a sujeto de investigación. Se inició entonces la evaluación clínica donde se realizó la historia clínica con interrogatorio por aparatos y sistemas, y

evaluación de signos vitales para determinar el estado de salud de cada sujeto, después si el sujeto cumplía con los criterios clínicos de inclusión se programó una segunda visita para la realización de estudios de laboratorio y gabinete. De cumplir cabalmente con los criterios de inclusión se le seleccionó para la realización del estudio.

Se determinó el estado de salud en 10 sujetos. De los sujetos anteriores se seleccionaron 8 para el estudio.

Los criterios de inclusión y exclusión para ser aceptados se basaron en el numeral 8.7 de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, el cual trata de la selección de sujetos de investigación⁵³.

2.2.1.5 Criterios de Inclusión

Los criterios de inclusión fueron los siguientes.

- Haber dado y firmado su consentimiento informado para participar en el estudio, de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas.
- Ser un hombre o mujer de 18 a 40 años de edad.
- Tener un índice de masa corporal 18 a 26.9 Kg/m².
- Ser sujetos sanos de acuerdo a la historia médica, examen físico y valores de laboratorio clínico normales
- Ser sujetos que han entendido y están dispuestos a cumplir con los procedimientos del estudio, incluyendo el seguimiento y las restricciones.

2.2.1.6 Criterios de Exclusión

Los criterios de exclusión fueron los siguientes.

- Sujetos que no cumplen con los criterios de inclusión.
- Tener una historia personal de reacciones alérgicas a medicamentos
- Tener cualquier tipo de erupción o lesión en la piel que pueda interferir con las evaluaciones del estudio
- Usar cualquier medicamento que pueda modificar la respuesta al medicamento a evaluar
- Padecer alguna enfermedad crónico-degenerativa que requiera tratamiento médico
- Tener problemas médicos no controlados que en opinión del investigador puedan reducir la seguridad de su participación en el estudio
- Tener desórdenes neurológicos o psiquiátricos que puedan interferir con el estudio
- Tener resultados de laboratorio anormales como prueba de sífilis positivo, prueba de SIDA positivo, Hepatitis B positivo o Hepatitis C positivo.
- Antecedentes de exposición crónica al alcohol u otras sustancias de abuso dentro del último año.
- Tener una historia de fumador en el último trimestre.
- Si ha participado en algún otro estudio de investigación en los 60 días previos a este estudio.

- Si ha donado o perdido 450mL o más de sangre dentro de los 60 días previos al inicio del estudio.
- Sujetos con resultados positivos a la prueba de abuso de drogas.
- Si está embarazada o lactando.

Se reclutaron 8 sujetos sanos, todos ellos firmaron el consentimiento informado y las cartas correspondientes con 2 testigos cada uno.

La verificación del estado de salud de los sujetos se determinó a partir de la historia clínica y la exploración física así como la evaluación clínica y paraclínica, que incluye los siguientes exámenes auxiliares (Tabla 7).

- Biometría hemática completa (hemoglobina, hematocrito, conteo total de leucocitos con su diferencial porcentual y conteo de plaquetas)
- Perfil bioquímico de 24 elementos
- Examen general de orina
- Pruebas para detección de VIH
- Marcadores inmunológicos para Hepatitis B y C,
- Prueba VDRL para Sífilis
- Electrocardiograma
- Antidoping en orina(Cocaína, Marihuana y Anfetaminas)
- Prueba de embarazo

Examen		Valores de referencia	
BH	Leucocitos	4.8 - 10.8	miles/mm ³
	Neutrófilos	40 - 74	%
	Linfocitos	19 - 48	%
	Monocitos	3 - 9	%
	Eosinófilos	0 - 7	%
	Basófilos	0 - 2	%
	Eritrocitos	Hombres: 4.7 - 6.1 Mujeres: 4.2 - 5.4	mil/mm ³
	Hemoglobina	Hombres: 14.0 - 18.0 Mujeres: 12.0 - 16	g/dL
	Hematocrito	Hombres: 42.0 - 52.0 Mujeres: 37.0 - 47.0	%
	VCM	Hombres: 80 - 94 Mujeres: 81 - 99	fL
BH	HCM	27 - 31	pg
	CMHC	33 - 37	%
	ADE	11.5 - 14.5	%
	Plaquetas	135,000 - 359,000	por mL
	VPM	7.2 - 11.1	fL
	PFH	Colesterol	130 - 200
Proteínas totales		6.0 - 8.1	g/dL
Albúmina		3.0 - 5.2	g/dL
Globulina		1.5 - 3.3	g/dL
Bilirrubina Total		0.1 - 1.4	mg/dL
Bilirrubina directa		0.1 - 0.5	mg/dL
Bilirrubina indirecta		0.0 - 0.9	mg/dL
Fosfatasa alcalina		Hombres: 26 - 140 Mujeres: 18- 148	UI/L
DHL		125 - 220	UI/L
TGO		Hombres: 13 - 38 Mujeres: 11 - 35	UI/L
TGP		Hombres: 6 - 58 Mujeres : 2 - 47	UI/L
GGT	Hombres: 12 - 64 Mujeres: 9 - 36	UI/L	
QS	Glucosa	60 - 100	mg/dL
	Nitrógeno uréico	Hombres : 8.9 - 20.6 Mujeres: 7.0 - 18.7	mg/dL
	Urea	Hombres: 19.0 - 44.0 Mujeres: 14.9 - 40.0	mg/dL
	Creatinina	0.4	1.25

	Ácido úrico	Hombres: 3.5 - 7.2 Mujeres: 2.6 - 6.0	mg/dL
	Colesterol	130 - 200	mg/dL
	Triglicéridos	19 - 150	mg/dL
Serología	Hepatitis B	Negativo	
	Hepatitis C	Negativo	
	VDRL	Negativo	
	VIH	Negativo	

Tabla 7: Valores normales de referencia de la Biometría Hemática, la Química Sanguínea, las Pruebas de Función Hepática y la Serología.

EGO	pH	5.5 - 6.5
	Densidad	1.005 - 1.020
	Proteínas	Negativo
	Glucosa	Negativo
	Cuerpos cetónicos	Negativo
	Bilirrubinas	Negativo
	Hemoglobina	Negativo
	Urobilinógeno	Negativo U/dL
	Nitritos	Negativo
	Células epiteliales	Escasas
	Leucocitos	0 - 5 por campo
	Eritrocitos	0 - 3 por campo
	Cilindros	Negativo
	Cristales	Escasos
Bacterias	Negativo	

Tabla 8. Valores de referencia del Examen General de Orina.

2.2.2 Medicamentos del estudio

2.2.2.1 Simvastatina

Fabricante: Laboratorios Senosiain, S.A. de C.V.

Denominación Común Internacional (DCI): Simvastatina

Denominación Distintiva, Nombre comercial: Zeid® cápsulas 20 mg.

Forma farmacéutica: cápsulas

Fórmula: Cada cápsula contiene el equivalente a 20 mg de Simvastatina

Dosis: única de 40 mg (2 cápsulas de 20mg) en 2 fases diferentes

Fecha de caducidad: Diciembre 2015

2.2.2.2 Resveratrol

Fabricante: Laboratorios Senosiain, S.A. de C.V.

Denominación Común Internacional (DCI): Resveratrol

Forma farmacéutica: cápsulas

Fórmula: Cada cápsula contiene el equivalente a 250 mg de Resveratrol

Dosis: Dos cápsulas de 250mg diaria durante 30 días

Lote: 5000232

Fecha de caducidad: 30 de Junio de 2015

2.2.3 Preparación de las cápsulas de resveratrol

El resveratrol fue proporcionado por laboratorios Senosiain S.A. de C.V. Las cápsulas conteniendo el resveratrol se prepararon bajo luz infrarroja (para evitar la isomerización del resveratrol). Se verificó el peso del resveratrol usando una balanza analítica calibrada de manera que cada cápsula contenía 250mg. Se usaron cápsulas de gel duro No. 1 y el resveratrol se encapsuló usando “The Capsule Machine” #1 de Capsule Connection, LLC. La uniformidad de contenido fue verificada bajo la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2009⁵⁷.

2.2.4 Administración de los medicamentos

Se administró una dosis única de simvastatina 40 mg contenidos en dos cápsulas, por vía oral. El medicamento se administró con 250 mL de agua, en condiciones de ayuno (10h).

La administración se realizó de igual forma en los dos períodos del estudio y medió entre ellos 30 días correspondientes a la administración de resveratrol.

2.2.5 Fases del estudio

2.2.5.1 Primera fase

Por lo menos 72 horas antes de la fecha fijada para el inicio del estudio, los sujetos de investigación firmaron el formato Instructivo para preparación de los sujetos de investigación, donde se establece el lugar, día, fecha y hora del inicio del estudio, así como las siguientes indicaciones previas al estudio: no fumar (ni de manera pasiva), no consumir bebidas alcohólicas, no consumir bebidas con xantinas (refrescos de cola, café, té, chocolate), no consumir jugo natural de toronja, evitar ejercicios intensos, no consumir alimentos preparados al carbón, no ingerir ningún otro medicamento.

El día del ingreso a cada fase del estudio cada sujeto fue recibido por el médico y personal de enfermería en la Unidad Clínica y se les interrogó sobre el cumplimiento de las indicaciones recibidas, registrándose la información en un Formato de Verificación de Preparación del Sujeto de Investigación para el estudio

Posteriormente se obtuvieron muestras de orina de cada sujeto y se realizaron exámenes antidoping y prueba de embarazo (si aplica). De haberse cumplido con las indicaciones y con resultados negativos de las pruebas, se continuó con el internamiento.

Los sujetos se levantaron a las 5:00 horas, para iniciar el primer período del estudio.

En la Unidad Clínica, a los sujetos se les colocó en una vena de la flexura del codo, un catéter venoso periférico y se tomó una muestra de 4.5mL de sangre venosa (tiempo 00).

Después de haber obtenido la muestra del tiempo 00, se administró por vía oral la simvastatina, contenida en una cápsula 40mg, con 250mL de agua en condiciones de ayuno (10 h).

Posteriormente se tomaron 16 muestras de sangre de 4.5mL durante un lapso de 24 horas, al finalizar el periodo de muestreo los sujetos fueron evaluados clínicamente y citados para iniciar la segunda fase.

El horario de ingesta de alimentos (desayuno, comida y cena) que recibieron los sujetos de investigación durante el estudio se muestra en la Tabla 9.

	Cena (PM)	Desayuno (AM)	Comida (PM)	Cena (PM)	Desayuno (AM)
Toma de alimentos	Día - 1 Internamiento 19:00 a 20:00 h	Día 1 10:00 a 11:00 h	Día 1 14:00 a 15:00 h	Día 1 19:00 a 20:00 h	Día 1 07:00 a 08:00 h
	1	2	3	4	5

Tabla 9. Horario de ingesta de alimentos por los sujetos de investigación durante el estudio.

2.2.5.2 Segunda fase

Denominada fase de administración de resveratrol, consistió en la toma diaria de 500mg de resveratrol (2 cápsulas de 250mg) en ayuno por vía oral durante 30 días consecutivos.

La administración fue con 250mL de aguay se realizó diariamente en presencia del investigador.

Durante el transcurso de la fase de administración de resveratrol se evaluó clínicamente a los sujetos para detectar la presencia de posibles efectos adversos.

2.2.5.3 Tercera fase

Al final de la segunda fase (de administración de resveratrol) los sujetos fueron internados para realizar la tercera fase (administración de simvastatina y muestreo) la cual se realizó de forma idéntica a la primera fase.

Después de la toma de las 24 horas posteriores a la administración de la simvastatina, a los sujetos se les proporcionó el desayuno, se les realizó una evaluación clínica y se dieron de alta.

2.2.5.4 Frecuencia de toma de signos vitales

El monitoreo clínico de los sujetos fue constante durante el estudio. Se tomaron los signos vitales al ingreso (el día de internamiento), al inicio del muestreo (antes de la administración de simvastatina), a la mitad del estudio (después de la hora de la comida) por la noche antes de dormir y al día siguiente, antes de su egreso. La tabla 10 muestra los valores normales de los signos vitales.

	Valores normales
Frecuencia cardiaca	60 a 100 latidos por minuto
Frecuencia respiratoria	12 a 20 respiraciones por minuto
Temperatura	35.5 a 37.5 ° C
Presión arterial sistólica	90 a 130 mmHg
Presión arterial diastólica	60 a 80 mmHg

Tabla 10. Valores normales de los signos vitales

2.2.5.5 Revisión de efectos adversos.

Todos los sujetos fueron entrevistados a diario durante la fase de administración de resveratrol y posteriormente una semana después de la última fase. En esas entrevistas se les interrogó sobre la aparición de cualquier efecto adverso. La información recabada se registró en sus respectivos expedientes.

2.2.6 Muestras recolectadas

Muestras biológicas recolectadas: se obtuvieron 4.5mL de sangre total en cada muestra, en tubos vacutainer con citrato de sodio como anticoagulante.

Tiempos de muestreo: Se tomaron 17 muestras a cada sujeto de investigación en los siguientes tiempos: 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 y 24.0 horas, en cada uno de los 2 períodos. (Tabla 11)⁵⁶

Num. de muestra	Tiempo de muestreo
1	0.00
---	Administración de simvastatina
	40mg
2	0.25
3	0.50
4	1.00
5	1.50
6	2.00
7	2.50
8	3.00
9	3.50
10	4.00
11	4.50
12	5.00
13	6.00
14	8.00
15	10.00
16	12.00
17	24.00

Tabla 11. Tiempo de muestreo para la fase 1

2.2.6.1 Almacenamiento de las muestras obtenidas.

Una vez obtenidas las muestras se almacenaron a una temperatura menor a -40°C en un ultracongelador, durante un periodo no mayor al tiempo de estabilidad criogénica definido durante la validación del método analítico, con el fin de preservar inalterado el compuesto a analizar durante el almacenamiento previo al período de análisis. La temperatura fue monitoreada a diario durante todo el periodo de almacenamiento de muestras.

2.2.7 Procedimiento para la determinación de simvastatina

La determinación de la concentración simvastatina en plasma se realizó para la obtención de los parámetros farmacocinéticos: C_{max} , T_{max} y ABC y antes y después de la administración de resveratrol durante 30 días.

2.2.7.1 Método analítico.

El método analítico para la cuantificación plasmática de simvastatina se basó en lo publicado por Zhang y cols, así como por Apostolou y cols con modificaciones realizadas en el Departamento de Farmacología y Toxicología^{58, 59}.

2.2.7.2 Determinación de concentraciones plasmáticas de simvastatina

A las muestras se le realizó una extracción líquido-líquido con Metiliterbutileter (MTBE) a pH de 4.5 (el pH de 4.5 evita la interconversión entre simvastatina y ácido simvastatínico), posteriormente la muestra fue inyectada en un sistema cromatográfico de líquidos de alta resolución con detección de Masas en Tandem (LC-MS-MS), usando el método previamente validado.

2.2.7.3 Técnica analítica de medición.

En la tablas 12, 13 y 14 se muestran las condiciones instrumentales de trabajo establecidas.

Columna	Poroshell 120 SB C-18 3.0 x 100 mm x 2.7 μ m
Temperatura de la columna	25°C
Temperatura del automuestreador	10°C
Volumen de inyección	15 μ L
Fase móvil	acetonitrilo / formato de amonio 0.01 M pH 4.5 (85/15 % Vol)
Flujo	0.65 mL/minuto
Duración	2.7 minutos

Tabla 12. Condiciones del Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución con Detección de Masas en Tandem (LC-MS-MS)

Compuesto	Simvastatina
Ion Precursor	419.3
Ion Producto	199.2
Dwell	200
Energía del Fragmentador	100V
Energía de Colisión	5V
Polaridad	Positiva

Tabla 13. Condiciones del Espectrómetro de Masas

Modo de ionización	ESI
Temperatura del gas secante	300°C
Flujo del gas secante	13 L/minuto
Presión del nebulizador	50 psi
Voltaje del capilar	4000 V positivo, 4000 V negativo

Tabla 14. Condiciones de la Fuente de Ionización

2.2.7.4 Preparación de soluciones

Fase móvil. La composición de Fase Móvil [Acetonitrilo 85%:15% Formato de amonio 0.01M pH4.5] utilizada durante el análisis cromatográfico se prepara automáticamente por el HPLC, a partir de sus componentes individuales.

Preparación de Formato de amonio 0.1 M pH 4.5

Se pesaron 0.63g de Formato de Amonio, se mezclaron con 200 mL de agua bidestilada y se aforaron a 1 litro con agua bidestilada y se ajustó a pH 4.5 con ácido fórmico; se

filtró a través de una membrana de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro, la solución se transfirió a un frasco y éste se colocó en la charola para solventes del HPLC.

Preparación de Formato de amonio 0.01 M pH 4.5

Se pesaron 0.063g de Formato de Amonio, se mezclaron con 200 mL de agua bidestilada y se aforaron a 1 litro con agua bidestilada y se ajustó a pH 4.5 con ácido fórmico; se filtró a través de una membrana de PVDF de 0.45 μm de tamaño de poro, la solución se transfirió a un frasco y éste se colocó en la charola para solventes del HPLC.

Preparación de acetonitrilo.

Se transfirió el acetonitrilo a un frasco y éste se colocó en la charola para solventes del HPLC.

Soluciones en pool de plasma.

Se utilizó la solución de pool de plasma humano (SPP) como diluyente. La SPP se obtuvo al mezclar 6 bolsas de plasma procedentes del Banco de Sangre del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, a solicitud del Departamento de Farmacología y Toxicología. Las bolsas se mantuvieron en congelación a una temperatura menor a -40°C en el ultracongelador hasta su uso.

2.2.7.5 Procesamiento de muestras

Las muestras para la determinación de simvastatina y para la validación del método analítico se trabajaron en alícuotas de 300 μL . Se siguió el siguiente proceso para cada una de ellas.

1. Descongelar alícuotas de 300 μ L de plasma contenidos en un tubo de extracción.
2. Adicionar 100 μ L de buffer formato de amonio 0.1M pH 4.5 M
3. Agitar en vortex durante 10 segundos y posteriormente agitar en vortex multitubo durante 1 minuto.
4. Adicionar 4 mL de MTBE
5. Agitar en vortex (10s) y al terminar, agitarlos 5 minutos en el multitubo
6. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos
7. Proteger de la luz y colocar en congelador a una temperatura inferior a -20°C por 30 minutos.
8. Colocar en gradilla refrigerada y decantar la fase orgánica al tubo de evaporación de vidrio de 13 x 100 mm y evaporar a sequedad a 40°C bajo corriente de nitrógeno.
9. Recuperar el residuo en 300 μ L de Metanol
10. Tapar el tubo y agitar 5 s en el vórtex, para posteriormente agitar en vórtex multitubo durante 1 minuto
11. Transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL
12. Centrifugar en microcentrífuga a 12,500 rpm por 4 minutos
13. Transferir el sobrenadante a un microvial ambar con inserto de fondo plano, para su posterior análisis.

2.2.7.6 Validación del método analítico

Las características de desempeño que se validaron son las siguientes:

- Selectividad

- Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.
- Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.
- Límite inferior de cuantificación.
- Curva de calibración
- Precisión y exactitud a condiciones de repetibilidad
- Precisión y exactitud a condiciones de reproducibilidad
- Estabilidad de la muestra a corto plazo
- Estabilidad de la muestra a largo plazo
- Estabilidad de la muestra procesada
- Estabilidad del analito en solución
- Estabilidad de la muestra en el automuestreador
- Estabilidad de la muestra en función de los ciclos de congelación y descongelación

2.2.7.6.1 Selectividad.

La no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, se demostró mediante la evaluación individual de seis diferentes unidades de plasma humano, identificadas como SSPN (Plasma normal) y su número de bolsa, en conjunto con una de plasma lipémico (SSPL) y una unidad de plasma hemolizado (SSPH).

Adicionalmente se evaluaron otras siete muestras de plasma humano adicionado cada una con un fármaco a un nivel de concentración similar al límite superior de cuantificación (Aspirina, Diclofenaco, Paracetamol, Naproxeno, Ibuprofeno, Loratadina y Cafeína), identificadas como SSF y la primera letra del nombre del fármaco. Así como, otras dos muestras de plasma humano recolectadas en diferentes anticoagulantes, una de ellas recolectada en Citrato de Sodio (SSA Citrato), y la otra en Heparina Sódica (SSA Heparina). Las muestras fueron identificadas como SSA y la primera letra del nombre del Anticoagulante.

El criterio de aceptación fue que la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% del límite inferior de cuantificación de simvastatina.

2.2.7.6.2 Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas.

Para determinar el efecto de matriz se evaluaron un número de muestras, de seis diferentes unidades de plasma humano, en función del volumen de extracto final, las cuales fueron identificadas como SPNa, en conjunto con una muestra de plasma lipémico (SPLa), y una muestra de plasma hemolizado (SPHa) son procesadas.

Los extractos obtenidos de cada una de las seis diferentes unidades de plasma humano, los de plasma lipémico y los de plasma hemolizado, fueron depositados en 8 tubos de ensayo de recolección, respectivamente.

Se adicionaron el o los analito(s) a cada grupo de extractos (SPNa, SPLa, y SPHa), a dos niveles de concentración, se identificaron como: SPNa₁ SPNa₃, SPLa₁, SPLa₃, SPHa₁, SPHa₃, siendo el “₃” una concentración alta y “₁” una concentración baja y los entrega al área de análisis instrumental en conjunto con las soluciones SEML₃ y SEML₁, la cual los analiza en acuerdo a las condiciones instrumentales ya descritas.

Se obtuvo un FMN (Factor de Matriz Normalizado), conforme a la siguiente fórmula:

$$FMN^* = \frac{[\text{Respuesta del analito en la matriz}]}{[\text{Respuesta del analito en solución}]}$$

El criterio de aceptación del FMN fue una desviación estándar relativa menor al 15%.

Esta determinación se realizó a 2 niveles de concentración, equivalentes a las SCC₃ (Solución de Control de Calidad) de concentración alta (conc. entre 0.75 a 0.85 del valor de la SC_{max}) y de la SCC₁ de concentración baja (conc. < 3 veces del valor de la SC_{min}).

2.2.7.6.3 Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.

Se realizaron un mínimo de 3 inyecciones de blanco de pool de plasma (BIP) siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación (LSC). Los resultados fueron comparados respecto a la respuesta del límite inferior de cuantificación (LIC).

El criterio de aceptación fue que la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debía ser menor al 20% del límite inferior de cuantificación del analito.

2.2.7.6.4 Límite inferior de cuantificación.

El límite inferior de cuantificación (LIC) se analizó bajo condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad, evaluando en cada caso su precisión y exactitud.

Repetibilidad: se procesaron en un mismo día por quintuplicado, muestras identificadas como LIC a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales estipuladas en el procesamiento de muestras, calculando la concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

Reproducibilidad: se procesaron en tres diferentes días diferentes por quintuplicado, muestras identificadas como LIC a las condiciones estipuladas en el procesamiento de muestras y se analizaron en acuerdo a las condiciones instrumentales ya estipuladas, calculando la concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

El criterio de aceptación:

Precisión. El CV% del valor promedio menor al 20%.

Exactitud. El valor promedio del porcentaje de desviación menor o igual al 20% resultante de emplear la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{(\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida})}{\text{Concentración adicionada}}$$

2.2.7.6.5 Curva de Calibración.

Se analizaron 4 curvas de calibración constituidas cada una con un mínimo de seis niveles de concentración y el blanco pool. Se procesaron en un mismo día a las condiciones ya estipuladas y se analizan en acuerdo a las condiciones instrumentales ya estipuladas. Se estableció un modelo matemático que describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo y se determinan las concentraciones para cada nivel de cada curva de calibración a partir de los valores obtenidos.

El criterio de aceptación:

Concentración recuperada: Datos de concentración recuperada de la curva de calibración dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que el 20%.

Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

Concentración nominal: Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.

2.2.7.6.6 Precisión y Exactitud a condiciones de repetibilidad.

Se procesaron en un mismo día por quintuplicado, 4 tipos de muestras identificadas como SCC₁ (Muestra Control Baja), SCC₂ (Muestra Control Media), SCC₃ (Muestra Control Alta) y SCD₁ (Muestra Control de Dilución) a las condiciones estipuladas y se analizan en acuerdo a las condiciones instrumentales ya estipuladas, calculando la concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable. Previo a su procesamiento la SCD₁ se diluye 1:1 con la misma matriz biológica exenta del fármaco (SPP).

Criterio de aceptación:

Precisión. El CV% del valor promedio debe ser menor al 15%.

Exactitud. El valor promedio del porcentaje de desviación debe ser menor o igual al 15% resultante de emplear la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{(\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida})}{\text{Concentración adicionada}}$$

2.2.7.6.7 Precisión y Exactitud a condiciones de reproducibilidad.

Se procesaron en tres diferentes días por quintuplicado, 3 tipos de muestras identificadas como SCC₁ (Muestra Control Baja), SCC₂ (Muestra Control Media) y SCC₃ (Muestra Control Alta) a las condiciones ya establecidas y se analizaron de acuerdo a las condiciones instrumentales ya estipuladas, calculando la concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

El criterio de aceptación:

Precisión. El CV% del valor promedio menor al 15%.

Exactitud. El valor promedio del porcentaje de desviación menor o igual al 15% resultante de emplear la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = 100 \times \frac{(\text{Concentración adicionada} - \text{Concentración obtenida})}{\text{Concentración adicionada}}$$

2.2.7.6.8 Estabilidad de la muestra.

La estabilidad del analito en la muestra biológica se evaluó analizando por triplicado muestras control a concentración SCC₁ y SCC₃ tanto después de su preparación, como después de su sometimiento a las condiciones del ensayo a evaluar, siendo estas: estabilidad a corto y largo plazo, estabilidad en el automuestreador, estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación y estabilidad de la muestra procesada. En todos los casos las muestras se procesaron a las condiciones estipuladas y

se analizan en acuerdo a las condiciones instrumentales ya establecidas, calculando la concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración aplicable.

El criterio de aceptación:

La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

Condiciones a Evaluar:

Estabilidad a corto plazo. Se evaluó la estabilidad de la muestra sin procesar mantenida a temperatura ambiente sin procesarla inmediatamente después de su descongelación.

Se descongelaron por triplicado muestras SCC₁ y SCC₃, las cuales se mantuvieron sin procesar, por el tiempo equivalente al consumido al aplicar el procedimiento descrito previamente. Transcurrido el tiempo correspondiente, se procesaron las muestras, identificadas como CPp (Soluciones problema) junto con muestras recién descongeladas identificadas como CPr (Soluciones de referencia), y se analizaron.

2.2.7.6.8.1 Estabilidad a largo plazo.

Se evaluó la estabilidad de la muestra sin procesar, mantenida a temperatura menor a – 40 °C durante el tiempo equivalente al almacenamiento de las muestras del estudio desde su obtención hasta su análisis.

Se almacenaron un mínimo de 9 réplicas de SCC₁ y SCC₃, 18 en total, y se analizaron 3 réplicas de cada una de las concentraciones a diferentes tiempos de almacenaje acotados por un tiempo inicial de 0 días (muestras almacenadas por un tiempo no menor de 12 horas) y el tiempo total equivalente al almacenamiento de las muestras del estudio desde su obtención hasta su análisis. Identificados adicionalmente con LP₀ la de referencia y LP_x (x:# días).

2.2.7.6.8.2 Estabilidad de la muestra procesada.

Se evaluó la estabilidad de la muestra procesada mantenida tanto a temperatura ambiente como en refrigeración sin analizarla la misma fecha de su procesamiento.

Se procesaron 9 réplicas de SCC₁ y SCC₃; 3 muestras de cada concentración que se almacenaron a temperatura ambiente y las 6 restantes de cada concentración se almacenaron a una temperatura inferior a 5°C.

Transcurridos 24 horas, las muestras mantenidas a temperatura ambiente y 3 réplicas de las almacenadas a 5°C se analizaron bajo las condiciones instrumentales ya descritas en conjunto con muestras recién procesadas en acuerdo a lo ya establecido. Posteriormente transcurridas 168 horas, las tres réplicas restantes mantenidas a 5°C se analizaron bajo las condiciones instrumentales ya descritas en conjunto con muestras recién procesadas. Identificados adicionalmente con MP₀ la de referencia y MPA₂₄, MPR₂₄ o MPR₁₆₈.

2.2.7.6.8.3 Estabilidad en el automuestreador.

Se evaluó la estabilidad de la muestra procesada mantenida a condiciones de temperatura del automuestreador por un periodo de 16 horas.

Se procesaron por triplicado (sextuplicado, en caso que aplique) muestras SCC₁ y SCC₃ y se trasvasan los extractos a tres viales para su análisis inmediato, cada ocho horas.

2.2.7.6.8.4 Estabilidad en función de los ciclos de congelación y descongelación.

Se evaluó la estabilidad de la muestra sin procesar sometida a ciclos de congelación y descongelación.

En el primer día, se descongelan tres réplicas SCC₁ y SCC₃ que han estado congeladas por al menos 24 horas y se vuelven a congelar y se identifica cada lote como SCC₁III y SCC₃III; en el segundo día, se vuelven a descongelar las tres réplicas del primer día (SCC₁III y SCC₃III) y se descongelan otras tres réplicas identificando este lote como SCC₁II y SCC₃II; en el último día, se descongelan las tres réplicas del primer día (SCC₁III y SCC₃III), las tres réplicas del segundo día (SCC₁II y SCC₃II), y tres nuevas réplicas (SCC₁I y SCC₃I).

En el último día, las muestras de los tres diferentes ciclos de congelación fueron analizadas en conjunto. El porcentaje de error de la concentración obtenida comparado con la concentración nominal debe ser menor al 15%.

2.2.7.6.8.5 Estabilidad del Analito en Solución

Se evaluó la estabilidad del analito en solución mantenida a temperatura descrita en el procesamiento de muestras sin utilizarla en la misma fecha de su preparación.

Se almacenaron un mínimo de 9 réplicas de SEA_{LSC} y SEA_{LIC} (Solución de Estabilidad de Analito), y se analizaron 3 réplicas de cada una, a diferentes tiempos de almacenaje acotados por un tiempo inicial de 0 días (muestras almacenadas por un tiempo no menor de 12 horas) y el tiempo total equivalente al almacenamiento de las muestras del estudio desde su obtención hasta su análisis, en conjunto con el mismo número de réplicas SEA_{LSC} y SEA_{LIC} preparadas a partir de solución madre nueva en la misma fecha de análisis

El criterio de aceptación:

El valor promedio de la respuesta analítica de la solución de estudio en el tiempo de prueba, debe de estar dentro del 10% absoluto de la respuesta analítica promedio de la solución recién preparada.

2.2.7.7 Análisis de muestras biológicas

Las muestras de los sujetos de investigación se analizaron en orden ascendente según la secuencia numérica asignada, con un máximo de 3 sujetos por día. Previamente se aplicó un control de calidad al equipo donde se llevó a cabo el análisis, a fin de asegurar su correcto funcionamiento.

El análisis de muestras de cada día incluyó la evaluación de una curva de calibración, un blanco de pool de plasma, viales con solvente para realizar pruebas de arrastre, así como soluciones de control de calidad que se intercalaron entre las muestras de un sujeto de investigación y otro.

2.2.7.8 Control de calidad de la corrida analítica

Verificación del detector de masas. La verificación de la calibración (Check tune) del detector de espectrometría de masas se realizó con la finalidad de comprobar el cumplimiento de los criterios de aceptación en relación a la señal obtenida de las masas de la solución calibrante ESI (modo Positivo), y se ponderó el monitoreo de los iones más cercanos (118.09 y 322.05) a los iones de trabajo (419.3 \rightarrow 199.2 m/z). La verificación se realizó automáticamente a través del Software del Sistema LC-MS-MS cuando aplique, además en cada arranque de equipo es indispensable su verificación. El reporte de la verificación se resguardó en el sistema operativo de la MassHunter y se imprimió uno representativo de validación. Se verificó y se documentó el cumplimiento de los criterios de aceptación

Verificación de la adecuabilidad del sistema analítico de medición. Se realizó diariamente con la finalidad de verificar el buen funcionamiento del Sistema Analítico de Medición antes del análisis de las muestras de cada día de trabajo, confirmando de esta manera que los componentes del sistema analítico trabajan correctamente (desempeño de la columna, volumen de entrega de las bombas cromatográficas y precisión del inyector). De esta manera se respaldó la cuantificación confiable del(los)analito(s) en las muestras.

La verificación se realizó inyectando por quintuplicado la Solución de Verificación (SV) (Simvastatina: 4.49 ng/mL) a las condiciones instrumentales ya especificadas. Para la evaluación se utilizaron los resultados de las últimas 3 inyecciones, y se determinó la precisión en cada caso. Se verificó y documentó el cumplimiento del criterio de aceptación.

Se evaluó el Inyector a través del área del pico, la Columna a través del ancho de pico a la mitad de la altura y la Bomba a través del tiempo de retención.

Verificación de no interferencias. La verificación de no interferencias incluyó la limpieza del proceso analítico, mediante el análisis de pool de plasma (pool blanco), la limpieza del sistema analítico de medición mediante la inyección del solvente final usado durante el procesamiento de la muestra (prueba de arrastre), así como la no interferencia de la matriz de la muestra biológica de cada sujeto de investigación (predosis). Durante esta verificación se comprobó la ausencia de contaminantes y/o interferencias que alteren los resultados analíticos.

Verificación de la curva de calibración. El principal objetivo metrológico del uso de una Curva de Calibración y más específicamente de la ecuación que la define, es la obtención de resultados de medición con una exactitud (% de Error o % de Desviación) dentro de especificaciones previamente establecidas y consistentes durante el desarrollo y aplicación de una metodología analítica.

Esta verificación se realizó diariamente previo al análisis de las muestras de los sujetos de investigación. Una muestra de cada nivel de concentración se sometió al procesamiento de muestras y a las condiciones instrumentales establecidas.

Verificación de la exactitud y precisión del método (Muestras control). Las soluciones de control de calidad o muestras control, identificadas como SCC se usaron como parte de los criterios de aceptación de los resultados de una corrida analítica. Específicamente, el resultado de su análisis respalda los resultados del análisis de las muestras de uno o más sujetos de investigación intercalados entre ellas. Esta verificación se realizó a diario durante la corrida analítica.

2.2.7.9 Criterios de reanálisis de muestras biológicas

Los criterios de reanálisis de muestras de sujetos de investigación fueron:

- Obtener una concentración cuantificada mayor al límite superior de la curva de calibración.
- Rechazo de una corrida analítica por no cumplir con los criterios de calidad excluyentes establecidos para la misma.
- Cuando el reanálisis de cierto número de muestras se considere como parte del control del método analítico de medición.
- Muestras pre dosis con respuesta superior al Límite inferior de Cuantificación.
- Falla del equipo como inyección inadecuada o pobre señal cromatografía.

- Concentración por arriba del Límite Inferior o Superior de Cuantificación en corridas analíticas donde fue necesario eliminar los estándares originales de la curva de calibración

2.2.8 Análisis farmacocinético y estadístico

El análisis farmacocinético y estadístico para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se desarrolló haciendo uso del paquete computacional WinNonlin versión 6.3 y SPSS versión 13.

Procedimiento de captura de datos para el programa Winnonlin®.

Se reordenaron los datos obtenidos de las concentraciones de simvastatina. Por medio del programa Winnonlin® se obtuvieron los valores de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos evaluados fueron los siguientes:

C_{máx}: La concentración sérica máxima que se obtuvo de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

T_{máx}: El tiempo transcurrido en que se produce la concentración sérica máxima se obtuvo de manera gráfica a partir del perfil de concentración sérica con respecto al tiempo.

ABC_{0-t}: El área bajo la curva de la concentración sérica desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) se calculó por el método trapezoidal.

El procedimiento para el cálculo de este parámetro se realizó con la siguiente fórmula:

$$\mathbf{ABC}_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Dónde:

n= número de tiempos de muestreo utilizados en el perfil sérico.

t_i= tiempo en que se realiza la i-ésima toma de muestra.

C_i= Concentración obtenida en el i-ésimo tiempo de muestreo.

K_e: la constante de eliminación se estimó a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración sérica con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica) multiplicado por la integral de 2 (2.303).

$$K_e = b \times \ln(2)$$

Dónde:

b= pendiente de la recta.

t_{1/2}: La vida media de eliminación se estimó mediante el cociente de integral de 2 sobre constante de eliminación.

$$t_{1/2} = \ln(2) / K_e.$$

Se compararon los parámetros farmacocinéticos C_{\max} y ABC, generando el intervalo de confianza clásico y prueba t doble unilateral de Schuirmann, para el cociente de los parámetros farmacocinéticos(log transformados)^{61, 62}.

Para cada parámetro se realizaron las siguientes pruebas:

Análisis de varianza.

En la prueba de ANADEVa las fuentes de variación (secuencia, sujetos, períodos y tratamientos) se interpretaron de la siguiente manera: Si $p \geq 0.05$, se dice que no hay diferencia significativa; si $0.01 \leq p < 0.05$, se dice que hay diferencia significativa; con valores de $p < 0.01$, se dice que hay una diferencia altamente significativa. El poder de la prueba: el valor mínimo será de $0.80(1-\beta)$ ^{61, 62}.

Intervalo de confianza.

En la prueba de intervalo clásico para datos crudos y datos transformados logarítmicamente; con valores de $80 \leq X \leq 120$ y $80 \leq X \leq 125$ respectivamente y un nivel de significancia de 0.05 para la construcción de un intervalo de confianza al 90%, el producto a probar no producirá interacción si los parámetros farmacocinéticos de la simvastatina antes y después de la administración del resveratrol se encuentran en el intervalo de confianza referido.^{61, 62}

Intervalo de Westlake.

En la prueba del intervalo de Westlake, para datos crudos y datos transformados logarítmicamente con un valor de $80 \leq X \leq 120$ y $80 \leq X \leq 125$ para la construcción de un intervalo de confianza simétrico al 90%, el producto a probar no producirá interacción si los parámetros farmacocinéticos de la simvastatina antes y después de la administración del resveratrol se encuentran en el intervalo referido⁶².

Prueba t doble unilateral de Schuirmann.

El producto a probar no producirá interacción si los parámetros farmacocinéticos de la simvastatina antes y después de la administración del resveratrol se encuentran en el intervalo $80 \leq X \leq 120$ y $80 \leq X \leq 125$ para datos transformados logarítmicamente con un alfa de 0.05 y un valor total de $p < 0.05$ ⁶¹.

CAPITULO III

3. RESULTADOS

3.1 Variables demográficas de los sujetos

Se reclutaron 8 sujetos de investigación, ambos géneros (cuatro masculinos y cuatro femeninos). El de mayor edad de 24 años y el de menor edad de 20 años (promedio 21.6 años). La estatura fluctuó entre 1.56m y 1.85m (promedio 1.65m), el peso fluctuó entre 53.3 Kg y 91.1Kg (promedio 65.15 Kg) con un índice de masa corporal entre 20.82 y 26.75 kg/m² (promedio 23.45 kg/m²). Uno de los sujetos reclutados se retiró por motivos personales por lo que el estudio se inició con 7 sujetos y todos concluyeron el estudio. (Tabla 15)

	Género	Edad (años)	Talla (m)	Peso (Kg)	IMCkg/m ²
S01	M	20	1.65	65	23.87
S02	M	24	1.74	81	26.75
S03	F	20	1.62	59.2	22.55
S04	F	20	1.62	57.8	22.02
S05	F	20	1.60	53.3	20.82
S06	M	23	1.85	91.1	26.61
S07	M	22	1.56	56	23.01
S08*	F	24	1.62	57.8	22.02

Tabla 15. Descripción de los datos demográficos de los sujetos de estudio.

* Sujeto que se retiró del estudio

3.2 Toma de signos vitales y alimentos

3.2.1 Signos vitales

Los valores de los signos vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, y temperatura) se muestran en las tablas 17 a 18 y figuras 4 a 8. No se observó alteración en los signos vitales en ninguno de los sujetos de investigación.

La frecuencia de toma de signos vitales se muestra en la tabla 16

	1	2	3	4	5
Signos vitales	Día - 1 Internamiento (al llegar) 17:00 -20:00 h	Día 1 05:00 a 06:00 h	Día 1 14:00 a 16:00 h	Día 1 20:00 a 20:30 h	Día 2 06:00 a 07:00 h

Tabla 16. Frecuencia de toma de signos vitales

SIGNOS VITALES PRE ESTUDIO PRIMER PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	110	80	68	16	36.4
S02	110	60	86	16	36.6
S03	100	60	64	12	36.8
S04	100	60	64	14	36.4
S05	100	70	60	12	36.6
S06	110	70	66	14	36.5
S07	110	60	66	14	36.6
S08	--	--	--	--	--
Promedio	105.7	65.7	67.7	14.0	36.6

Tabla 17a Signos vitales tomados pre estudio en el primer periodo

SIGNOS VITALES EN LA MAÑANA DE LA PRIMER PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	110	60	62	17	37.4
S02	110	80	72	17	36.6
S03	100	60	72	16	37.2
S04	100	60	76	17	37.1
S05	100	70	63	16	36.9
S06	110	60	63	16	36.5
S07	100	70	72	16	36.7
S08	--	--	--	--	--
Promedio	104.3	65.7	68.6	16.4	36.9

Tabla 17b Signos vitales tomados en la mañana de la primer periodo

SIGNOS VITALES EN LA TARDE DEL PRIMER PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	115	65	78	16	37.4
S02	120	75	76	17	36.9
S03	90	60	72	17	37.4
S04	90	60	81	17	37.3
S05	95	65	64	15	37.5
S06	110	60	68	17	37.1
S07	100	70	78	17	37.2
S08	--	--	--	--	--
Promedio	102.9	65.0	73.9	16.6	37.3

Tabla 17c Signos vitales tomados en la tarde del primer periodo

SIGNOS VITALES AL EGRESAR DEL PRIMER PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	110	80	62	18	36.4
S02	110	70	80	16	36.4
S03	100	60	84	17	36.3
S04	100	70	78	17	36.1
S05	100	60	62	15	36.6
S06	110	70	65	14	36.6
S07	110	70	62	13	36.3
S08	--	--	--	--	--
Promedio	105.7	68.6	70.4	15.7	36.4

Tabla 17d Signos vitales tomados al egresar del primer periodo

SIGNOS VITALES PRE ESTUDIO SEGUNDO PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	110	70	66	14	36.4
S02	110	80	73	16	36.3
S03	100	60	64	12	36.6
S04	110	70	62	14	36.5
S05	100	70	66	12	36.8
S06	110	70	68	16	36.4
S07	110	60	68	14	36.8
S08	--	--	--	--	--
Promedio	107.1	68.6	66.7	14.0	36.5

Tabla 18a Signos vitales tomados pre estudio en el segundo periodo

SIGNOS VITALES EN LA MAÑANA DEL SEGUNDO PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	100	60	66	15	36.3
S02	110	70	68	16	36.2
S03	90	66	62	12	36.4
S04	100	60	63	14	36.6
S05	100	70	62	14	36.4
S06	100	60	62	14	36.3
S07	90	60	64	15	36.1
S08	--	--	--	--	--
Promedio	98.6	63.7	63.9	14.3	36.3

Tabla 18b Signos vitales tomados en la mañana del segundo periodo

SIGNOS VITALES EN LA TARDE DEL SEGUNDO PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	100	65	74	16	37.3
S02	110	70	74	15	36.9
S03	90	60	78	16	37
S04	90	65	67	15	36.4
S05	95	60	81	15	37.7
S06	100	65	82	16	36.6
S07	100	60	68	14	36.6
S08	--	--	--	--	--
Promedio	97.9	63.6	74.9	15.3	36.9

Tabla 18c Signos vitales tomados en la tarde del segundo periodo

SIGNOS VITALES AL EGRESAR DEL SEGUNDO PERIODO					
Sujeto de investigación	TA SISTOLICA	TA DIASTOLICA	FRECUENCIA CARDIACA	FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
S01	100	60	60	17	36.3
S02	110	70	76	16	36.6
S03	90	60	68	15	36.6
S04	95	65	78	16	36.1
S05	110	70	82	15	37.0
S06	100	60	64	15	36.3
S07	90	60	64	12	36.3
S08	--	--	--	--	--
Promedio	99.3	63.6	70.3	15.1	36.5

Tabla 18d Signos vitales tomados al egresar del segundo periodo

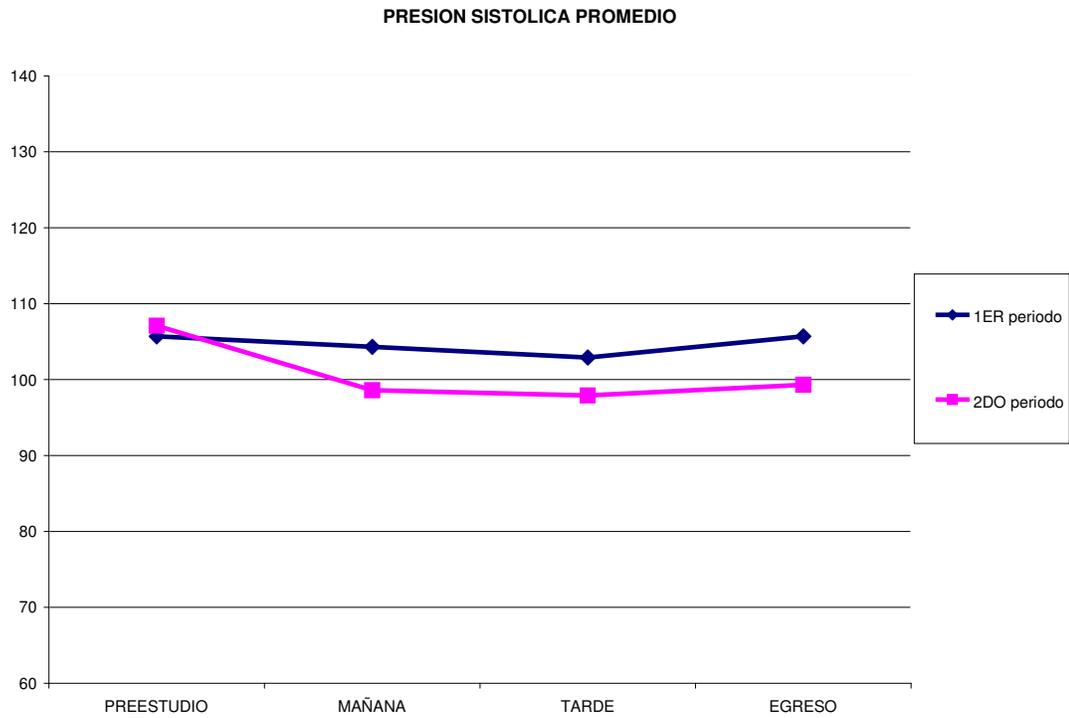


Figura 4. Presión Arterial Sistólica promedio obtenida durante el primer y segundo periodo del estudio

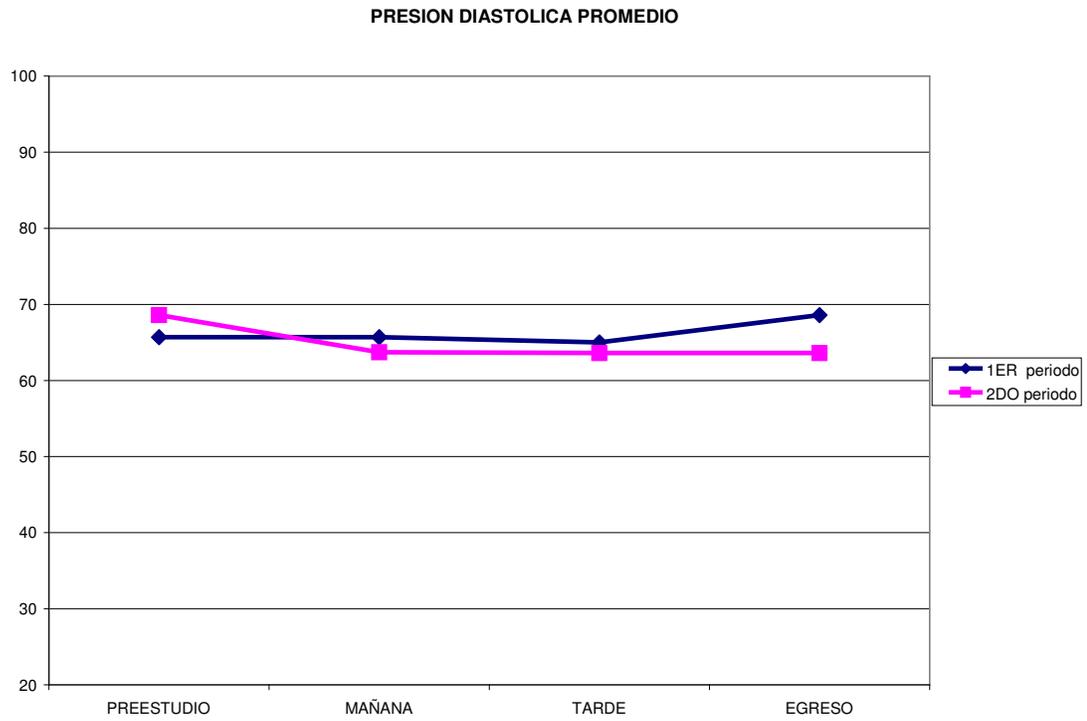


Figura 5. Presión Arterial Diastólica obtenida durante el primer y segundo periodo del estudio

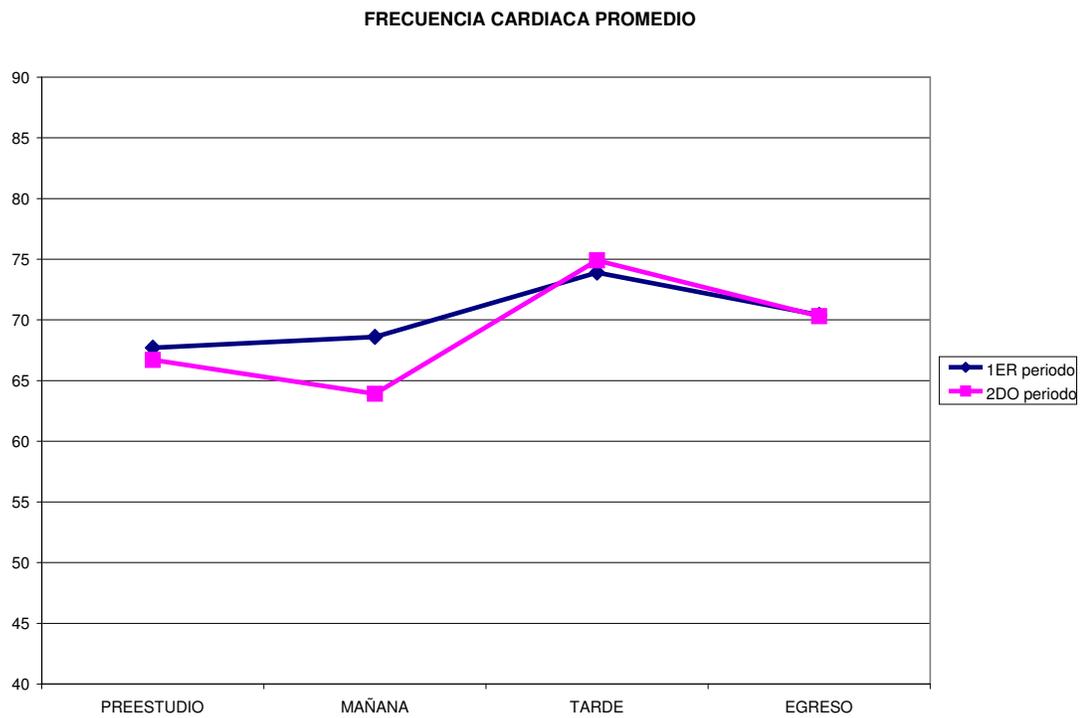


Figura 6. Frecuencia Cardiaca promedio obtenida durante el primer y segundo periodo del estudio

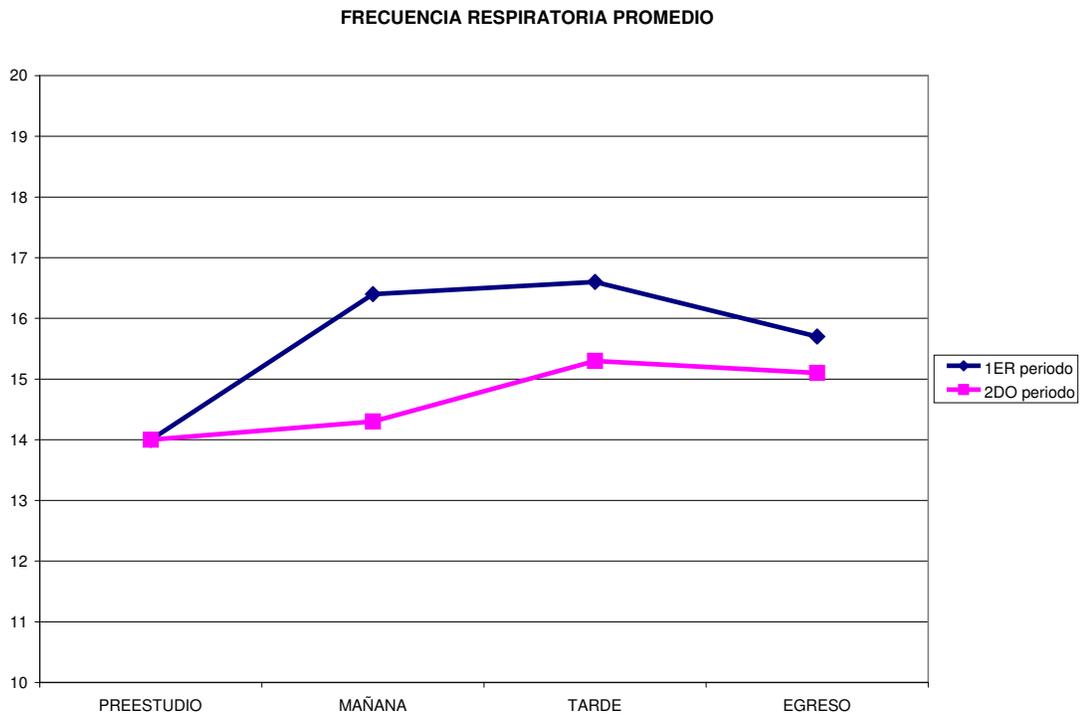


Figura 7. Frecuencia Respiratoria promedio obtenida durante el primer y segundo periodo del estudio

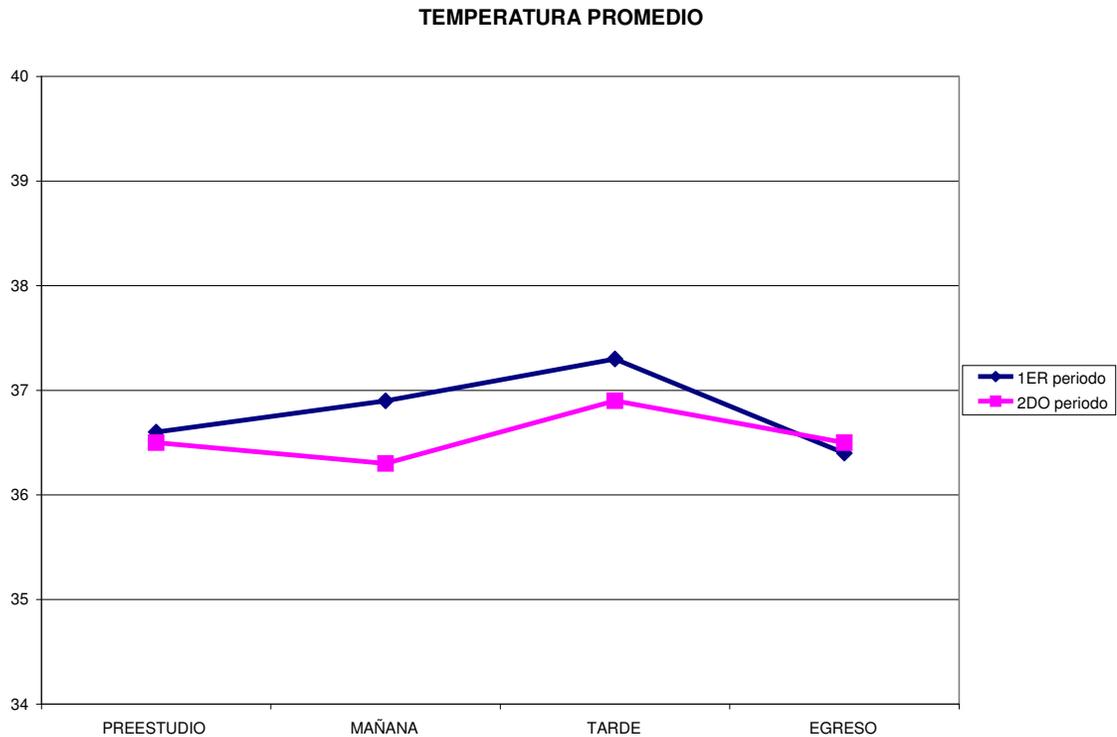


Figura 8. Temperatura promedio obtenida durante el primer y segundo periodo del estudio

3.2.2 Alimentos

El estudio fue realizado en condiciones de ayuno y a los sujetos se les proporcionaron los alimentos de la siguiente forma:

Desayuno: A partir de las 4 horas posteriores a la administración de los medicamentos los sujetos recibieron el desayuno el cual consistió en: 1 manzana mediana, 1 plátano mediano, 1 tazón mediano de uvas (15 - 20 uvas), 2 rebanadas de jamón de pavo, 1 rebanada de pan de molde tostado y un jugo de manzana de 200 mL).

Comida: A partir de las 6 horas posteriores a la administración de los medicamentos se les proporcionó la comida consistente en: 300 g de filete pescado a la plancha, 1 porción

de verduras, 1 porción de sopa de arroz, 12 galletas saladas (3 paquetes con 4 cuadritos c/u) y 1 bote de agua de 500 mL).

Cena: A partir de las 12 horas posteriores a la administración de los medicamentos recibieron la cena consistente en: tostadas, 150 g de pollo, ½ aguacate, 3 cucharadas de crema, 1 bote de agua de 500 mL.

Se proporcionó la misma alimentación en los dos períodos.

No hubo desviaciones en la dieta proporcionada ni en su consumo

El aporte calórico total fue aprox. de 2,800 calorías incluyendo el alimento previo al estudio, el cual se administró 11 h. antes de la primera toma (para asegurar un período de ayuno de 10 h.)

3.3 Resultados de los perfiles bioquímicos de los sujetos de investigación.

Durante la monitorización clínica de los sujetos, con el propósito de verificar la seguridad y buscar posibles efectos adversos de los medicamentos, se evaluó con estudios paraclínicos a los sujetos al principio del estudio y al final. Se reportan los resultados de los perfiles bioquímicos, investigando posibles efectos en riñón, hígado y electrolitos.

Para analizar los resultados del perfil bioquímico y de lípidos previos y posteriores a la administración de resveratrol se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se compararon las medias usando la prueba t de Student mediante el programa estadístico SPSS. Se

establecieron valores de p menores de 0.05 para determinar diferencias estadísticamente significativas.

Sujetos	Glu mg/dL	BUN mg/dL	Creat mg/dL	Prot g/dL	Alb g/dL	BilT mg/dL	BilD mg/dL	FAlc UI/L	TGO UI/L	TGP UI/L
1	69	11	1	7	4.3	0.8	0.3	71	17	16
2	65	9	0.8	7.3	4.4	0.9	0.3	88	30	71
3	68	14	0.8	7.1	4.3	0.9	0.3	56	16	14
4	67	11	0.6	7.2	4.2	0.7	0.3	45	16	11
5	86	10	0.7	7.4	4.5	0.7	0.3	64	16	12
6	65	13	0.8	7.1	4.3	0.8	0.3	79	22	21
7	68	12	0.8	7.2	4.3	0.7	0.3	69	16	15
8	68	11	0.9	7.4	4.2	0.6	0.2	66	15	17
Prom	69.5	11.3	0.8	7.2	4.3	0.7	0.29	67.2	18.5	22.1

Tabla 19a. Resultados de exámenes de perfil bioquímico previo al tratamiento con Resveratrol. Glu; Glucosa(mg/dL). BUN; Nitrógeno Ureico de la Sangre. Creat; Creatinina. Prot; Proteínas. Alb; Albúmina. BilT; Bilirrubinas Totales. BilD; Bilirrubinas Directas. Falc; Fosfatasa Alcalina. TGO; Transaminasa Glutámico Oxalacética. TGP; Transaminasa Glutámico Pirúvica

	Na	K	Cl	Ca
Sujetos	mEq/L	mEq/L	mEq/L	mg/dL
1	138	4.7	103	9.1
2	140	3.7	104	8.9
3	141	3.6	104	9.1
4	138	3.8	103	8.9
5	140	3.6	104	9.2
6	139	3.6	103	8.9
7	142	4.2	105	9.1
8	140	4.3	107	8.9
Prom	139.7	3.9	104.1	9.0

Tabla 19b. Resultados de exámenes de perfil bioquímico previo al tratamiento con Resveratrol. Na; Sodio. K; Potasio. Cl; Cloro. Ca; Calcio

	Glu	BUN	Creat	Prot	Alb	BilT	BilD	FAlc	TGO	TGP
Sujetos	mg/dL	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	mg/dL	mg/dL	UI/L	UI/L	UI/L
1	67	12	0.9	7	4.5	0.8	0.3	78	25	35
2	73	12	0.9	7.6	4.7	1	0.3	96	38	83
3	80	12	0.8	7.3	4.5	0.7	0.3	56	17	13
4	93	8	0.6	7.1	4.4	0.5	0.2	48	15	8
5	83	8	0.7	7.4	4.5	0.5	0.2	69	18	12
6	75	10	0.8	7.1	4.5	0.9	0.4	72	24	21
7	72	8	0.7	7.5	4.7	1	0.4	69	18	20
8*	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Promedio	77.57	10.00	0.77	7.29	4.54	0.77	0.30	69.71	22.14	27.43

Tabla 20a. Resultados de exámenes de perfil bioquímico posterior al tratamiento con Resveratrol. . Glu; Glucosa. BUN; Nitrógeno Ureico de la Sangre. Creat; Creatinina. Prot; Proteínas. Alb; Albúmina. BilT; Bilirrubinas Totales. BilD; Bilirrubinas Directas. Falc; Fosfatasa Alcalina. TGO; Transaminasa Glutámico Oxalacética. TGP; Transaminasa Glutámico Pirúvica *El sujeto 8 se dio de baja por motivos personales.

Sujetos	Na	K	Cl	Ca
	mEq/L	mEq/L	mEq/L	mg/dL
1	140	4.3	105	9
2	142	4.1	103	9.3
3	142	3.9	106	9.3
4	140	4.1	107	8.9
5	141	4.6	106	9.3
6	141	4.7	105	9.2
7	141	3.9	105	9.3
8	----	----	----	----
Prom	141.00	4.23	105.29	9.19

Tabla 20b. Resultados de exámenes de perfil bioquímico posterior al tratamiento con Resveratrol Na; Sodio. K; Potasio. Cl; Cloro. Ca; Calcio. *El sujeto 8 se dio de baja por motivos personales.

Sujeto	Colesterol		Triglicéridos		LDL		HDL		Relación	
	mg/dL		mg/dL		mg/dL		mg/dL		ApoA/ApoB	
1	117	127	52	39	77	71	39	48	0.6	0.4
2	159	193	85	113	109	137	47	44	0.6	0.7
3	154	148	75	77	101	94	51	43	0.5	0.6
4	134	132	84	60	75	73	55	49	0.3	0.4
5	133	140	50	38	75	67	55	64	0.4	0.3
6	103	107	52	37	50	54	56	54	0.2	0.3
7	149	140	42	44	92	79	60	55	0.4	0.4
8*	136	-----	38	-----	85	-----	53	-----	0.4	-----

Tabla 21. Comparación entre perfiles de lípidos al inicio y al final del estudio. La columna izquierda se refiere al valor inicial (previo al tratamiento) y la columna derecha al valor al finalizar los 30 días de administración de resveratrol. *El sujeto 8 se dio de baja por motivos personales.

	A: Inicial	B: Final	Valor p (IC 95)
Colesterol(mg/dL)	135.57	139.29	.389 (-13.51,6.08)
LDL(mg/dL)	82.71	80.57	.590 (-7.06, 11.35)
HDL(mg/dL)	51.86	51.43	.876 (-5.99, 6.85)
Triglicéridos(mg/dL)	62.86	58.57	.547 (-12.14, 20.71)
Rel. ApoB/ApoA	0.429	0.429	1.000 (-0.106, .0106)
Glucosa(mg/dL)	69.71	77.57	.079 (-16.95, 1.24)
BUN(mg/dL)	11.43	10.00	.182 (-0.89, 3.74)
Creatinina(mg/dL)	0.786	0.771	.604 (-0.49, 0.07)
Proteínas Totales(g/dL)	7.186	7.286	.156 (-0.25, 0.05)
Albumina(g/dL)	4.329	4.543	.003 (-0.32, -0.10)*
Bilirrubina Total(mg/dL)	0.786	0.771	.853 (-0.16, 0.19)
Fosfatasa Alcalina(UI/L)	67.43	69.71	.285 (-7.05, 2.48)
TGO(UI/L)	19.00	22.14	.054 (-6.36, 0.08)
TGP(UI/L)	22.86	27.43	.186 (-12.06, 2.92)
Sodio(mEq/L)	139.71	141	.022 (-2.31, -0.25)*
Potasio (mEq/L)	3.886	4.229	.165 (-0.87, 0.18)
Cloro(mEq/L)	103.71	105.29	.042 (-3.06, -0.07)*
Calcio(mg/dL)	9.029	9.186	.052 (-0.31, 0.001)

Tabla 22. Valores promedio de parámetros de perfil bioquímico. A: al inicio (previo a la administración de resveratrol) B: después de la administración de resveratrol, 500 mg diarios, vía oral, durante 30 días. N= 7 * se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ en la prueba t de student.

3.4 Número de muestras recolectadas

Se recolectaron en total 238 muestras, correspondientes a 17 muestras por cada sujeto de investigación en cada periodo de internamiento (1 y 2). El volumen de sangre total obtenido de cada sujeto al final del estudio fue de 170mL aproximadamente.

La cantidad total de sangre obtenida no excedió de 305 mL incluyendo el análisis farmacocinético (229.5 mL) y 0.5 mL de purgado de sangre antes de la toma de cada muestra, excepto la toma en pre-dosis (24 mL por las 16 tomas), 20 mL de sangre obtenida para los análisis de laboratorio del reclutamiento y 30 mL para los estudios de seguimiento (por los 2 periodos).

3.5 Desviaciones al protocolo

No se presentaron desviaciones al protocolo

3.6 Efectos adversos

No se presentaron reacciones adversas en ninguno de los sujetos de investigación ni se reportó ningún evento adverso durante la duración del estudio.

3.7 Resultados de la validación del método analítico

3.7.1 Selectividad

La tabla 31 muestra los resultados y los criterios de aceptación para la selectividad de la muestra en el procedimiento de validación para la cuantificación de Simvastatina en plasma humano.

Solución de Selectividad	Resultado (Área)	Criterio de Aceptación	Evaluación
SSH	0	≤ 14.50	Pasa
SSL	0	≤ 14.50	Pasa
SSP (1406900)	0	≤ 14.50	Pasa
SSP (1406909)	0	≤ 14.50	Pasa
SSP (1406910)	0	≤ 14.50	Pasa
SSP (1406911)	0	≤ 14.50	Pasa
SSP (1406913)	0	≤ 14.50	Pasa
SSP (1406914)	0	≤ 14.50	Pasa
SSF's			
Cafeína*	0	≤ 14.50	Pasa
Paracetamol*	0	≤ 14.50	Pasa
Diclofenaco*	0	≤ 14.50	Pasa
Aspirina*	0	≤ 14.50	Pasa
Naproxeno*	0	≤ 14.50	Pasa
Loratadina*	0	≤ 14.50	Pasa
Ibuprofeno*	0	≤ 14.50	Pasa
SSA's			
Heparina sódica	0	≤ 14.50	Pasa
Citrato de sodio	0	≤ 14.50	Pasa

Tabla 23. Resultados, criterios de aceptación y evaluación de la selectividad.

3.7.2 Límite inferior de Cuantificación.

Se analizó bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. En cada caso se evaluó la precisión y exactitud.

Repetibilidad del LIC

	Concentración calculada					
Concentración (ng/mL)	1	2	3	4	5	Promedio
0.38	0.41	0.50	0.35	0.33	0.38	0.39

Tabla 24a

	Resultado	Criterio de aceptación	Evaluación
% de coeficiente de variación	17.65%	≤ 20%	Pasa

Tabla 24b

Reproducibilidad del LIC

Reproducibilidad para el Limite Inferior de Cuantificación						
	Concentraciones calculadas					Promedio
0.38 ng/mL	0.42	0.46	0.45	0.43	0.47	0.45
	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42	0.41
	0.46	0.44	0.41	0.42	0.40	0.42
					Promedio	0.43

Tabla 25a

	Resultado	Criterio de aceptación	Evaluación
% de coeficiente de variación	4%	≤ 15%	Pasa

Tabla 25b

3.7.3 Precisión y Exactitud a condiciones de Repetibilidad

Precisión

Concentración ng/mL	% coeficiente de variación	Criterio de aceptación	Evaluación
1.12	5.3%	$\leq 15\%$	Pasa
4.50	2.5%	$\leq 15\%$	Pasa
17.97	5.5%	$\leq 15\%$	Pasa
29.97	5.2%	$\leq 15\%$	Pasa

Tabla 26a Resultados y evaluación de precisión a condiciones de repetibilidad

Exactitud

Concentración esperada (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	% de desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
1.12	1.14	2.0%	$\leq 15\%$	Pasa
4.50	4.62	2.7%	$\leq 15\%$	Pasa
17.97	18.39	2.3%	$\leq 15\%$	Pasa
29.97	25.76	14.0%	$\leq 15\%$	Pasa

Tabla 26b Resultados y evaluación de exactitud a condiciones de repetibilidad

3.7.4 Precisión y exactitud a condiciones de Reproducibilidad

Precisión

Concentración (ng/mL)	% de coeficiente de variación	Criterio de aceptación	Evaluación
1.12	8.8%	$\leq 15\%$	Pasa
4.50	2.4%	$\leq 15\%$	Pasa
17.97	2.1%	$\leq 15\%$	Pasa

Tabla 27a Resultados y evaluación de precisión a condiciones de reproducibilidad

Exactitud

Concentración esperada (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	% de desviación	Criterio de aceptación	Evaluación
1.12	1.12	0.3%	≤ 15%	Pasa
4.50	4.68	-4.1%	≤ 15%	Pasa
17.97	18.98	-5.6%	≤ 15%	Pasa

Tabla 27b Resultados y evaluación de exactitud a condiciones de reproducibilidad

3.7.5 Curva De Calibración

Area				
Concentración ng/mL	Curva de calibración 1	Curva de calibración 2	Curva de calibración 3	Curva de calibración 4
0.38	0.39	0.40	0.36	0.36
0.75	0.71	0.68	0.69	0.72
1.50	1.56	1.45	1.49	1.52
3.00	2.99	2.94	3.35	2.99
5.99	5.88	5.88	6.40	6.52
11.98	11.61	12.03	11.67	12.58
20.95	17.00	29.86	18.98	20.07
23.96	25.08	26.39	25.57	23.75

Tabla 28a Datos obtenidos para la evaluación de la curva de calibración

% de error				
Concentración ng/mL	Curva de calibración 1	Curva de calibración 2	Curva de calibración 3	Curva de calibración 4
0.38	1.7	5.7	5.1	5.7
0.75	5.2	9.4	7.5	4.0
1.50	4.3	3.1	0.4	1.1
3.00	0.5	1.9	11.6	0.3
5.99	1.9	1.9	6.8	8.9
11.98	3.1	0.4	2.6	5.0
20.95	18.9	42.5	9.4	4.2
23.96	4.7	10.1	6.7	0.9

Tabla 28b Resultados del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración

Evaluación respecto al % de error absoluto					
Concentración ng/mL	Criterio de aceptación	Curva de calibración 1	Curva de calibración 2	Curva de calibración 3	Curva de calibración 4
0.38	20	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
0.75	15	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
1.50	15	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
3.00	15	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
5.99	15	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
11.98	15	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
20.95	15	No Pasa	No Pasa	Pasa	Pasa
23.96	15	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa

Tabla 28c Evaluación del porcentaje de error absoluto para la curva de calibración

Evaluación respecto al porcentaje de réplicas			
Concentración ng/mL	Porcentaje de réplicas que cumplen con el criterio de aceptación (%)	Porcentaje de réplicas que deben cumplir con el criterio de aceptación (%)	Evaluación
0.38	100	50	Pasa
0.75	100	50	Pasa
1.50	100	50	Pasa
3.00	100	50	Pasa
5.99	100	50	Pasa
11.98	100	50	Pasa
20.95	50	50	Pasa
23.96	100	50	Pasa

Tabla 28d Evaluación con respecto al porcentaje de réplicas que cumplen con el criterio de aceptación.

	Curvas de calibración			
	1	2	3	4
% de niveles de cada curva de calibración que cumple con criterios de aceptación	88	88	100	100
Criterio de aceptación	75	75	75	75
Evaluación	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa

Tabla 28e Evaluación de la exactitud de la curva de calibración por niveles.

3.7.6 Estabilidad de las muestras

Se cumplieron todos los criterios de aceptación para los parámetros de estabilidad a corto, a largo plazo, ciclos de congelación y descongelación. El largo plazo fue el periodo comprendido desde el 29 de julio hasta el 7 de octubre de 2014 (70 días).

3.8 Resultados del análisis de muestras biológicas

Se midieron las concentraciones de simvastatina obtenidas en las muestras sanguíneas de los sujetos de investigación. Todas las muestras cumplieron con criterios de aceptación, no se perdió ninguna muestra por derrame y su proceso se cumplió sin eventualidades.

A continuación se presentan las tablas con las concentraciones plasmáticas de simvastatina en los periodos 1 y 2 (antes y después de la administración de resveratrol) de cada uno de los sujetos, y las gráficas de las concentraciones, tanto en versión normal como en logarítmica. Tablas 29 a 36 y Figuras 9 a 17.

SUJETO 01		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00
0.50	0.52	0.99
1.00	1.68	3.54
1.50	3.31	4.67
2.00	3.77	5.69
2.50	3.25	4.70
3.00	3.26	4.30
3.50	2.89	3.06
4.00	2.59	2.97
4.50	1.92	2.65
5.00	1.78	4.75
6.00	1.25	3.18
8.00	0.83	2.55
10.00	0.84	2.42
12.00	0.77	1.90
24.00	0.00	0.85

Tabla 29. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 01

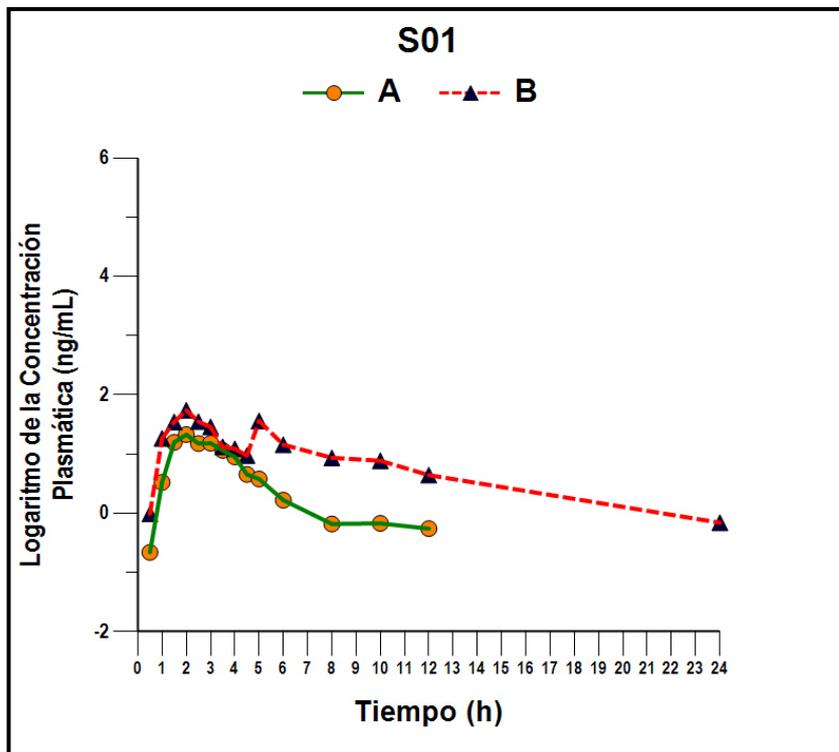
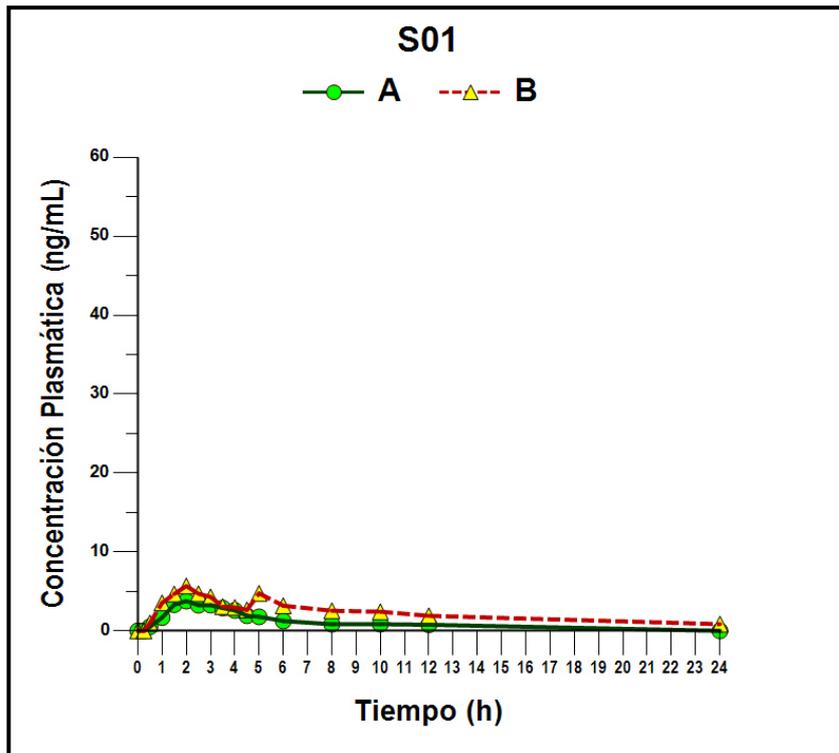


Figura 9. Gráfica de concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina. B Simvastatina después de Resveratrol) Sujeto 01

SUJETO 02		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.44
0.50	0.55	5.09
1.00	1.69	7.93
1.50	1.82	18.68
2.00	1.45	12.51
2.50	1.70	7.80
3.00	7.80	7.79
3.50	5.70	4.75
4.00	4.68	4.65
4.50	3.99	3.83
5.00	3.91	3.88
6.00	1.94	2.87
8.00	1.38	2.05
10.00	1.18	1.46
12.00	1.16	1.33
24.00	0.51	1.16

Tabla 30. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 02

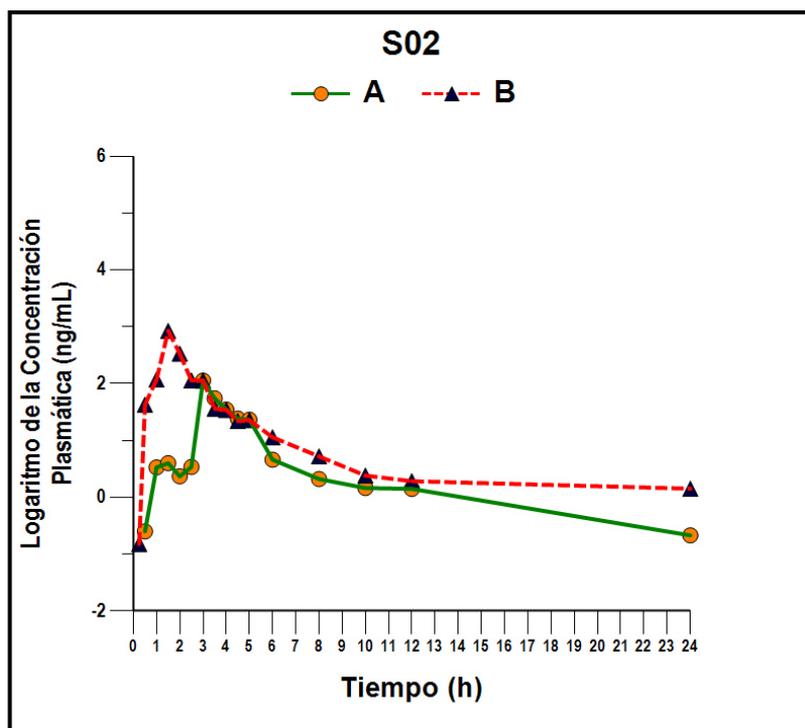
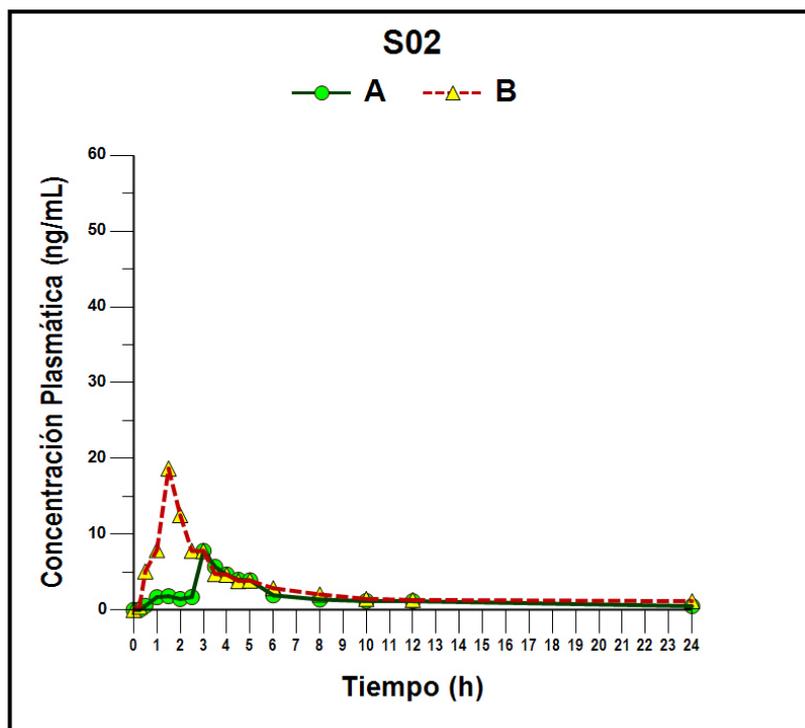


Figura 10. Concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina B Simvastatina post administración de Resveratrol) Sujeto 02

SUJETO 03		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00
0.50	2.13	1.00
1.00	6.27	4.04
1.50	5.48	4.65
2.00	4.27	10.85
2.50	3.26	13.25
3.00	2.40	12.17
3.50	2.00	10.57
4.00	1.53	8.23
4.50	1.37	5.46
5.00	1.40	7.30
6.00	2.15	5.68
8.00	1.96	3.57
10.00	1.20	2.19
12.00	0.79	1.75
24.00	0.00	0.47

Tabla 31. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 03

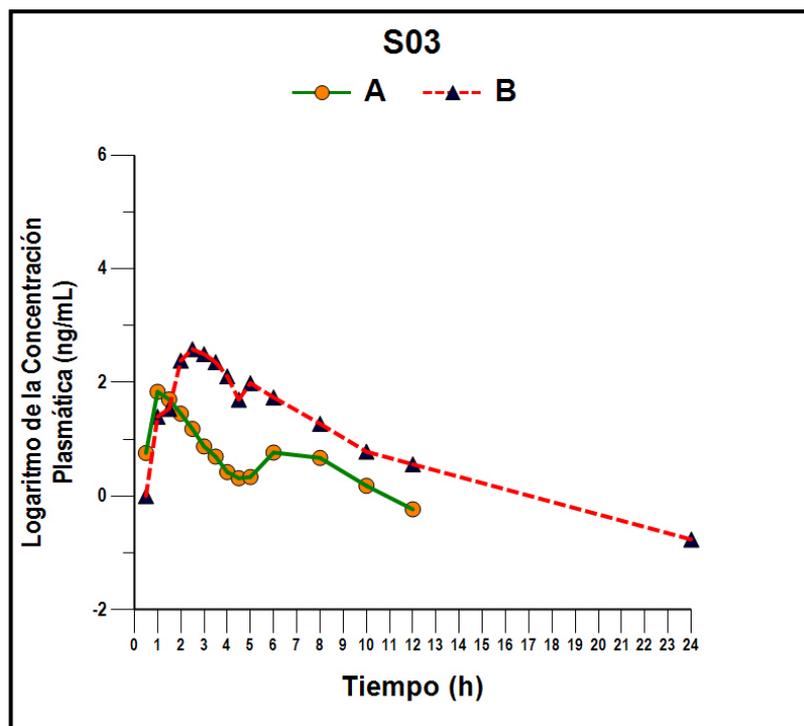
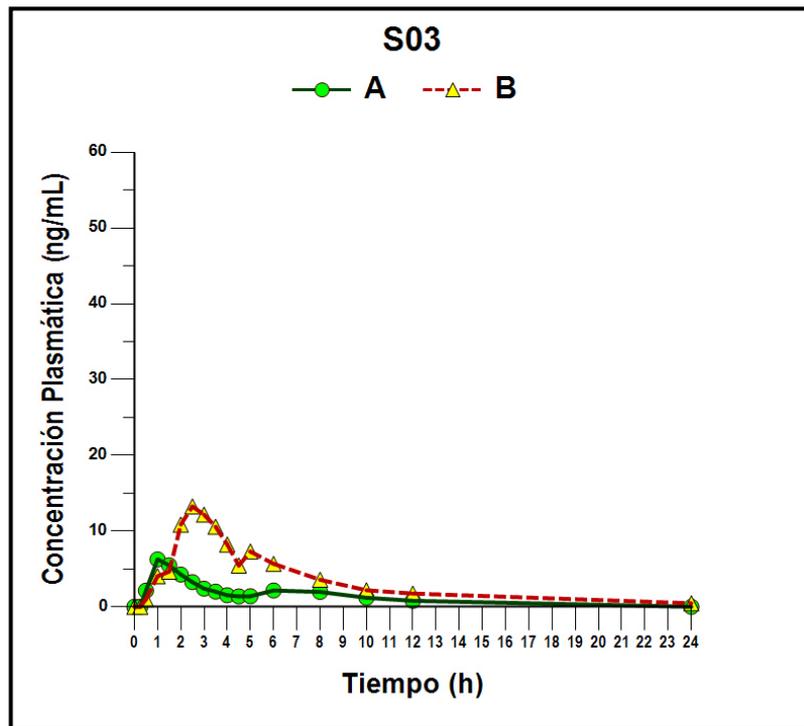


Figura 11. Concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina B Simvastatina post administración de Resveratrol) Sujeto 03

SUJETO 04		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00
0.50	2.01	0.73
1.00	10.96	9.11
1.50	11.36	23.50
2.00	7.29	58.85
2.50	4.24	37.06
3.00	3.65	26.11
3.50	2.63	18.03
4.00	1.86	10.98
4.50	1.98	8.20
5.00	1.54	7.40
6.00	1.04	4.59
8.00	0.72	3.26
10.00	0.52	2.06
12.00	0.35	1.96
24.00	0.00	0.00

Tabla 32. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post resveratrol – Sujeto de investigación 04

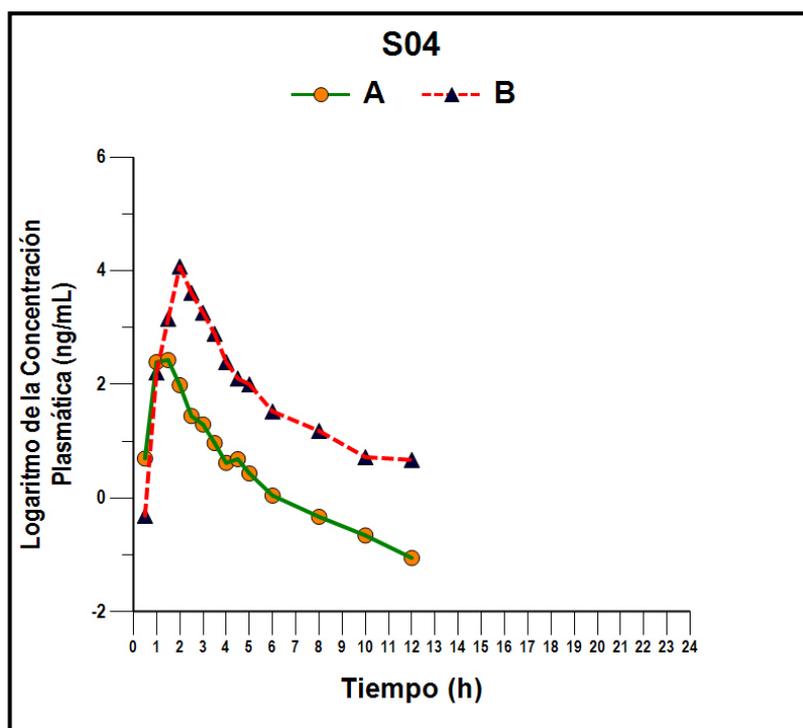
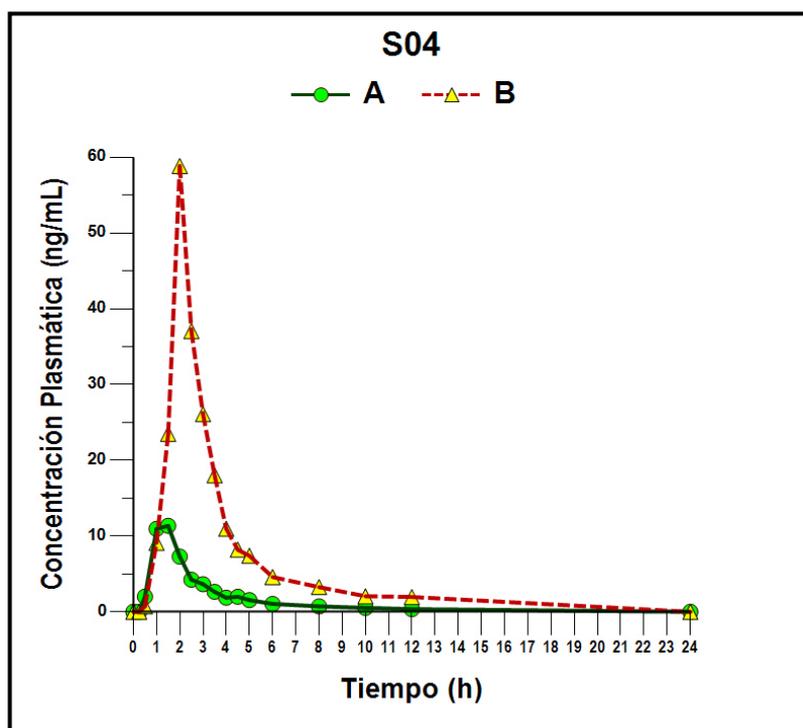


Figura 12. Concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina B Simvastatina post administración de Resveratrol) Sujeto 04

SUJETO 05		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00
0.50	0.66	1.88
1.00	2.09	5.02
1.50	1.88	5.39
2.00	4.70	9.68
2.50	3.07	8.29
3.00	3.39	9.96
3.50	2.89	22.67
4.00	3.06	40.70
4.50	2.69	29.96
5.00	1.97	24.53
6.00	2.17	19.53
8.00	2.74	13.39
10.00	1.70	12.05
12.00	1.53	9.75
24.00	0.73	2.23

Tabla 33. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post administración de resveratrol – Sujeto de investigación 05

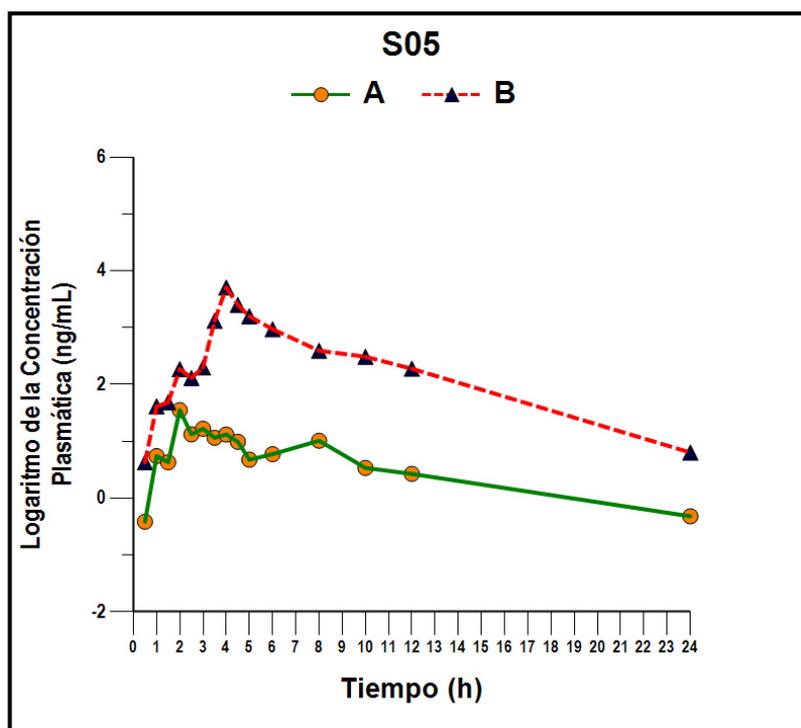
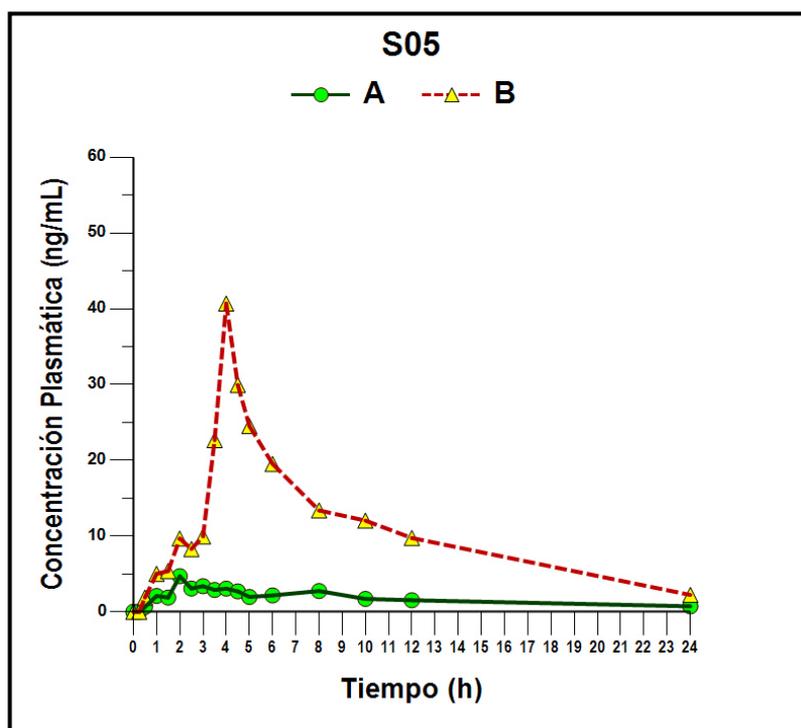


Figura 13. Concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina B Simvastatina post administración de Resveratrol) . Sujeto 05

SUJETO 06		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.18	0.17
0.50	0.79	0.46
1.00	1.90	1.33
1.50	1.06	1.19
2.00	1.04	1.51
2.50	1.31	7.05
3.00	1.02	6.60
3.50	0.83	5.12
4.00	0.78	8.54
4.50	0.60	7.54
5.00	0.72	8.19
6.00	0.49	4.54
8.00	0.00	1.81
10.00	0.00	1.21
12.00	0.00	0.72
24.00	0.00	0.00

Tabla 34. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post administración de resveratrol – Sujeto de investigación 06

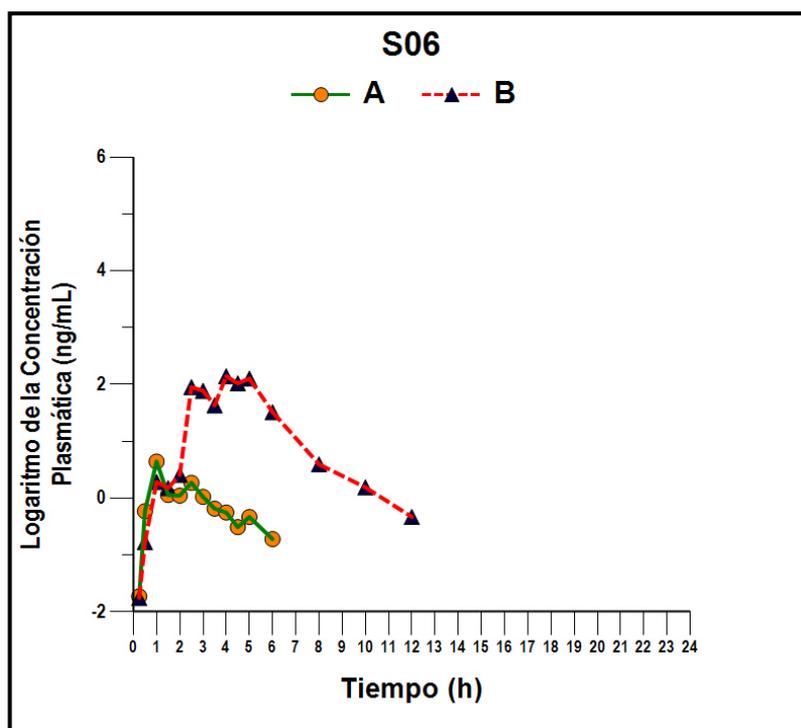
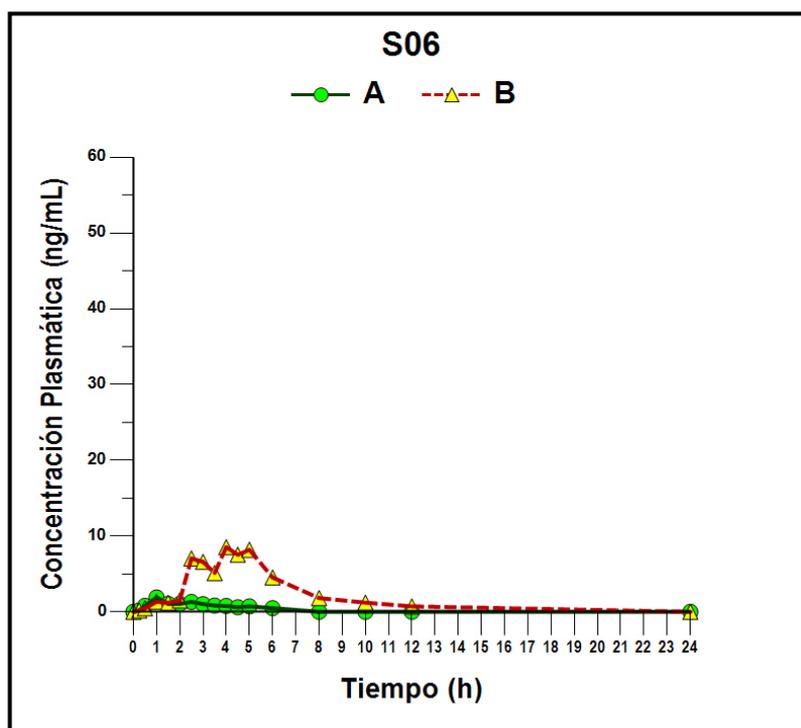


Figura 14. Concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina B Simvastatina post administración de Resveratrol) Sujeto 06

SUJETO 07		
Muestreo (horas)	Periodo 1	Periodo 2
0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.00
0.50	0.98	2.13
1.00	5.52	24.76
1.50	10.75	48.18
2.00	15.21	38.54
2.50	25.48	39.98
3.00	18.90	39.49
3.50	17.00	36.45
4.00	16.96	33.85
4.50	10.30	26.74
5.00	9.52	22.38
6.00	8.09	15.29
8.00	5.97	12.35
10.00	4.71	7.32
12.00	3.17	5.85
24.00	1.23	2.00

Tabla 35. Concentraciones obtenidas en el análisis de simvastatina: Fases pre y post post administración de resveratrol – Sujeto de investigación 07

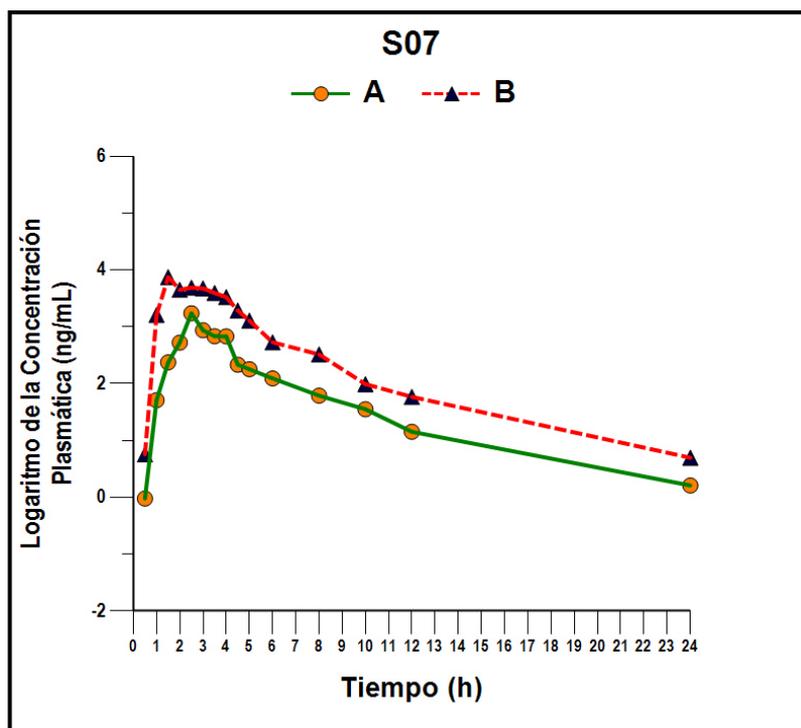
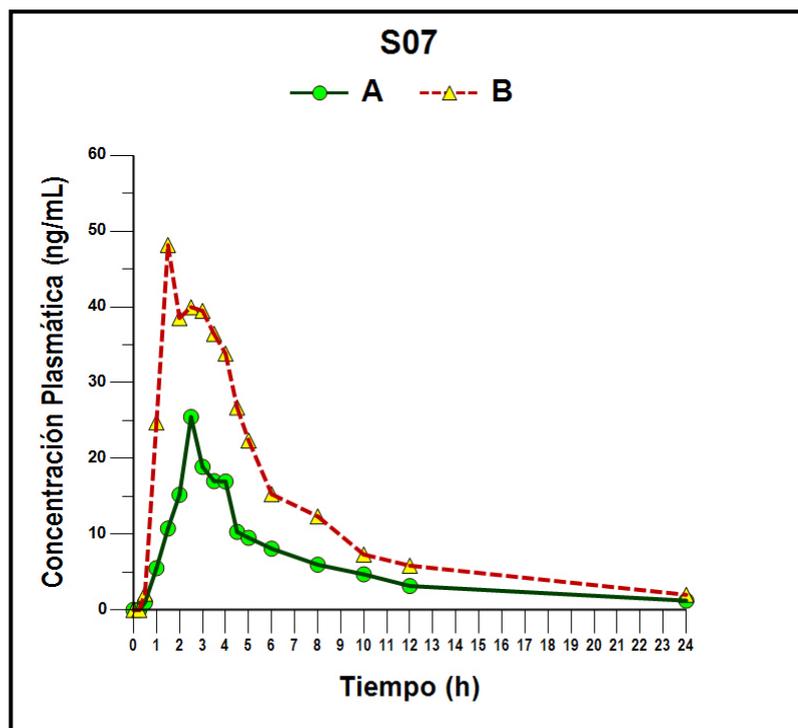


Figura 15. Concentración plasmática en escala normal y logarítmica con respecto al tiempo. (A Simvastatina B Simvastatina post administración de Resveratrol) Sujeto 07

Tiempo de Muestreo	Periodo 1 Concentración ng/mL	Periodo 2 Concentración ng/mL
0.00	0.0	0.0
0.25	0.0	0.1
0.50	1.1	1.8
1.00	4.3	8.0
1.50	5.1	15.2
2.00	5.4	19.7 *
2.50	6.0 *	16.9
3.00	5.8	15.2
3.50	4.9	14.4
4.00	4.5	15.7
4.50	3.3	12.1
5.00	3.0	11.2
6.00	2.4	8.0
8.00	1.9	5.6
10.00	1.4	4.1
12.00	1.1	3.3
24.00	0.4	1.0

Tabla 36. Promedio de concentraciones plasmáticas de simvastatina.

* C_{máx} para cada periodo. N=7

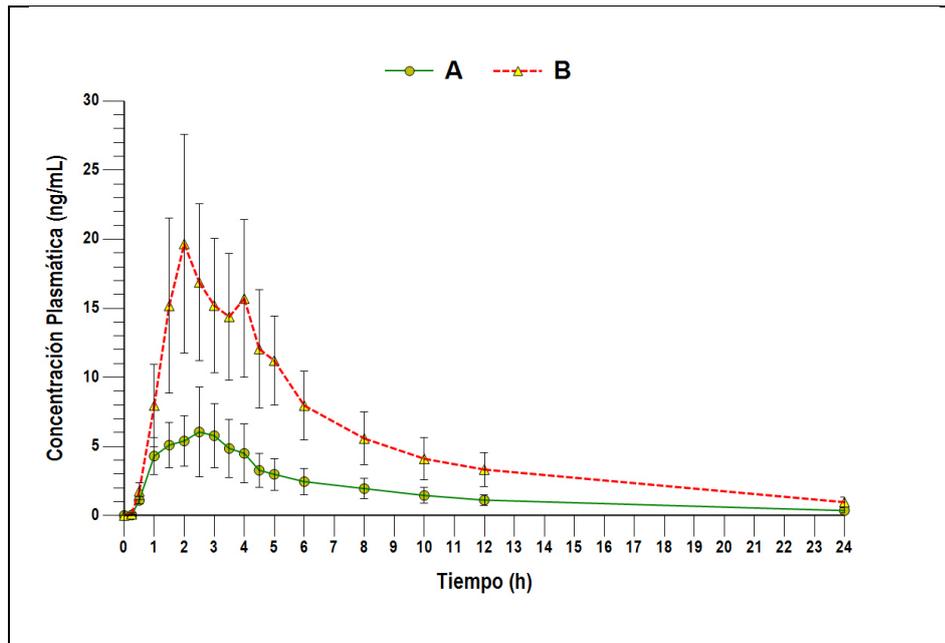


Figura 16. Perfil farmacocinético de Simvastatina . Promedio \pm error estándar en escala normal. N=7

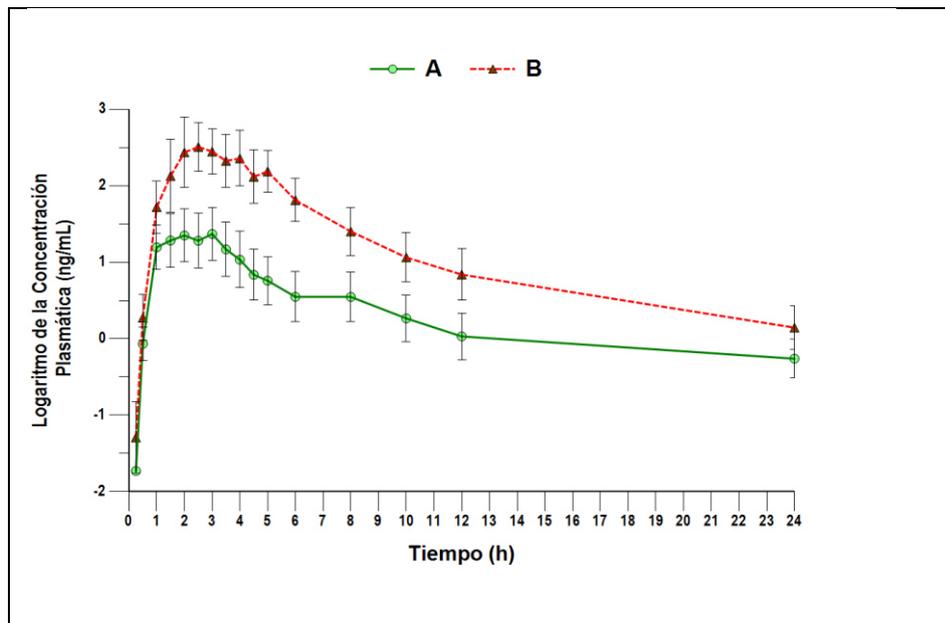


Figura 17. Perfil farmacocinético de Simvastatina. Promedio \pm error estándar en escala semilogarítmica. N=7

(A: Simvastatina pre administración de resveratrol, B: Simvastatina post administración de resveratrol)

3.9 Resultados del análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos de la simvastatina obtenidos en el periodo 1 (antes de la administración de resveratrol) y en el periodo 2 (después de la administración de resveratrol) fueron los siguientes:

En el periodo 1: C_{max} 6.47 ng/mL, T_{max} 1.86 h, ABC_{0-t} 28.27 ng/mL/hr y $ABC_{0-\infty}$ 33.79 ng/mL/h, con una vida media de eliminación de 5.74 ± 3.31 h.

En el periodo 2 (posterior al tratamiento con resveratrol): C_{max} 20.23 ng/mL, T_{max} 2.5 h, ABC_{0-t} 97.95 ng/mL/h y $ABC_{0-\infty}$ 118.64 ng/mL/h, con una vida media de eliminación de 12.13 ± 15.60 h.

Los resultados del análisis estadístico realizado por medio del programa Winnonlin se muestran en la tabla 37.

Parámetros	Promedio Geométrico por mínimos cuadrados		IP	IC 90 % Clásico		T doble unilateral de Schuirmann		Valor de p	Potencia
	Simvastatina A	Simvastatina B	[B/A] (%)	LI	LS	P < 80	P > 125	AH	
Ln(C _{máx})	6.475	20.234	312.49	195.79	498.74	.0007	.9956	.9949	.1886
Ln(ABC _{0-t})	28.270	97.959	346.52	236.14	508.47	.0002	.9990	.9988	.2345
Ln(ABC _{0-∞})	33.791	118.645	351.11	268.23	459.62	.0001	.9998	.9998	.3811
Criterio				> 80	< 125	< .05	< .05	< .05	> .80

Tabla 37. Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros

farmacocinéticos de Simvastatina. Simvastatina A (Simvastatina basal), Simvastatina B (Simvastatina después de resveratrol), IC = Intervalo de Confianza, LI = Límite Inferior, LS = Límite Superior, AH = Anderson Hauck. IP = Índice de Promedios.

Se reporta valor de p de .0001, cuando el valor exacto de p es menor o igual a .0001

CAPITULO IV

4. DISCUSIÓN

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas ⁶⁰.

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido súper crítico; la cual se hace pasar por una fase estacionaria inmisible fija en una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil. En cambio, los componentes unidos de manera débil a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración, los componentes de la muestra se separan y se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa ⁶⁰.

En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación de simvastatina a través de cromatografía de líquidos, ya que presenta una sensibilidad adecuada, puede ser automatizada y cuenta con capacidad para separar compuestos no volátiles o termolábiles.

Se trabajó con espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray como sistema de detección (sistema triple cuadrupolo), ya que permite un análisis cuantitativo exacto, mayor sensibilidad y especificidad respecto a otros detectores, así como la obtención de cromatogramas en tiempo real.

4.1 Validación

En este trabajo se desarrolló un procedimiento analítico para la cuantificación de simvastatina en plasma humano que cumplió con los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013⁵³.

Para el manejo del intervalo de trabajo en la curva de calibración (relación de concentraciones con su respuesta analítica), se empleó el modelo matemático lineal con ponderación. El modelo de tipo lineal asegura una relación continua y reproducible en el intervalo de trabajo. En el modelo de regresión lineal simple clásico se asume la misma varianza en todas las concentraciones, es decir, los datos son homocedásticos, sin embargo, para los datos de la curva de calibración la varianza generalmente aumenta con la concentración, los errores asociados con altas concentraciones son más altos y estos pueden afectar indebidamente la pendiente de la línea de calibración. En la regresión lineal no ponderada se trata a todos los puntos de la misma forma, lo que en efecto significa que los puntos de concentración más bajos tienen menos probabilidades de no encontrarse en la línea de calibración.

Con respecto a la selectividad, está reportado que la cromatografía de LC-MS-MS es una técnica instrumental de alta especificidad y sensibilidad con capacidad de multianálisis que la convierte en una alternativa ideal al inmunoensayo y a cromatografía de líquidos de alta resolución convencional.

En este método no se observaron interferencia con fármacos que pudieran haber sido administrados de manera concomitante, así como con plasma humano lipémico o hemolizado; el criterio de aceptación para este parámetro fue una respuesta menor al 20% con respecto al límite de cuantificación para las respuestas cercanas el tiempo de retención. El uso de la técnica analítica instrumental utilizada permitió una rápida separación sin interferencias y disminuyó el tiempo de análisis.

Uno de los inconvenientes de utilizar LC-MS-MS como técnica de análisis, es el efecto de matriz evidenciado por la supresión inesperada o aumento de la respuesta del analito de interés debido a coeluyentes constituyentes de la matriz al momento de ingresar en la fuente de ionización⁶⁴.

Dado lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto de matriz como un parámetro adicional de validación. Los resultados mostraron que no hubo un efecto de matriz para los constituyentes del pool de plasma humano, así como para muestras de plasma humano hemolizado o lipémico.

4.2 Análisis de las muestras biológicas

Durante el análisis de las muestras de los sujetos, cada corrida analítica consistió en al menos una muestra en blanco, curva de calibración (8 niveles desde 0.38 hasta 23.96 ng/mL) y al menos 3 niveles de concentración de muestras control (MCB 1.12ng/mL, MCM 4.50 ng/mL y MCA 17.97 ng/mL) por duplicado de cada sujeto.

4.3 Eventos adversos y tolerabilidad

Las reacciones adversas a simvastatina se han reportado con el uso crónico y prolongado, siendo las más graves hepatotoxicidad y rabdomiólisis. En este estudio, durante los 3 periodos del estudio clínico ningún sujeto de investigación presentó efectos adversos, evidenciados por signos y síntomas o por cambios clínicamente significativos en los parámetros de laboratorio.

La administración de 500mg vía oral de resveratrol fue bien tolerada, no produjo efectos adversos ni alteración significativa en los exámenes de laboratorio. Esto es comparable con lo reportado previamente por Haneke en un estudio de evaluación de toxicidad del resveratrol⁷⁰.

Al comparar los valores promedio de los parámetros de los perfiles bioquímicos iniciales y finales se observó que todos los valores estuvieron dentro de límites normales. Los valores promedio de glucosa y creatinina fueron 69.5mg/dL y 0.8 mg/dL respectivamente. No se observó alteración en las pruebas de función hepática, bilirrubinas totales proteínas totales, ni electrolitos séricos.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los valores iniciales y finales de albúmina, sodio y cloro sin embargo, tanto los valores iniciales como finales se reportaron dentro de límites normales. Aunque no se observó diferencia estadísticamente significativa, hubo un incremento aparente en los valores promedio iniciales y finales de glucosa (69.5 vs 77.57mg/dL), TGO (18.5 vs 22.14 UI/L) y TGP (22.1 vs 27.4 UI/L) sin embargo todos los valores estuvieron dentro de límites normales.

Al comparar los valores iniciales y finales (prueba t de student), se observó un incremento en el colesterol (135.57 vs 139.29 mg/dL) así como una aparente disminución en triglicéridos (62.86 vs 58.57 mg/dL) y LDL (82.71 vs 80.57UI/L) sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, pues en ninguno de estos casos los valores de p fueron menores de 0.05 (Tabla 22). Ghanim, quien realizó un estudio en sujetos sanos, administrando una dosis menor a la de este estudio (40mg diarios, vía oral durante 6 semanas) reportó una ligera disminución de colesterol, LDL y HDL sin cambios en los triglicéridos⁷¹.

En las comparaciones de los perfiles bioquímicos, existen algunas tendencias que debieran ser consideradas en futuros estudios con un mayor número de sujetos como el incremento en los valores promedio de glucosa (a pesar de haber sido estadísticamente no significativo) que contrasta con lo publicado por Brasnyo et al quienes tras administrar 5 mg de resveratrol por vía oral 2 veces al día durante 4 semanas a pacientes diabéticos observaron una disminución en los valores de glucosa y en la resistencia a la insulina postprandial⁷².

Así mismo el aparente aumento en los valores de TGO ($p=0.054$) y calcio ($p=0.052$) con valores de p que podrían indicar una tendencia a ser significativos si el número de sujetos del estudio fuera mayor.

Actualmente se tiene escasa información sobre el uso de resveratrol en humanos, lo cual seguramente cambiará en el futuro cercano ya que en una búsqueda realizada en la página de Clinical Trials(www.clinicaltrials.gov) se encontró que actualmente hay 15 ensayos clínicos registrados involucrando el uso de resveratrol en sujetos sanos⁶⁵. De estos estudios, 14 están reportados como completos, solo de uno se reporta que hay resultados (los cuales no se muestran) y para todos aún está pendiente la publicación de dichos resultados por lo que por ahora no es posible hacer comparación de los mismos con los resultados obtenidos en este estudio.

4.4 Parámetros Farmacocinéticos de Simvastatina

Los parámetros farmacocinéticos de la simvastatina obtenidos en la fase 1 (pre-administración de resveratrol) de este estudio ($C_{m\acute{a}x}$ 6.47 ng/mL, $T_{1/2}$ 5.7 h y T_{max} 1.86 h) son superiores a los reportados por Desager y cols en 1996 quien obtuvo un C_{max} de 4.6 ± 2 ng/mL, y un $T_{m\acute{a}x}$ de 1.4 ± 1.0 h⁶⁶.

En un estudio realizado por Jang y cols en 2010 en 24 sujetos coreanos se reportó un $C_{m\acute{a}x}$ de 3.62 ng/mL, y un T_{max} menor al observado en este estudio (1.86 h vs 4.04 h)⁶⁷. Es importante señalar que en este estudio el tamaño de muestra inicial fue de 8 sujetos y que uno de ellos se retiró voluntariamente por lo que el estudio se realizó en 7 sujetos sanos, este tamaño de muestra hace difícil hacer comparaciones con los resultados de otros estudios en cuanto a biodisponibilidad de simvastatina.

El tamaño de muestra fue seleccionado considerando dos criterios: primero que este es el primer estudio en el que se evalúa el efecto del resveratrol en sujetos mexicanos y fue diseñado para evaluar el posible efecto de interacción del resveratrol con el metabolismo de la simvastatina, ya que el resveratrol inhibe al CYP3A4 responsable del metabolismo de este fármaco, y segundo en el estudio también se evaluó por primera vez la tolerabilidad de resveratrol administrado diariamente durante 30 días, en sujetos mexicanos.

Por lo anterior y tomando como base la NOM 177-SSA1-2013 se consideró que un estudio piloto realizado en 8 sujetos brindaría información relevante en cuanto a la posible interacción de resveratrol con simvastatina y su tolerabilidad y serviría de base para el planteamiento de un estudio con un tamaño de muestra mayor en caso de requerirse.

El estudio fue realizado en sujetos sanos de ambos géneros ya que no existen reportes relacionados con la influencia de género en el metabolismo de simvastatina. Se utilizó la dosis de 500mg de resveratrol considerando reportes previos de inhibición de citocromos con 500mg y 1 gramo¹⁷, y se optó por la dosis menor por ser el primer estudio de evaluación de tolerabilidad de resveratrol en sujetos mexicanos y por el mayor riesgo teórico de interacción medicamentosa con la dosis superior¹⁶.

Se observó un incremento en el $C_{máx}$ y ABC de simvastatina basal (pre-tratamiento con resveratrol) y el $C_{máx}$ y ABC obtenidos después de la administración de resveratrol durante 30 días (Tabla 37). Lo anterior indica que la administración del resveratrol produjo una inhibición de las enzimas responsables del metabolismo de la simvastatina lo que produjo un incremento de sus concentraciones plasmáticas. Este tipo de interacción ya ha sido documentada con otros fármacos y fitoterapias, pero no había sido demostrada con el resveratrol ⁶⁸. Se evidenció además, un incremento en la vida media de la simvastatina, aunque éste no fue significativo.

Zhao y colaboradores realizaron un estudio de interacción entre simvastatina y 4 remedios tradicionales chinos (Tong Xin Luo, Nao Xin Tong, Guan Mai Ning ó Yin Xing Ye) administrados durante 7 días cada uno y reportaron que no produjeron interacción con simvastatina. A diferencia de ese estudio, éste fue realizado con 30 días de administración de resveratrol el cual fue tiempo suficiente para producir la inhibición del CYP3A4 ⁶⁹.

4.5 Análisis estadístico

Para este estudio de evaluación de la posible interacción el resveratrol en el metabolismo de la simvastatina se decidió utilizar los mismos criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013 para establecer bioequivalencia de fármacos incluyendo el análisis estadístico con las pruebas T doble unilateral de Schuirmann y Anderson Hauck^{52, 63}.

Previo a la determinación de no interacción es necesaria la conducción de un Análisis de Varianza (ANADEVA) con el fin de evaluar todos los factores que pudieran afectar la conclusión del estudio.

En cuanto a los resultados obtenidos en este estudio con las pruebas para establecer el efecto del resveratrol en el metabolismo de simvastatina, los cocientes de las relaciones de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC, determinados en el período basal (previo a la administración de resveratrol) como en el período post-ingesta de resveratrol estuvieron fuera de lo establecido como criterio de no interacción (80-125%), con un intervalo de confianza del 90%.

Dado el rigor de las pruebas estadísticas establecidas como criterio para determinar la posible interacción, la potencia estadística obtenida en este estudio fue menor a 80% por lo que se sugiere la realización de más estudios con un tamaño de muestra mayor calculado con los resultados obtenidos en este estudio.

Este es el primer estudio realizado donde se evalúa la interacción del resveratrol con el metabolismo de simvastatina así como la tolerabilidad y posibles efectos adversos del uso diario de resveratrol durante 30 días.

El incremento observado en el $C_{m\acute{a}x}$ y ABC de simvastatina posterior a la administración de resveratrol durante 30 días indica la interacción de este producto de origen natural con la simvastatina y que existe la posibilidad de que los pacientes que estén consumiendo simvastatina y resveratrol simultáneamente tengan un mayor riesgo de desarrollar los efectos adversos (hepatotoxicidad, rabdomiólisis) reportados

para este fármaco. El uso diario de resveratrol 500mg por vía oral durante 30 días no produjo ningún efecto adverso y fue bien tolerado por todos los sujetos.

No se observaron alteraciones en los parámetros bioquímicos sanguíneos relacionados con función renal, hepática y electrolitos ni en el perfil de lípidos sin embargo se requieren estudios con mayor número de sujetos para confirmarlo.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES

Este trabajo constituye el primer estudio realizado en sujetos mexicanos donde se evalúa la interacción del resveratrol con el metabolismo de simvastatina así como la tolerabilidad y posibles efectos adversos de resveratrol

El resveratrol administrado a dosis de 500 mg por vía oral durante 30 días no produjo ningún efecto adverso y fue bien tolerado por todos los sujetos.

El resveratrol interaccionó con el metabolismo de la simvastatina y produjo un incremento significativo en sus concentraciones plasmáticas (Cmax y Area Bajo la Curva)

La administración de resveratrol por más de 30 días en pacientes que estén tomando simvastatina puede potenciar los efectos tóxicos (hepatotoxicidad y rabdomiólisis) reportados con el uso prolongado de ésta última.

CAPITULO VI

6. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto de resveratrol sobre otros medicamentos metabolizados por el CYP3A4.

Evaluar el efecto de otros productos de origen natural (fitofármacos) que inhiban o estimulen a las enzimas CYP3A4 y CYP2D6 con fármacos de índice terapéutico estrecho que sean sustratos de estas enzimas y/o fármacos usados por tiempo prolongado en padecimientos crónico-degenerativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 WHO Factsheet “Traditional Medicine” Dec 2008
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>
- 2 WHO, General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, WHO/EDM/TR/2000.1, World Health Organization, Geneva, 2000.
- 3 Romero O, Tortoriello J, Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2007; 4(5): 453-458.
- 4 Ernst E, Prescribing herbal medications appropriately. *Journal of Family Practice* 2004; 53 (12); 985-988.
- 5 Slevin M, Ahmed N, Wang Q Unique vascular protective properties of natural products: supplements or future main-line drugs with significant anti-atherosclerotic potential? *Vasc Cell.* 2012 4:9
- 6 DeSmet PA, Health risks of herbal remedies: an update. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Jul; 76(1): 1-7.
- 7 Beltran E, Aguilar F, Vargas E, Sanchez L, Plantas medicinales, conocimiento sobre uso, reacciones adversas e interacciones. *RESPYN Edición especial No. 1* 2010.
- 8 Fasinu PS, Boiuc PJ, Rosenkranz B, An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions. *Frontiers in Pharmacology.* 2012; 3; Art 69.
- 9 Brunton L, Chabner B, Knollman B Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12ª Edición, McGraw Hill, México 2011.
- 10 Dipiro J, Talbert R, Yee G, Pharmacotherapy, a pathophysiologic approach. 8th Ed, McGraw Hill 2011 USA.
- 11 Waldman S, Terzic A. Farmacología y terapéutica. Principios para la práctica. Editorial El Manual Moderno, México, 2009.
- 12 Katzung B, Master S, Trevor A, Farmacología Básica y Clínica. 12ª edición, McGraw Hill 2013.

- 13 Posadzki P, Watson L, Ernst E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. *Br J Clin Pharmacol* 2013 Mar;75(3) 603-618.
- 14 Zhou S, Hwee-Ling G, Yihuai G, et. al. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. *Life Sciences*; Jan2004; Vol. 74 Issue 8: p935
- 15 Hu Z, Yang X, Ho PC, et. al. Herb-drug interactions: a literature review. *Drugs*. 2005;65(9):1239-82.
- 16 Chen XW, Serag ES, Sneed KB, Liang J, Chew H, Pan SY, Zhou SF. Clinical herbal interactions with conventional drugs: from molecules to maladies. *Curr Med Chem*. 2011;18(31):4836-50.
- 17 Chow SH, Garland L, Hsu CH, et. al. Resveratrol modulates drug and carcinogen metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res*. 2010; 3(9); 1168-1175.
- 18 Agrawal P, Halaweish F, Dwivedi C, Antioxidant Effects and Drug Interactions of Resveratrol Present in Wine. *Journal of Wine Research*. 2007; 18 (2); 59-71.
- 19 Adrian M, Jeandet P. Effects of Resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia*. 2012; 83(8):1345-50
- 20 Baur JA, Sinclair DA, Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5; 493-505.
- 21 Anisimova NY, Kiselevsky MV, Sosnov A, Sadovnikov SV, Stankov IN, Gakh AA, Trans, cis and dihydro-resveratrol: a comparative study. *Chem Cent J*. 2011; 5(1)88.
- 22 Salomon S, Behind the Buzz on Resveratrol. *Env Nutr* 2011; 34-5; 1-6.
- 23 Sanders TH, McMichaels RW Jr, Hendrix KW. Occurrence of Resveratrol in Edible Peanuts. *J Agric Food Chem*. 2000 Apr; 48(4): 1243-6.
- 24 Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R, et al An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem* 2002; 50(3): 431-5
- 25 Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K, Clinical Trials of Resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2011; 1215; 161-169
- 26 Walle T, Bioavailability of Resveratrol. *Ann N.Y. Acad. Sci*. 2011; 1215; 9-15.

- 27 Planas JM, Alfaras I, Colom H, Juan ME. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012
- 28 Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M et. al. Repeat Dose Study of Resveratrol in Healthy Volunteers; Safety, Pharmacokinetics and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis. *Cancer Res* 2010; 15; 9003-9011.
- 29 Ramprasath VR, Jones PJH, Anti-atherogenic effects of Resveratrol. *Eur J Clin Nutr*. 2010; 64; 660-668.
- 30 Gnoni GV, Paglialonga G, Resveratrol inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat hepatocytes. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39 (3); 211-218.
- 31 Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbenederivatives on oxidative stress and NO bioavailability: potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie*. 2012;94(2):269-76
- 32 Ren Y, Li Y, Zhao Y. Effects of resveratrol on lipid metabolism in C57BL/6J mice. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2011 ;40(4):495-7.
- 33 Macarulla MT, Alberdi G, Gómez S, et. al. Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. *J Physiol Biochem*. 2009 ;65(4):369-76.
- 34 Tyagi S, Singh , Sharma A, Aggarwal G, et. al. Clinical and Medical Applications of Resveratrol: A review. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010; 3-1; 49-52.
- 35 Brito P, Almeida LM, Dinis TCP, The interaction of resveratrol with ferrylmyoglobin and peroxynitrite; protections against LDL oxidation. *Free Radical Research*. 2002 36 (6); 621-631.
- 36 Figueira L, El resveratrol: papel en enfermedades cardiovasculares y cancer. *Informed*. 2010; 12(2); 73-83.
- 37 Wong DH, Villanueva JA, Cres AB, et. al. Resveratrol inhibits the mevalonate pathway and potentiates the antiproliferative effects of simvastatin in rat theca-interstitial cells. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1252-8.
- 38 Poppel HV, Tombal B, Chemoprevention of Prostate Cancer with Nutrients and Supplements. *Cancer Management and Research*. 2011; 3; 91-100

- 39 Seeni A, Takahashi S, Takeshita K, et. al. Suppression of prostate cancer growth by resveratrol in the transgenic rat for adenocarcinoma of prostate (TRAP) model. *Asian Pac. J Cancer Prev.* 2008 9(1): 7-14.
- 40 Shenouda NS, Zhou C, Browning J, et. al. Phytoestrogens in Common Herbs Regulate Prostate Cancer Cell Growth in vitro. *Nutrition and Cancer.* 2004; 49(2); 200-208.
- 41 Li F, Gong Q, Dong H, Shi J. Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2012;18(1):27-33
- 42 Davinelli S, Sapere N, Zella D. et. al. Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 386527. Epub 2012 May 28.
- 43 Shah PK, Patel JA, Resveratrol and its Biological Actions. *International Journal of Green Pharmacy.* 2010; 4(1); 15-21
- 44 Mukerjee S, Ray D, Lekli I, et. al. Effects of Longevinex (modified resveratrol) on cardioprotection and its mechanism of action. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 2010; 88; 1017-1025
- 45 Vang O, Ahmad N, Baile C, et. al. What is new for and old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *Plos One.* 2011; 6 (6); e19881
- 46 American Heart Association webpage: <http://www.heart.org/HEARTORG>
- 47 Castelli WP. Making practical sense of clinical trial data in decreasing cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 2001 Aug 16; 16;88(4A):16F-20F
- 48 Trejo-Gutierrez JF, Fletcher G. Impact of exercise on blood lipids and lipoproteins. *J Clin Lipidol.* 2007 Jul;1(3): 175-811
- 49 Ray KK, Cannon CP 2006 Intensive statin therapy for treating acute coronary syndromes. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006 Oct; 15(10):1151-9
- 50 Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study) *Am J. Cardiol* 1998 Mar 1;81 (5):582-7
- 51 Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of Statins: Focus on Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Circulation* 2004 109(suppl III) 50-57

- 52 Patel J, Kritika A, Tiwari R A review on bioavailability and bioequivalence trials and its necessity. International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2010 Vol 2 (3) p. 1-8 ISSN-0975-1491
- 53 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Diario Oficial de la Federación. (20-09-2013)
- 54 World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects (WMA website) Oct 2000 webpage: <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
- 55 Comisión Nacional de Bioética “Código de Nuremberg”. Normas éticas sobre la experimentación en seres humanos.
- 56 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Diario Oficial de la Federación.
- 57 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos , suplemento para establecimientos dedicados a la venta y suministro de medicamentos y demás insumos para la salud. Secretaría de Salud, 4ta edición, Mexico 2010
- 58 Zhang Y. Wang D, Qin F. Determination of simvastatin in human plasma using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Se Pu 2008 May;26(3):327-30.
- 59 Apostolou C. Kousoulos C. Dotsikas Y. et al. An improved and fully validated LC-MS-MS method for the simultaneous quantification of simvastatin and simvastatinic acid in human plasma. J Pharm Biomed Anal. 2008 Mar 13;46(4):771-9.
- 60 Skoog D. Holler J, Crouch, S Principios de análisis Instrumental. Cengage Learning, 6ta edición, México 2011.
- 61 Schuirmann D, A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. J Pharmacokinetics and Biopharmaceutics; 1987, 715:657-680.
- 62 Westlake W. Symmetrical confidence intervals for bioequivalence trials. Biometrics. 1976; 32:741-744.
- 63 Bolton S. Pharmaceutical statistics. Practical and clinical applications. 3rd edition Marcel Dekker Inc. New York USA 1997; 355-443.

- 64 Smeraglia, J, BaldreyS, Watson D, Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia*, 2002. 55(1): p. S95-S99.
- 65 National Institutes of Health. Clinical Trials [homepage en internet] US National Library of Medicine. c1993 [actualizada 26 Noviembre 2012; consultado Octubre 2014]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/>
- 66 Desager JP, Horsmans Y. Clinical pharmacokinetics of 3-hydroxy-3-methylglutaril-coenzyme a reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*. 1996 nov;31(5):348-71.
- 67 Jang SB, Lee YJ Lim LA, Park KM et al Pharmacokinetic comparison of controlled-release and immediate-release oral formulations of simvastatin in healthy korean subjects: a randomized, open label, parallel group, single and multiple-dose study. *Clin Ther* 2010. Jan;32(1): 206-16
- 68 Detampel P, Beck M, et al Drug interaction potential of resveratrol. *Drug Metabolism Reviews*, 2012; 44(3): 253-265.
- 69 Zhao Q, Jiang J, Hu P. Effects of four traditional Chinese medicines on the pharmacokinetics of Simvastatin. *Xenobiotica*. 2015 Mar 24:1-8.
- 70 Haneke K, Toxicological Summary for trans-Resveratrol. *Rev Tox Lit*. 2002; 501-36-0
- 71 Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, et al. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:E1–E8.
- 72 Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, et al. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. 2011;106:383–389

GLOSARIO

Biodisponibilidad. Proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de su administración y el tiempo en que lo hace.

Bioequivalencia. Relación entre dos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuando al ser administrados bajo condiciones similares producen biodisponibilidades semejantes.

Cápsula. Tipo de presentación farmacéutica que consiste en pequeños contenedores o envases solubles a base de gelatina, en cuyo interior se halla la sustancia activa que se administrará por vía oral.

Consentimiento informado. Acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

Control de calidad. Sistema de actividades operacionales rutinarias puestas en el lugar donde se desarrollan los procesos para identificar y corregir las desviaciones de los requisitos establecidos.

Corrida analítica. Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.

Curva de calibración. Conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.

Denominación Común Internacional. Nombre que identifica una sustancia farmacéutica o principio activo farmacéutico mediante un nombre único que es reconocido a nivel mundial y es de dominio público.

Denominación distintiva. Nombre que como marca comercial le asigna el laboratorio o fabricante a sus especialidades farmacéuticas con el fin de distinguirlas de otras similares, previa aprobación de la autoridad sanitaria y registro ante las autoridades competentes.

Denominación genérica. Nombre del medicamento, determinado a través de un método preestablecido, que identifica al fármaco o sustancia activa reconocido internacionalmente y aceptado por la autoridad sanitaria.

Efecto de acarreo. Efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito causado por la contaminación de muestras anteriores.

Equivalente farmacéutico. Especialidad farmacéutica con el mismo fármaco y la misma forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que utiliza la misma vía de administración y cumple con las especificaciones farmacopeicas u otros estándares internacionales. Los aditivos pueden ser diferentes que los del medicamento de referencia.

Estabilidad a largo plazo. Propiedad del compuesto por analizar en una matriz biológica, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras así como reanálisis (en caso de ser necesario).

Exactitud. Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Fármaco. Toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica, y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenten en forma farmacéutica y que reúna las condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento

Farmacocinética. Procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación que sufre un xenobiótico después de su administración en un sistema biológico.

Farmacodinamia. El estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos sobre un sistema biológico. También denominado el mecanismo de acción.

Fitoterapéutico. Es el producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos.

Herbolaria. Tipo de medicina alternativa que usa plantas, ya sea enteras, sus hojas, sus frutos o extractos de ellas como remedios terapéuticos.

Interacción farmacológica. La alteración en la farmacocinética o farmacodinamia de un medicamento ocasionada por la administración concomitante con otro medicamento.

Intervalo de trabajo. Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Linealidad. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.

Límite inferior de cuantificación. Concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.

Límite superior de cuantificación. Concentración más alta del analito que puede medirse con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.

Lote. Cantidad de un fármaco o un medicamento, que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es su homogeneidad.

Material de referencia. Material o sustancia, en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos, para ser utilizados para calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición o para asignar valores a materiales.

Matriz biológica. Material de origen biológico en el cual se encuentra el analito o fármaco de interés.

Medicamento de prueba. Medicamento proveniente de un lote de producción o de un tamaño no menor al 10% del mismo cuando éste sea mayor a 100,000 unidades, manteniendo el equipo y el proceso de manufactura y que cumpla con los estándares de calidad oficiales establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Medicamento de referencia. Medicamento indicado por la Secretaría como tal, que cuenta con el registro de dicha dependencia, que se encuentra disponible comercialmente y es seleccionado conforme a los criterios establecidos en las normas.

Muestras control. Muestras de matriz adicionada con el analito en concentración específica usada para validar y monitorear el desempeño de un método analítico.

Muestra control baja. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración equivalente hasta 3 veces el límite inferior de cuantificación.

Muestra de control media. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración intermedia entre la muestra de control baja y la muestra de control alta.

Muestra de control alta. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración entre el 75-85% de la concentración del límite superior de cuantificación.

Muestra control diluida. Muestra de la matriz adicionada de analito en concentración mayor al límite superior de cuantificación de la curva de calibración, que se diluye con matriz exenta del analito a una concentración dentro del intervalo de la curva de calibración.

Precisión. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Productos bioequivalentes. Equivalentes farmacéuticos en los cuales no se observa diferencia significativa en la velocidad y cantidad absorbida del fármaco, cuando son administrados ya sea en dosis única o dosis múltiple bajo condiciones experimentales similares.

Reacción adversa. Cualquier efecto perjudicial y no deseado que se presenta a las dosis empleadas en el hombre para la profilaxis, el diagnóstico, la terapéutica o la modificación de la función fisiológica.

Repetibilidad. Precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.

Reproducibilidad. Precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

Selectividad. Capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.

Sujeto de investigación. Sujeto sano o paciente de investigación que haya expresado libremente y por escrito su consentimiento informado para participar en el estudio.

Verificación del Sistema. Verificación de que el sistema analítico opera con base en criterios preestablecidos, que permiten asegurar su desempeño óptimo. }

Vida Media. El tiempo que le toma a un sistema biológico en eliminar la mitad de la concentración de un compuesto.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Pedro Lennon Sáenz Chávez

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con orientación en **Farmacología y Toxicología**

Tesis: **EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE RESVERATROL SOBRE
EL PERFIL FARMACOCINETICO DE LA SIMVASTATINA**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Biografía:

Nacido el 24 de Diciembre de 1980 en la ciudad de Monterrey, Nuevo León. Hijo de Pedro Francisco Sáenz y María Guadalupe Chávez

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2005, grado obtenido Médico Cirujano y Partero, con mención honorífica, tercer lugar de la generación.

Egresado del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey en 2011, grado obtenido Especialista en Pediatría.

Experiencia Profesional:

Profesor de tiempo completo en la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2011.