



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

***Herramientas farmacométricas para antichagásicos,
aplicadas a estudios farmacológico y toxicocinéticos en
contexto pediátrico***

Trabajo de Tesis Doctoral

Tesista: MARSON, MARIA ELENA

Director: MASTRANTONIO, GUIDO

Codirector: GARCIA BOURNISSEN, FACUNDO

Año 2016

Índice de contenidos

1. Introducción

- 1.1 Introducción general
- 1.2 Enfermedad de Chagas: 1.2.1. Reseña Histórica
 - 1.2.2. Situación Actual en la Argentina
 - 1.2.3. Agente etiológico: 1.2.3.1. Generalidades
 - 1.2.3.2. Etapas del desarrollo, morfología y organización estructural
 - 1.2.3.3. Ciclo de vida del parásito
 - 1.2.4. Transmisión de la Enfermedad de Chagas
 - 1.2.4.1. Transmisión vectorial
 - 1.2.4.2. Transmisión por hemotransfusión
 - 1.2.4.3. Transmisión transplacentaria
 - 1.2.4.4. Transmisión por trasplante de órganos
 - 1.2.4.5. Transmisión alimentaria o vía oral
- 1.3. Diagnóstico y terapéutica de la enfermedad
 - 1.3.1. Bioquímica del *T. cruzi*: Blancos de acción
 - 1.3.2. Definición de droga ideal
 - 1.3.3. Reseña histórica de los compuestos utilizados
 - 1.3.4. Drogas utilizadas en la actualidad
 - 1.3.4.1. La terapéutica en la Argentina: Protocolos vigentes.
 - 1.3.4.2. Tratamiento etiológico tripanocida
 - 1.3.4.3. Disponibilidad de los fármacos y consideraciones sobre la terapéutica tripanocida
 - 1.3.4.4. Eventos adversos
 - 1.3.5. Nuevas drogas evaluadas clínicamente
 - 1.3.5.1. Reposicionamiento de fármacos
- 1.4. Mecanismos de acción tóxica y farmacológica de nitrocompuestos
 - 1.4.1. Generalidades. Radicales libres y estrés oxidativo
 - 1.4.2. Biotransformación de nitrocompuestos
 - 1.4.2.1. Enzimas metabolizadoras
 - 1.4.2.1.1. Enzimas microsomales
 - 1.4.2.1.2. Enzimas citosólicas
 - 1.4.3. Mecanismos de defensa contra las especies reactivas de oxígeno
 - 1.4.3.1. Mecanismos enzimáticos
 - 1.4.3.2. Mecanismos no enzimáticos
 - 1.4.4. Interacciones entre intermediarios reactivos y macromoléculas

- 1.4.4.1. Tipos de interacciones
- 1.4.4.2. Daño celular
- 1.5. Mecanismos de acción tóxica del NFX y del BZN
 - 1.5.1. Enzimas involucradas
 - 1.5.2. Nifurtimox: Mecanismos de acción tripanomicida
 - 1.5.3. Benznidazol: Mecanismos de acción tripanomicida
- 1.6. Fundamentos del uso de técnicas electroquímicas
 - 1.6.1. Definiciones sobre electroquímica
 - 1.6.2. Usos de la electroquímica
- 1.7. Síntesis y contexto del trabajo de tesis

2. Objetivos

- 2.1. Objetivo general
 - 2.1.1. Objetivos específicos

3. Materiales y Métodos

- 3.1. Matrices biológicas estudiadas
 - 3.1.1. Plasma humano
 - 3.1.1.1. Composición y características
 - 3.1.1.2. Criterios de selección de pacientes y obtención de muestras
 - 3.1.2. Orina humana
 - 3.1.2.1. Composición y características
 - 3.1.2.2. Criterios de selección de pacientes y obtención de muestras
 - 3.1.3. Leche materna humana
 - 3.1.3.1. Composición y características
 - 3.1.3.2. Criterios de selección de pacientes y obtención de muestras
 - 3.1.4. Sangre entera en papel de filtro
 - 3.1.4.1. Composición y características
 - 3.1.4.2. Criterios de selección de pacientes y obtención de muestras
- 3.2. Determinaciones realizadas
 - 3.2.1. Dosajes de BZN
 - 3.2.1.1. Evolución en el desarrollo de Método de extracción y cuantificación en plasma por HPLC
 - 3.2.1.2. Validación del método
 - 3.2.1.3. Modelo de Farmacocinética Poblacional (POPPK)
 - 3.2.1.4. Evolución en el desarrollo de Método de extracción y cuantificación en orina por HPLC
 - 3.2.1.5. Validación del método
 - 3.2.1.6. Evolución en el desarrollo de Método de extracción y cuantificación en leche por HPLC
 - 3.2.1.7. Ensayo de Robustez
 - 3.2.1.8. Validación del método de extracción de BZN en leche materna
 - 3.2.1.9. Exploración sobre métodos para la extracción en sangre entera recolectada en papel de filtro

- 3.2.2. Búsqueda de metabolitos del BZN
 - 3.2.2.1 Identificación de compuestos derivados del BZN en plasma humano por espectrometría de masas
 - 3.2.2.2. N-bencilacetamida (NBAA)
 - 3.2.2.2.1. Síntesis química del compuesto: Reacción de N-acetilación
 - 3.2.2.3. Identificación de compuestos derivados del BZN en orina humana mediante reacción enzimática y espectrometría de masas
 - 3.2.3. Amino-BZN: Ensayos preliminares de síntesis electroquímica
 - 3.2.4. N-hidroxi-amino-BZN
 - 3.2.5. Dosajes de NFX
 - 3.2.5.1. Desarrollo de Método de extracción y cuantificación en plasma humano por HPLC
 - 3.2.5.2. Validación del método de extracción de NFX en plasma
 - 3.2.5.3. Evaluación de técnica de filtrado para la extracción y cuantificación de NFX en leche materna humana por HPLC
 - 3.2.5.4. Validación del método de extracción de NFX en leche

4. Resultados

- 4.1. Tratamiento de datos
- 4.2. De los dosajes de BZN y derivados en plasma humano
 - 4.2.1. Sobre el desarrollo de Método de extracción y cuantificación en plasma por HPLC
 - 4.2.1.1 análisis de las variantes de extracción para BNZ en plasma
 - 4.2.1.2. Optimización de la técnica seleccionada para extracción de BNZ en plasma
 - 4.2.1.3. Validación de método de extracción de BNZ de plasma
 - 4.2.2. Dosajes de BZN en plasma humano
 - 4.2.3. Parámetros farmacocinéticos
 - 4.2.4. Parámetros clínicos y farmacológicos
 - 4.2.5. Identificación de la NBAA como metabolito plasmático del BZN
 - 4.2.5.1. Síntesis y caracterización de la NBAA
- 4.3. De los dosajes de BZN y derivados en orina humana
 - 4.3.1. Sobre el desarrollo de Método de extracción y cuantificación de BZN en orina humana por HPLC
 - 4.3.2. Validación del método de extracción de BZN en orina de 24hs
 - 4.3.3. Dosajes de BNZ en orina de 24hs de muestras reales
 - 4.3.4. Identificación de metabolitos urinarios del BZN
- 4.4. Resultados preliminares de la síntesis electroquímica de amino-BZN
- 4.5. De los dosajes de BZN en leche materna humana
 - 4.5.1. Análisis de las variantes de extracción para BZN en leche materna
 - 4.5.2. Optimización de la técnica para extracción de BZN en leche

- 4.5.3. Validación del método de extracción de BZN en leche
- 4.6. Estimaciones clínicas, farmacocinéticas y farmacológicas de los dosajes de BZN en leche materna y su correlato en plasma
- 4.7 De los dosajes de NFX en plasma y leche materna humana
 - 4.7.1. Análisis de las metodologías para extracción de NFX en plasma
 - 4.7.2. Validación del método de extracción de NFX en plasma heparinizado
 - 4.7.3. Dosajes de muestras de plasma NFX
 - 4.7.4. Optimización de técnica para la extracción de NFX en leche
 - 4.7.5. Validación del método de extracción de NFX en leche materna
 - 4.7.6. Dosajes de NFX en muestras de leche materna

5. Discusión

5.1. BZN

5.1.1. Consideraciones clínicas y farmacológicas de los desarrollos analíticos en las matrices biológicas estudiadas

5.1.1.1. Plasma

5.1.1.1.1. De los dosajes de BZN en el contexto del estudio de farmacocinética poblacional (POPPK)

5.1.1.2. Orina

5.1.1.3. Leche materna

5.1.1.3.1. Sobre los dosajes de BZN en leche materna

5.1.2. Consideraciones sobre la búsqueda de metabolitos del BZN

5.1.3. Ensayos enzimáticos para el estudio del metabolismo de fármacos

5.1.4. Consideraciones farmacológicas y toxicológicas de los resultados

5.2. NFX

5.2.1. Consideraciones clínicas y farmacológicas de los desarrollos analíticos en las matrices biológicas estudiadas

5.2.1.1. Plasma

5.2.1.2. Dosajes de NFX en leche materna

5.3. Síntesis de las herramientas farmacométricas desarrolladas

5.4. Aportes para las terapéuticas vigentes en pediatría

6. Conclusiones:

6.1. Conclusiones generales

6.2. Hipótesis derivadas de los estudios

6.3. Aporte para el abordaje racional de la terapéutica del Chagas pediátrico

7. Anexos:

7.1. Anexo I. Tratamiento estadístico de datos

7.2. Drogas, reactivos y equipos utilizados

7.3. Protocolos, consentimiento informado y avales

La tripanosomiasis humana americana o Enfermedad de Chagas es causada por un protozoo, el *Trypanosoma cruzi*; se transmite a los hombres fundamentalmente a través de la picadura de triatominos infectados, mediante transfusiones de sangre de un individuo infectado o a través de la madre infectada al hijo, entre otras vías.

Hay 100 millones de personas con riesgo de contraerla, la inmensa mayoría de ellos viven en la franja del continente americano que se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta Tierra del Fuego.¹

En pocas ocasiones la persona infectada presenta síntomas al principio de la infección. Alrededor de un tercio de los infectados desarrollan la enfermedad crónica que se caracteriza por alteraciones cardíacas y/o digestivas que deterioran la calidad de vida y pueden producir la muerte del paciente. En muchos casos la persona muere sin saber qué es lo que realmente le ocurrió.

El Chagas es una enfermedad silenciosa pero en absoluto desconocida. Existe una activa investigación alrededor del insecto transmisor, las formas de controlarlo y el estudio de su hábitat. Se conoce su etiología, sus formas de transmisión, su clínica, la forma de diagnosticarla, cómo tratarla en algunas fases de su evolución, las limitaciones de los actuales fármacos empleados en su tratamiento y el impacto económico y social que tiene entre la población latinoamericana. El Banco Mundial ha calculado la pérdida anual debido a la Enfermedad de Chagas en 2.740.000 AVAC (Años de Vida Ajustados por Discapacidad), lo que representa una pérdida económica para los países endémicos de América Latina equivalente a más de 6.500 millones de USD al año.²

Se dedican recursos para controlar la transmisión, especialmente la que se produce a través de sangre infectada y por la picadura del insecto vector. También se han puesto en marcha iniciativas latinoamericanas conjuntas para frenar esta transmisión. Actualmente todos los países de Centroamérica y Sudamérica están integrados en alguna de las tres iniciativas existentes: iniciativa del cono sur, de países andinos y de países

¹ Uranga N, Herranz E. Chagas: enfermedad silenciosa y silenciada. Médicos Sin Fronteras. Marzo 2003.

² Schofield CJ, Dias JCP 1999. The Southern Cone programme against Chagas disease. *Adv Parasitol* 42:1-25.

centroamericanos. Estas iniciativas han demostrado ser costo-efectivas; por ejemplo, entre 1975 y 1995 se estima que por cada dólar invertido en dichos programas se ahorran 7,16 USD.³

El beneficio que tendrá para la población el control de la transmisión es enorme puesto que evitará nuevas infecciones con todo lo que ello significa para el bienestar de las personas. Sin embargo, sin restar importancia a este hecho, ¿qué ocurre con las personas que ya se han infectado? Prevenir es importante pero no lo es menos tratar a los que no han llegado a tiempo a beneficiarse de esta prevención.

El tratamiento de las personas infectadas por *T. cruzi* ha demostrado ser eficaz en casos de infección aguda en todos los grupos de edad, en fase aguda e indeterminada en niños en edad escolar y en la transmisión congénita. Esto está recomendado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1999.

La recomendación de la OMS pone en evidencia la importancia de iniciar el tratamiento con los medicamentos existentes al comienzo de la infección. En éste sentido, el primer obstáculo para tratar a todas las personas infectadas es que no se sabe que lo están. No se conoce en el momento actual la cifra real de personas infectadas y sólo hay aproximaciones (en algunos casos contradictorias) según la fuente de información. El curso asintomático que sigue esta infección en sus primeras fases dificulta sin duda el diagnóstico, sin embargo, esta dificultad puede superarse buscando activamente la infección ya que se dispone de medios diagnósticos para encontrarla y ni su precio ni su disponibilidad suponen un problema actualmente.

No obstante, las condiciones para la transmisión vectorial se ven favorecidas en poblaciones que habitan en viviendas precarias y con pobres condiciones higiénico-sanitarias, lo que nos obliga a definir a esta enfermedad como íntimamente ligada a la pobreza. Sumado a esto, dichas poblaciones, no tienen un acceso periódico a control clínico en los sistemas de salud, desconocen cómo se adquiere la enfermedad o qué posibilidades de curación tienen.

Los dos únicos fármacos disponibles en la actualidad para tratar a estos pacientes, el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BNZ), han tenido durante mucho tiempo una única presentación farmacéutica, que difícilmente se adaptan a las dosis requeridas por los niños. Si bien al momento existen al menos dos iniciativas de desarrollo de formulaciones pediátricas, ninguna está en etapas de comercialización. El laboratorio

³ Akhavan, D. 1998. Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil. Brasília: Pan American Health Organization.

Estatal LAFEPE (Pernambuco, Brasil) desarrolló una formulación pediátrica de BZN y el laboratorio Elea (Argentina), está en etapas de desarrollo de comprimidos pediátricos. Para el caso del NFX, Bayer está estudiando la biodisponibilidad de un comprimido pediátrico dispersable, por lo que es esperable que a corto plazo esté disponible.

Sin embargo, en muchos países del continente estos fármacos no están incluidos en las Listas Nacionales de Medicamentos Esenciales (LNME) a pesar de ser una enfermedad endémica en los países de América Latina y de estar incluidos ambos en la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS. En muchos otros países centroamericanos y andinos directamente no están registrados. Por ejemplo, el BNZ se incluye como medicamento de primera elección para el tratamiento en los protocolos de los países de Centro América y no se encuentra registrado ni comercializado en ninguno de ellos. En esta región el NFX solo está registrado en Guatemala y en Honduras.

La mayoría de los países dedican escasos o nulos presupuestos a la compra de los mismos y muchas veces el 100% del presupuesto para la Enfermedad de Chagas va dirigido a los Programas de Control Vectorial y no hay presupuesto para Programas de Tratamiento. En la mayoría de los países centroamericanos y andinos, la dotación de los medicamentos o el tratamiento se produce por medio de esfuerzos individuales, discontinuos y esporádicos.

El hecho de estar incluidos en la LNME exige a las autoridades sanitarias del país, según la definición de la propia OMS, que los medicamentos estén disponibles dónde se necesiten, cuándo se necesiten y en las cantidades y forma farmacéutica adecuadas. Si no están incluidos en esta lista, la responsabilidad desaparece. El hecho de estar registrados en el país implica un reconocimiento de la utilidad de los fármacos para la población de dicho país por parte de las autoridades sanitarias competentes y la activación del sistema de farmacovigilancia. La ausencia de este registro, además de limitar el mercado, supone un desentendimiento del fármaco y sus efectos por parte de las autoridades sanitarias.

En su momento, el subtratamiento de los infectados dio como resultado una baja demanda de ambos medicamentos y tuvo un efecto negativo en la producción y los precios fijados por parte de las dos únicas empresas farmacéuticas que los producían: Bayer el NFX y Roche el BNZ. Al día de hoy, las diferencias de precios son muy llamativas. Por ejemplo, en Bolivia el mismo tratamiento con el BNZ de Roche cuesta 21 veces más que en Brasil. Es notoria y sintomática la no correspondencia entre el precio del tratamiento y el poder adquisitivo del país comprador.

Recientemente, desde fines de 2011 se ha avanzado en etapas de producción de BNZ por parte de los laboratorios LAFEPE (Brasil, estatal) y Elea (Argentina), pero son muchas las vacancias vigentes en la terapéutica. En el momento en que este trabajo de tesis iniciaba, la información disponible de estas drogas en humanos era rudimentaria en el mejor de los casos y virtualmente inexistente en poblaciones especiales como niños, ancianos y mujeres embarazadas. Había escasos datos de estudios en pacientes pediátricos.⁴ Como ejemplo, no existía –hasta este trabajo– información proveniente de estudios clínicos para evaluar la transferencia de BNZ o de NFX a la leche materna, considerándose no recomendado el tratamiento de la Enfermedad de Chagas en mujeres que amantan. En otros fármacos, en los que esta información es esencial para ampliar el mercado de pacientes bajo prospecto, los estudios pertinentes son rápidamente resueltos.

Todo lo anteriormente expuesto contribuye a que las personas que se infectan con el *T. cruzi* sean pacientes olvidados y a que la Enfermedad de Chagas sea una enfermedad, además de silenciosa, silenciada. Romper el círculo vicioso que se ha creado alrededor de la enfermedad es una responsabilidad de todos los que cuentan con herramientas para corregir la actual situación: los gobiernos latinoamericanos, organismos internacionales de Salud y en nuestro caso, los organismos nacionales de ciencia y tecnología.

1.2. ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.2.1. RESEÑA HISTÓRICA

El descubrimiento de la enfermedad se produce en medio de una campaña antimalárica en Lassance, Brasil, entre 1906 y 1909 donde se encontraron insectos hematófagos en viviendas precarias de la zona afectada. Al profundizar el estudio de estos insectos, el médico Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas encuentra la presencia de un parásito flagelado en su intestino, iniciando así una serie de estudios en animales de laboratorio para su caracterización en el Instituto Oswaldo Cruz.⁵ Determinaron que se trataba de una especie de tripanosoma, que infectaba a las especies animales estudiadas, y comprobaron además, la infección en varios niños de la zona. Chagas denominó al nuevo flagelado como *T. cruzi*, en honor a su maestro Oswaldo Cruz. La existencia de esta nueva tripanosomiasis del hombre fue totalmente caracterizada por Chagas en estudios sucesivos, describiendo las etapas aguda y crónica de la enfermedad con compromiso cardíaco y nervioso, y reconociendo a algunos

⁴ Garcia-Bournissen, F; Altcheh, J; Della Védova, CO; Giglio, N; Mastrantonio, G; Koren, G. Pediatric clinical pharmacology studies in Chagas disease: focus on Argentina. *Paediatr. Drugs* 11, 33-37 (2009)

⁵ Sierra Iglesias, J; Storino, R; Rigor, D. Capítulo 2: “Antecedentes Históricos”. En: Enfermedad de Chagas. Storino, R; Milei, J (Eds). Doyma Argentina, p 9-29, 1994.

animales silvestres como los reservorios naturales de la enfermedad.³ En 1917 comienza una etapa de descrédito hacia las investigaciones de Chagas, donde se niega la capacidad patógena del parásito y la significación epidemiológica de la enfermedad, basada en la falta de signos o síntomas clínicos en los enfermos crónicos.

Los dos primeros casos agudos en Argentina se detectan en 1924. A partir de 1926 Salvador Mazza se convierte en el principal investigador de la enfermedad en nuestro país y, por medio de la M.E.P.R.A. (Misión de Estudios de Patología Regional Argentina, San Salvador de Jujuy), lleva a cabo un estudio sanitario completo en el norte de la región.⁵ En 1934 fallece Chagas y Mazza comunica el hallazgo de varios casos de enfermedad en el Chaco Argentino, región estudiada con anterioridad y que había puesto en duda las investigaciones del primero. Se revalorizan así los hallazgos del mismo y se logra un renacimiento en el estudio de la enfermedad.³ La labor de Mazza entre los años 1928 y 1945, aportó información invaluable relacionada con esta tripanosomiasis, que se puede resumir en: la descripción de la infección de animales silvestres y domésticos; la infestación de *Triatoma infestans* en domicilios y peridomicilio; la descripción de varias especies de triatomos portadores del parásito; la detección de casos clínicos agudos detallando sintomatología asociada; el diagnóstico de formas crónicas y la descripción histopatológica de las principales localizaciones de la enfermedad. Además, intervino en la evaluación de métodos diagnósticos como el xenodiano* y en ensayos terapéuticos con diversas sustancias.³

Entre los colaboradores de Mazza se destacaron Cecilio Romaña y Miguel E. Jörg. Los resultados acuñados por ellos refieren a la descripción en 1932 de los primeros casos de miocarditis chagásica crónica en el Chaco argentino y, en 1935, el síndrome de puerta de entrada ocular en el hombre, de importancia fundamental en el diagnóstico agudo de la enfermedad y que en la actualidad lleva el nombre de Signo de Romaña. Se mejoró el diagnóstico serológico, el xenodiagnóstico, el diagnóstico de la etapa crónica y el estudio del ciclo del *T. cruzi* en sangre y en tejidos. También confirmaron la posibilidad de transmisión congénita y la existencia de síndromes megaviscerales en la etapa crónica. Clasificaron y dividieron a la enfermedad en tres períodos y demostraron las formaciones tumorales inflamatorias de la tripanosomiasis inicial, conocidas como chagomas.* Probaron además, la ausencia de toxinas en el tripanosoma, que se consideraban relacionadas con la lesión cardíaca. Estudiaron la participación encefalopática, realizando numerosos aportes respecto a la forma nerviosa de la enfermedad. Se propuso la modificación del biotopo* domiciliario para la erradicación de la vinchuca y demostraron que, en pequeña proporción, la vinchuca puede transmitir la enfermedad por picadura.³

1.2.2. SITUACIÓN ACTUAL EN ARGENTINA

En Argentina se calcula que más de un millón y medio de personas tienen Chagas, o sea un 4% de la población del país⁶. Sin dudas, es uno de los principales problemas de salud pública. Hay personas con Chagas en todo el territorio debido a que además de la transmisión vectorial, las migraciones humanas y la existencia de otras vías de transmisión distribuyen la enfermedad.

Las últimas estimaciones⁷ indican que en América Latina 10 millones de personas se encuentran infectadas. En Argentina, hay 1.600.000 de personas infectadas y más de 300.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico. La seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en embarazadas en el país fue de 6,8 % en 2000 y de 4,2% en 2009. En base a estos datos, se estima que cada año nacen 1.300 niños infectados por transmisión congénita. Cabe consignar que 9 de 10 niños tratados en fase aguda y 7 de 10 tratados en fase crónica se curan. La prevalencia media de infección por *T. cruzi* en niños menores de 14 años fue de 1,5% en 2009.

Respecto a la transmisión vectorial, en Argentina las provincias se clasifican en alto, mediano y bajo riesgo de transmisión del parásito. También hay algunas zonas denominadas sin riesgo debido a la magnitud del número de vectores existentes. Sin embargo, las 24 jurisdicciones poseen riesgo de transmisión congénita derivado de las migraciones internas e internacionales de países vecinos con elevada endemividad.

1.2.3. AGENTE ETIOLÓGICO

1.2.3.1. GENERALIDADES

El *T. cruzi* es un parásito protozoario que alterna, durante su ciclo de vida natural, entre un huésped vertebrado y otro invertebrado. La clasificación sistemática del *T. cruzi*, se muestra en la **Figura 1.2.3.1.**⁸

Todos los miembros del orden *Kinetoplastida* están caracterizados por la presencia de una organela especializada que contiene ADN, el cinetoplasto.* Entre ellos, se reconocen varios géneros que incluyen tripanosomas de vida libre (*Proleptomonas spp.*), parásitos de invertebrados solamente (*Crithidia spp.* y *Leptomonas spp.*, entre otros), parásitos de plantas

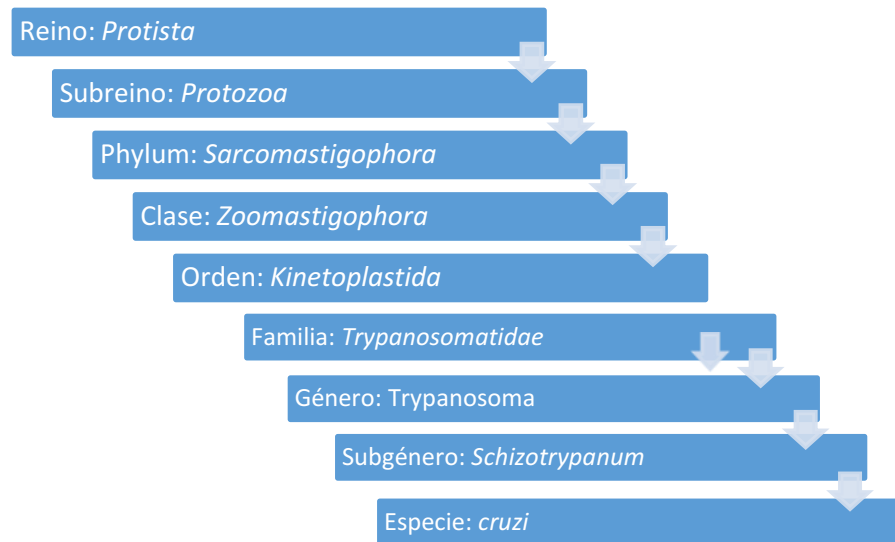
⁶ Informe Epidemiológico Min. Salud de la Nación, 2013

⁷ Organización Panamericana de la Salud, 2009

⁸ Hickman C, Roberts L, Parson A. Capítulo 12: "Los protistas con rasgos animales". En: Principios integrales de zoología. McGraw Hill Interamericana, España, p 224-39, 1998

e invertebrados (*Phytomonas spp.*) y parásitos de vertebrados e invertebrados (*Trypanosoma spp.* y *Leishmania spp.*).⁹

Figura 1.2.3.1. Clasificación sistemática del *T. cruzi*.



Los tripanosomátidos son generalmente polimórficos, ya que pueden adoptar diferentes formas en su ciclo vital en el hospedador definitivo y se multiplican por división simple longitudinal. Las especies representativas del género son *T. brucei* y *T. cruzi*. A pesar de las similitudes que poseen, pertenecen a subgéneros diferentes y, por lo tanto, tienen aspectos biológicos particulares (**Tabla 1.2.3.1.1**). Además, se pueden dividir en tres grupos biológicos de acuerdo al tipo de inoculación del parásito: por contaminación, por picadura y/o en forma mecánica.¹⁰

Las poblaciones de *T. cruzi* no son homogéneas. Están compuestas por una mezcla de cepas que circulan tanto en el ciclo domiciliario de la enfermedad como en el selvático, involucrando a seres humanos, vectores y reservorios animales del parásito.¹¹

⁹ Cevallos AM, Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Publicación digital de la Dirección General de Servicios de Cómputo Académico. Universidad Nacional Autónoma de México.

¹⁰ Ageitos de Castellanos Z, Lopretto E. "Los invertebrados". Los protistas de filiación animal. Tomo 1. Ed. Universitaria Buenos Aires (EUDEBA), p 122-32, 1983

¹¹ Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. En: Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Raíz A. (Eds.). ISBT Bazil'92, Sao Paulo, Brazil (<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter3.html>)

El ingreso de los tripanosomas en las células conduce a modificaciones en las mismas, determinando su hipertrofia, la proliferación de los núcleos y aún la formación de una membrana gruesa. La baja capacidad de resistencia del huésped y sus medios de defensa incompletamente eficaces, más las condiciones de resistencia del parásito, pueden conducir a la cronicidad de la infección y a un estado en que los parásitos siempre están en condición de proliferar de nuevo, determinando una recidiva, y el huésped en estado de resistir con éxito nuevas infecciones.¹²

Tabla 1.2.3.1.1. Características biológicas de los tripanosomas

| | <i>T. cruzi</i> | <i>T. brucei gambiense</i> <i>T. brucei rhodesiense</i> |
|------------------|--|--|
| Inoculación | Heces contaminadas | Picadura |
| Insecto Vector | <i>Triatoma, Panstrogylus</i> <i>Rhodnius</i> | Glossina |
| Enfermedad | Enfermedad de Chagas | Enfermedad del sueño |
| Ámbito ecológico | América | África |

1.2.3.2. ETAPAS DEL DESARROLLO, MORFOLOGÍA Y ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL

El *T. cruzi* se halla en tres estados morfológicamente diferentes que reflejan su adaptación a los distintos hábitats por los que pasa durante su ciclo evolutivo. Las distintas formas se distinguen entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o no de una membrana ondulante (**Figura 1.2.3.2.1**).¹⁰ Se pueden clasificar de la siguiente manera:

Tripomastigote: Tiene el cinetoplasto ubicado posterior al núcleo y un flagelo que sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante que emerge en el extremo anterior. Representa una forma infecciosa no multiplicativa. Aparece en la luz del recto del insecto vector y es infeccioso para los mamíferos. También se encuentra en el mamífero huésped, donde transmite la infección de una célula a otra o la inicia en el vector cuando es ingerido con la sangre.¹³

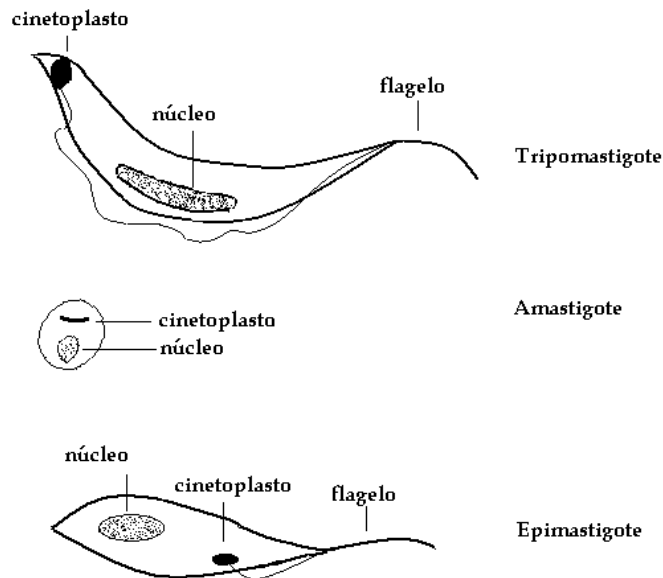
Amastigote: Es de forma esférica u ovalada, carece de flagelo libre. Representa una de las formas proliferativas intracelular en el mamífero huésped.

¹² Canal-Feijóo EJ. Introducción al estudio del agente productor de la Enfermedad de Chagas-Mazza. *Revista de la facultad de medicina de Tucumán*: 209-26, 1961

¹³ Alarcón Segovia S, Andrade ZA, Bloom BR, Estrada Parra S, Goodman HC, Hanson WL, et al. Inmunología de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de la oficina sanitaria panamericana* 80(marzo):235-53, 1976

Epimastigote: tiene el cinetoplasto ubicado en la parte media del parásito, por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio se desarrolla en el tubo digestivo del vector y constituye otra de las formas proliferativas del *T. cruzi*.

Figura 1.2.3.2.1. Estados morfológicos del *T. cruzi*



El *T. cruzi* se caracteriza por la presencia de un flagelo y un único mitocondrion tubular, que recorre todo su cuerpo. Este mitocondrion presenta propiedades similares a las mitocondrias de células mamíferas, tales como la presencia de ADN, crestas y algunas enzimas en su membrana interior. En él se sitúa el cinetoplasto, una red fibrosa de ADN denominada k-ADN que constituye el 20-25 % del ADN total del parásito y que está envuelta en la doble membrana mitocondrial. El tamaño y forma del mismo varía en las distintas etapas del desarrollo.¹¹

El flagelo que posee el parásito nace del cuerpo basal o cinetosoma,* situado cerca de la envoltura mitocondrial del cinetoplasto y emerge de una invaginación especializada (bolsillo flagelar). Otra característica de los tripanosomas es la presencia de microtúbulos subpeliculares organizados como un citoesqueleto, que tienen además un rol en otras funciones complejas tales como el proceso de diferenciación celular, motilidad y migración tisular.¹¹

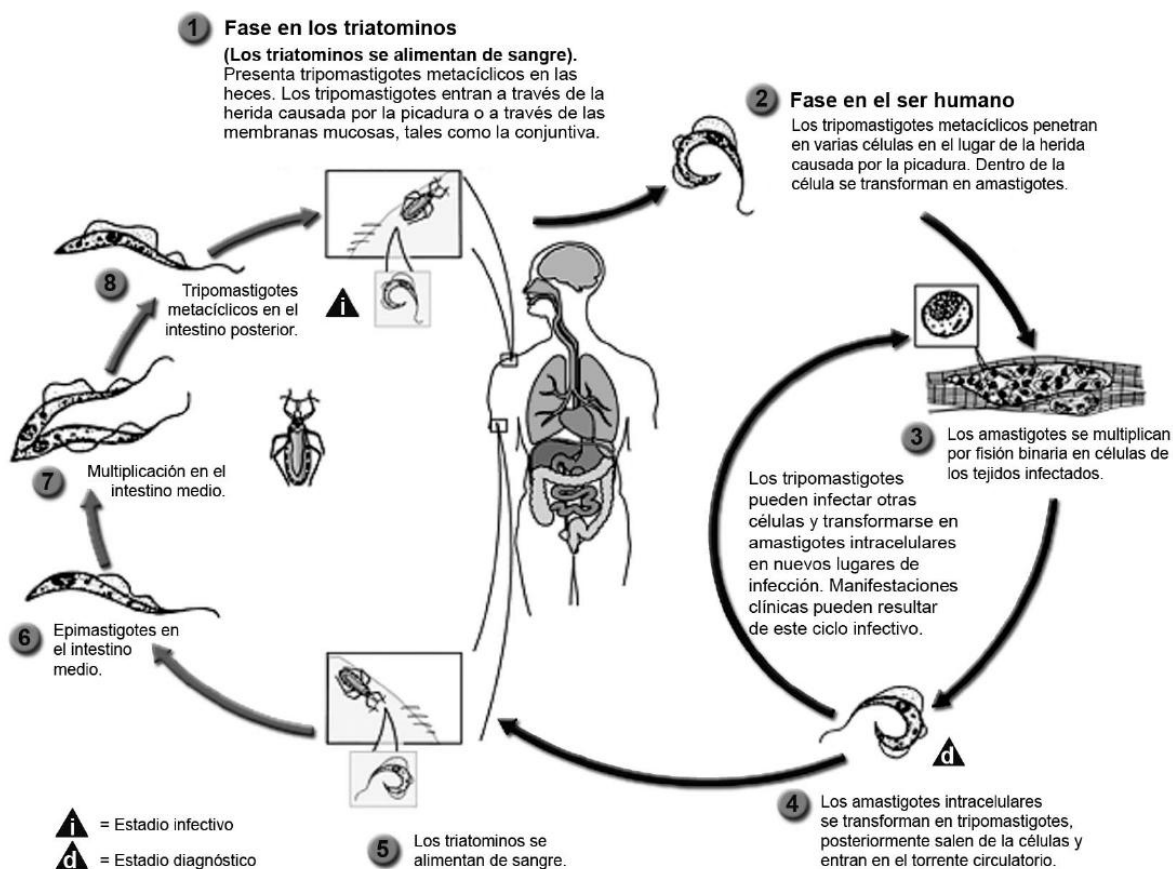
Este grupo de protozoos posee, al igual que las células eucariotas, retículo endoplásmico, ribosomas y aparato de Golgi. También se ha descrito la presencia de

peroxisomas, organelas de membrana citoplasmática que contienen enzimas tales como catalasas y oxidasas, aunque su actividad parece ser significativamente menor a la encontrada en células mamíferas.¹¹

1.2.3.3. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

Como se observa en la **Figura 1.2.3.3.1**, el ciclo de vida del *T. cruzi* es complejo. Se inicia en el huésped invertebrado cuando el vector triatomino ingiere sangre infectada del huésped vertebrado, conteniendo las formas tripomastigote. Éstas pasan al tubo digestivo del insecto donde pierden el flagelo y la membrana ondulante.

Figura 1.2.3.3.1. Ciclo de vida del *T. cruzi*.¹⁴



¹⁴ Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos Una visión iberoamericana. Cerecetto Meyer H y González M (coordinadores de edición); Cap 1: Situación de la Enfermedad de Chagas en el Continente Americano; pp. 19 (2012). ISBN: 978-607-95813-0-5. Edición de Laboratorios Silanes, SA de CV. Adaptado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html> [acceso 31/01/16]

Allí se convierten en esferomastigotes y posteriormente en epimastigotes, que se localizan en las células epiteliales del intestino medio. Las formas metacíclicas producidas al cabo de ocho a diez días, altamente infectantes y con aspecto tripomastigote, aparecen en el recto y son evacuadas con las deyecciones del insecto y con la orina, luego de picar al vertebrado.^{10,15} En la sangre del hospedador vertebrado, comienza un nuevo ciclo.

El flagelado llega a diversos órganos y, aunque tiene un tropismo diferente hacia diversos tejidos, reside predominantemente en el sistema retículo-endotelial, musculatura cardíaca y esquelética. Allí los tripomastigotes se ubican en vacuolas endocíticas, gradualmente se transforman en amastigotes, y casi simultáneamente rompen la membrana vacuolar que los contenía.

Una vez liberados al citoplasma de la célula huésped comienzan a dividirse y, luego de varios ciclos de divisiones, se generan nidos de amastigotes. Por algún estímulo todavía no esclarecido, los amastigotes se transforman en tripomastigotes, rompen la membrana celular y son liberados al espacio extracelular y a la circulación sanguínea, donde son capaces de amplificar la infección a nuevas células o pueden ser absorbidos nuevamente por el vector transmisor.¹⁰

1.2.4. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

1.2.4.1. TRANSMISIÓN VECTORIAL

Uno de los mecanismos históricamente más frecuentes de transmisión de la enfermedad al hombre es a través del vector. Los insectos pertenecientes a la familia *Reduviidae*, y a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son los más importantes y, entre ellos, *T. infestans* es la más frecuente en nuestro país y de mayor dispersión geográfica.^{10,16,17}

¹⁵ de Souza W. Electron microscopy of *trypanosomes*. Historical review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 313-25, 2008.

¹⁶ Storino R, Jörg M. Capítulo 11: "Vías de Infección y Aspectos Clínicos". En: Enfermedad de Chagas. Storino R, Miles J (Eds). Doyma Argentina, p 185-207, 1994.

¹⁷ Durante E, González Cappa S. Capítulo 4: "Vectores transmisores: triatominos, "Vinchucas"". En: Enfermedad de Chagas. Storino R, Miles J, (Eds). Doyma Argentina. P 41-50, 1994

La infección se produce por el ingreso, a través de las mucosas o de la piel, de los parásitos que se encuentran en las heces eliminadas luego de la alimentación del insecto.¹⁶ Las zonas expuestas del cuerpo son las elegidas por el insecto para picar, siempre durante la noche y el tiempo de succión puede variar entre los 5 y 20 min.¹⁰

Los tripanosomas pueden ingresar a través de la mucosa ocular, por escoriaciones de la piel luego del rascado o por zonas con epidermis fina como los párpados o la piel de los niños. De éstas, la vía conjuntival-ocular es la forma más común de infección y se supone que la preferencia de picar en la cara, estaría relacionada con un tropismo hacia el aire caliente y con altas concentraciones de anhídrido carbónico. Estas condiciones se dan durante la respiración y se han hallado células sensoriales en el insecto que facilitarían su orientación. Esta característica, sumada a la fragilidad relativa que presenta la piel de los niños, hace que sean los más afectados.¹⁶

1.2.4.2 TRANSMISIÓN POR HEMOTRANSFUSIÓN

Esta vía de transmisión proviene de transfusiones de sangre de dadores infectados, asintomáticos y que ignoran el padecimiento de la enfermedad.¹⁶ Se puede considerar como la segunda forma de transmisión en importancia, luego de la vectorial, estimándose que el 5 al 20 % de las infecciones en centros urbanos se da por esta vía.^{16,18} El riesgo de recibir sangre infectada por *T. cruzi* se incrementa en proporción con la prevalencia de infección en los dadores de sangre y con el número de transfusiones recibidas. Es de destacar que una alta prevalencia no sólo se evidencia en poblaciones ubicadas en zona endémica, sino que debido a la migración interna en cada país se observa también en los grandes centros urbanos de zonas no endémicas o en localidades muy australes como Tierra del Fuego.¹⁶

El fracaso de las políticas agrícolas así como la aparición de un nuevo modelo urbano-industrial, promueven el fenómeno de la urbanización de la Enfermedad de Chagas, prácticamente, en toda América desde la segunda mitad del siglo XX. Es por esto que la transmisión transfusional del *T. cruzi* pasó a tener creciente importancia en el continente y se vive una situación similar en países europeos, en Estados Unidos y en Japón.^{18,19,20} La prevalencia de donantes infectados es variable en toda América Latina con

¹⁸ Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl I): 75-85, 2007.

¹⁹ Pinto Dias JC, Briceño-León R, Storino R. Capítulo 26: "Aspectos Sociales, Económicos, Políticos, Culturales y Psicológicos". En: Enfermedad de Chagas, Storino R, Miles J, (Eds). Doyma Argentina, p 527-48, 1994;

²⁰ Moncayo A, Ortiz Yanine MI. "An update on Chagas disease (Human American trypanosomiasis). *Annals of tropical medicine & parasitology* 100: 1-15, 2006;

promedios de alrededor del 6 %, variando desde 0,5 % hasta 15 %.¹⁸ Por ello, la realización sistemática de las reacciones para la detección de la Enfermedad de Chagas en todo banco de sangre debe ser prioritaria.

En zonas endémicas y en aquellos sitios donde no puede realizarse un control serológico de los dadores, el violeta de genciana podría ser recurso importante para prevenir esta vía de infección. Su utilidad radica en que, agregado a la sangre por transfundir en concentración 1/4.000 luego de ser disuelto en solución glucosada isotónica al 0,5 %, mata al *T. cruzi* en un día, aunque no completamente, por lo que este método no es totalmente eficiente.¹⁸

1.2.4.3. TRANSMISIÓN TRANSPLACENTARIA

La Enfermedad de Chagas congénita se da por transmisión del *T. cruzi* de una madre infectada a su hijo. La infección puede ocurrir en cualquier momento de la gestación y en varios embarazos de una misma mujer.²⁰ Cuando las medidas de control se vuelven más efectivas, la transmisión vectorial y transfusional se ven reducidas, con lo cual, la transmisión transplacentaria cobra relevancia. En área endémica, se calcula que 1 a 12 % de los neonatos puede estar infectado con *T. cruzi*.²¹

1.2.4.4. TRANSMISIÓN POR TRASPLANTE DE ÓRGANOS

La transmisión por trasplante de órganos de personas infectadas se ha dado accidentalmente, y en países no endémicos donde no se determinaba la presencia del parásito por desconocerlo. Sin embargo, se han notificado casos en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela.²² Los órganos de donadores infectados se han reportado, sobre todo, en casos de trasplante de riñón. Los trasplantes de corazón, médula ósea y páncreas de donantes vivos y muertos son también posibles causas de transmisión de la Enfermedad de Chagas.²³

²¹ Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical* 36: 767-71, 2003

²² World Health Organization. Control of Chagas Disease. Technical Report Series 2002; No. 905, Geneva, 109 p.

²³ Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. Felipe Guhl. *Rev Biomed* 20:228-234; 2009

1.2.4.5. TRANSMISIÓN ALIMENTARIA O VÍA ORAL

Aunque sus antecedentes se remontan a la primera mitad del siglo XX, la transmisión oral es una forma de infección que ha recibido atención especialmente en la última década en varias regiones de América Latina, tales como en la Amazonia,²⁴ Venezuela²⁵ y Colombia.²⁶

Después de un período de latencia de cinco días a partir de la ingestión, la infección oral se caracteriza por manifestaciones graves, como fiebre prolongada, miocarditis aguda, falla cardíaca y, en algunos casos, encefalitis. También se han reportado gastritis graves, hemorragias digestivas y diarrea.^{27,28}

La mayoría de los brotes se han asociado al consumo de bebidas preparadas a base de frutas u otros vegetales contaminados con las heces de triatomíneos o secreciones de mamíferos infectados. Tal es el caso del jugo de asaí (*Euterpe oleracea*) y caña de azúcar en Brasil, el vino de palma y el jugo de naranja en Colombia, el jugo de guayaba en Venezuela, el jugo de “comou” en Guyana francesa y, recientemente, el jugo de palma de majo en Bolivia. Otra fuente de infección es el consumo de carne de animales mal cocida, o de sangre de algunos reservorios del parásito como el armadillo (*Dasypus spp.*), la cual es consumida por algunas comunidades del continente debido a las supuestas propiedades medicinales que posee.^{29,30,31,32,33} En relación con la gravedad de los signos o

²⁴ Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104 (Supl.1):101-7.

²⁵ Añez N, Crisante G, Rojas A, Dávila D. Brote de enfermedad de Chagas agudo de posible transmisión oral en Mérida, Venezuela. Bol Malarial Sal Amb. 2013;LIII:1-11.

²⁶ Nicholls RS, Cucunubá Z, Knudson A, Flórez A, Montilla M, Puerta C, et al. Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. Informe de 10 casos presentados en el periodo 2002 a 2005. Biomédica. 2007;27(Supl.1):8-17.

²⁷ Bastos C, Aras R, Mota G, Mota G, Reis F, Dias JP, et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e711.

²⁸ Pinto AY, Ferreira AG, Valente VD, Harada GS, Valente SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: Four-year follow-up after treatment with benzimidazole. Rev Panam Salud Pública. 2009;25:77-83.

²⁹ Organización Panamericana de la Salud. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas por transmisión oral. En: Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la Enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Río de Janeiro: PANAFTOSA-VP/OPS/OMS. 2009. p. 13.

³⁰ Santalla J, Oporto P, Espinoza E, Ríos T, Brutus L. Primer brote reportado de la Enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. BIOFARBO. 2011;19:52-8.

³¹ Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Guía para la atención clínica integral del paciente con Enfermedad de Chagas. Bogotá: OPS; 2010. p. 16-23.

³² Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Mauriello L, et al. Transmisión urbana de la Enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Rev Biomed. 2009;20:158-64.

³³ Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RMB, Dias VL, Passos LC. Chagas' disease as a foodborne illness. J Food Prot. 2009;72:441-6

síntomas, el compromiso cardiovascular constituye el mayor porcentaje de la causa de muerte en los brotes de transmisión oral de *T. cruzi*.³⁴

La existencia de una nueva situación epidemiológica, en la cual la transmisión oral de *T. cruzi* está surgiendo en áreas con previo control de los vectores domiciliados o en regiones sin antecedentes de domiciliación del parásito. Los cambios ambientales, como la deforestación y el calentamiento global, han afectado los ecotopos y el comportamiento de los vectores y los reservorios de *T. cruzi*,^{35,36} de manera que se han desplazado a nuevas zonas, generando una nueva forma de transmisión oral por contaminación de alimentos que debe valorarse para introducir cambios en las estrategias de control.

Los posibles mecanismos de transmisión oral de la Enfermedad de Chagas³⁷ han sido postulados como los siguientes: (i) Contaminación de comidas, jugos, frutas con heces de triatomíneos infectados, preparados en áreas donde los humanos han invadido los nichos ecológicos donde ocurren los ciclos de infección entre los vectores y el parásito. Esta vía de transmisión se registró por primera vez en el estado de Amapá, Brasil en 1999.³⁸ (ii) Consumo directo de vectores infectados con *T. cruzi*.³⁹ Este mecanismo fue demostrado en animales de laboratorio mediante vectores biológicos como triatomíneos y vectores mecánicos como *Musca domestica*. (iii) Consumo de comida contaminada con orina o secreciones de glándula olfatoria de marsupiales conteniendo tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*.⁴⁰ (iv) Ingesta de carne de caza cruda o poco cocida.⁴¹ (v) Consumo de sangre de animales salvajes durante rituales religiosos o medicina popular en áreas

³⁴ Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. Karina Rueda, Jorge Eduardo Trujillo, Julio César Carranza, Gustavo Adolfo Vallejo *Biomédica* 2014;34:631-41.

³⁵ Reyes-Lugo M. *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vector de la Enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. *Rev Biomed*. 2009;20:180-205.

³⁶ Abad-Franch F, Monteiro FA, Jaramillo ON, Gurgel-Gonçalves R, Dias FB, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop*. 2009;110:159-77.

³⁷ Belkisyolé Alarcón de Noya et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 110(3): 377-386, May 2015.online | memorias.ioc.fiocruz.br

³⁸ Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN, Barbosa CMJ, dos Santos MP, Miranda COS, Cuervo P, Fernandes O 2009. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 291-297.

³⁹ Diaz-Ungría C 1965. Transmisión del *Trypanosoma cruzi* en los vertebrados. *Rev Iberica Parasitol* 25: 1-44.

⁴⁰ Jansen AM, Deane MP 1985. *Trypanosoma cruzi* infection of mice by ingestion of food contaminated with material of the anal gland of the opossum *Didelphis marsupialis*. *Proceedings of the Reunião sobre pesquisa básica em doenças de Chagas*, 1985 Nov, Caxambu, p. 39.

⁴¹ Thomas ME, Rasweiler IV JJ, D'Alessandro A 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive Neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 559-565.

rurales o selváticas del continente.^{42,43} (vi) Por amamantamiento.⁴⁴ Aunque confirmado experimentalmente, por la descripción de modelos de infección por esta vía en ratones y por la descripción de tripomastigotes en leche de madres en la etapa aguda de la enfermedad, la infección por este mecanismo no parecería ser eficiente.^{45,46} A los efectos de la discusión que se dará más adelante al respecto, todos los reportes indican que en el ser humano, la transmisión por esta vía sólo es posible si hay un daño de los pezones que impliquen sangrado.

1.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD:

Para un diagnóstico temprano es indispensable mantener una actitud alerta y considerar la Enfermedad de Chagas en todo individuo con antecedentes epidemiológicos: permanencia en área rural endémica, haber recibido transfusiones o nacido de una madre infectada.⁴⁷

En todo individuo con sospecha clínica (síndrome febril prolongado, astenia, hepatoesplenomegalia, etc.) de infección aguda por *T. cruzi* se debe:

- ✓ Realizar el diagnóstico de la infección aguda por métodos de laboratorio.
- ✓ Evaluar el estado clínico y potenciales complicaciones
- ✓ Evaluar la situación epidemiológica y posibles vías de transmisión.

La aparición de un caso de infección aguda por *T. cruzi*, independientemente de la vía de transmisión, es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo que el médico interviniente debe:

- ✓ Confirmar el caso, definir la vía de transmisión, y tomar la conducta terapéutica indicada.
- ✓ Hacer de inmediato la notificación a la Dirección de Epidemiología Provincial y al Programa Provincial de Chagas, según pautas de Vigilancia Epidemiológica.

⁴² OPS - Organización Panamericana de la Salud 2009. Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la Enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Serie de Manuales Técnicos 12, PANAF-TOSA-VP/OPAS/OMS, Rio de Janeiro, 92 pp.

⁴³ Alarcón de Noya BA, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Díaz-Bello Z, Noya O 2010c. La transmisión oral en la Enfermedad de Chagas. *Rev Fac Med* 33: 78-86.

⁴⁴ Mazza S, Montaña A, Benitez C, Janzi EZ Transmisión del *Schizotripanum cruzi* al niño por leche de la madre con Enfermedad de Chagas. *Mis. Est. Patol. Reg. Argentina*, 28:41-46. 1936

⁴⁵ Miles MA 1972. *Trypanosoma cruzi*-milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology* 65: 1-9..

⁴⁶ Norman F, López-Velez R 2013. Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis* 19: 1561-1566

⁴⁷ Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012

Ante un supuesto caso agudo deben evaluarse los siguientes datos con el fin de determinar la vía de transmisión más probable:

- ✓ Antecedentes epidemiológicos y ecológicos (conocimiento del vector, características de la vivienda, lugar de residencia, lugar de nacimiento/procedencia, viajes a zonas endémicas, etc.).
- ✓ Antecedentes de infección de la madre (y evaluación serológica de la misma), para la transmisión vertical.
- ✓ Antecedentes transfusionales dentro de los 90 días previos a la consulta.
- ✓ Antecedentes de trasplante en los últimos 12 meses previos a la consulta.
- ✓ Antecedentes de patologías que generan inmunodepresión.
- ✓ Antecedentes de inicio de tratamientos que generen inmunosupresión, o aumento de la inmunosupresión, previo a la consulta.
- ✓ Antecedente de infección crónica del paciente, para definir si se trata o no de una reactivación.
- ✓ Probabilidad de infección accidental, especialmente en personas que se desempeñen en laboratorios o ámbitos quirúrgicos.

Para la confirmación de la infección en fase aguda la primera elección es demostrar la presencia del parásito por métodos parasitológicos directos. Entre estos, los métodos de concentración en una muestra de sangre son los indicados debido a la sensibilidad adecuada ante el nivel de parasitemia existente en esta fase, y a que pueden ser realizados en laboratorios de baja complejidad. Las “Normas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*” del Ministerio de Salud de la Nación detallan las especificaciones de estas pruebas diagnósticas. Los métodos de concentración que pueden utilizarse, en orden de menor a mayor complejidad son:

- ✓ Gota fresca
- ✓ Micrométodo con capilares (Técnica de microhematocrito)
- ✓ Micrométodo con microtubo
- ✓ Strout

En casos de pacientes con signos o síntomas neurológicos, toda vez que se pueda, también se debe buscar la presencia de parásitos en líquido cefalorraquídeo.

La técnica por PCR, permite la amplificación de fragmentos de ADN del parásito que puede realizarse en centros que cuenten con infraestructura adecuada (mayor

complejidad). Sin embargo, debido a su mayor sensibilidad en comparación con los métodos de concentración, la PCR puede ser positiva en una infección crónica.⁴⁸

La seroconversión positiva entre dos análisis con 30 a 90 días de intervalo puede también servir como diagnóstico confirmatorio de fase aguda si no puede realizarse la parasitemia. Sin embargo, se debe recordar que la seroconversión tiene menor valor en el diagnóstico de fase aguda en pacientes con tratamientos o enfermedades que generen inmunosupresión o inmunodepresión. Las pruebas serológicas se utilizan para detectar anticuerpos circulantes (Inmunoglobulinas G - IgG) contra el parásito. Las IgGs pueden detectarse antes de los 30 días de ocurrida la infección aguda, alcanzando su nivel máximo al tercer mes. Con el fin de detectar IgG se pueden emplear los siguientes métodos diagnósticos:

- ✓ Ensayo inmuno-enzimático (ELISA).
- ✓ Inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- ✓ Hemoaglutinación indirecta (HAI).
- ✓ Aglutinación con partículas de gelatina.

En algunos casos en particular (reactivaciones cerebrales, lesiones dérmicas), la biopsia es de gran utilidad para establecer el diagnóstico.

1.3.1. BIOQUÍMICA DEL *T. CRUZI*: BLANCOS DE ACCIÓN.

El *T. cruzi* requiere glucosa u otro monosacárido como la fructosa para crecer. Carece de reservas de polisacáridos; contiene aproximadamente el 50% de su peso en proteínas y el 40 % de los aminoácidos libres está constituido por alanina. El colesterol es el lípido cuantitativamente más importante, aunque el requerimiento de ergosterol para la viabilidad celular es fundamental.

De hecho, la inhibición de la biosíntesis del ergosterol probó ser efectiva contra el parásito. Los triazoles utilizados clínicamente como agentes antifúngicos, actúan a través de la inhibición de la C14- α -esterol demetilasa-citocromo P450 dependiente. Conduce a la acumulación de 14- α -metilesterol, que resulta ser tóxico para muchos sistemas enzimáticos de membrana, incluido el de transporte de electrones.⁴⁹ Los ácidos grasos

⁴⁸ Ramírez JC et al (2015) Analytical validation of qPCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *J Mol Diagn* 17: 605-615.

⁴⁹ Maya JD, Cassells BK, Ituraga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology, Part A*, 146: 601-20, 2007

son, en general, no saturados y el parásito puede incorporarlos del medio o bien sintetizarlos, como algunos lípidos complejos.

En este sentido, los análogos de fosfolípidos son promisorios como quimioterápicos efectivos. Estas drogas fueron desarrolladas para la terapia del cáncer ya que actúan como supresoras del crecimiento tumoral y luego fueron ensayadas contra la Leishmania. Actúan probablemente a través de la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina y de esfingomiélin, que puede desencadenar la apoptosis. Otros blancos potenciales son la cascada de traducción de señales y/o la membrana celular de los parásitos. Actualmente, la miltefosina está aprobada en India para el tratamiento de la Leishmania. Sin embargo, su uso clínico para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas debe evaluarse cuidadosamente ya que es teratogénica y la transmisión congénita es una de las vías más relevantes en la actualidad.⁵⁰

El *T. cruzi* es incapaz de sintetizar el anillo de purina, por lo que toma las bases libres y los nucleósidos del medio. En cambio, puede sintetizar a las pirimidinas y concentrar pirazolpirimidinas dentro de la célula y metabolizarlos como purinas a través de vías de rescate para luego incorporarlas a los ácidos nucleicos. De esta manera, las diferencias entre el *T. cruzi* y el huésped mamífero en el metabolismo de las purinas ha sido utilizado para el desarrollo racional de quimioterapia.⁵⁰

La cadena respiratoria del *T. cruzi* ha sido intensamente estudiada, encontrándose diferencias importantes con la de las células de tejidos mamíferos. El butilhidroxianisol y el butilhidroxitolueno son antioxidantes utilizados ampliamente como aditivos alimentarios. El primero inhibe el crecimiento de epimastigotes, por medio de la inhibición del consumo de O₂ en un 70% y, de manera similar, el segundo es capaz de esterilizar sangre humana contaminada con tripomastigotes de *T. cruzi*.⁵⁰

El parásito carece de catalasas y del sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa, la vía alternativa para metabolizar el peróxido de hidrógeno, por lo que el metabolismo del peróxido de hidrógeno es deficiente. Además, la actividad superóxido dismutasa está disminuida y no se ha probado la existencia de β-caroteno ni α-tocoferol en el mismo.⁵⁰ Sin embargo, se ha descrito la actividad de la ascorbato reductasa y la dehidroascorbato reductasa, sugiriendo la presencia de un ciclo redox del ácido ascórbico en estos parásitos. Por lo tanto, los principales mecanismos de defensa del *T. cruzi* son el

⁵⁰ Quillardet P, Arrault X, Michel V, Touati E. Organ-targeted mutagenicity of nitrofurantoin in Big Blue transgenic mice. *Mutagenesis* 21: 305-11, 2006

glutathion (GSH) y la tripanotona (conjugado GSH-espermidina) que es característica de todos los tripanosomátidos y fundamental para la reducción del glutati6n. La conjugaci6n de metabolitos electrof6licos del NFX o BNZ con los tioles reduce el contenido de los mismos en el par6sito, empeorando a6n m6s el ya precario sistema de defensa contra el estr6s oxidativo y los metabolitos electrof6licos.⁵⁰ Esto explicaría la acci6n tripanocida de drogas como el NFX cuyo metabolismo genera an6n super6xido (O₂-•) y per6xido de hidr6geno (H₂O₂). Adem6s del metabolismo de los tioles y su asociaci6n con la acci6n del NFX o BNZ, el *T. cruzi* tiene un gran n6mero de mecanismos metab6licos diferentes a los del hu6sped mam6fero que pueden ser, por lo tanto, explotados como blancos terap6uticos potenciales. Entre ellos, la bios6ntesis de ergosterol y purinas ha sido explorada cl6nicamente como blanco tripanocida.

1.3.2. DEFINICI6N DE DROGA IDEAL

Seg6n la Organizaci6n Mundial de la Salud (OMS), la droga ideal para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas debe cumplir los siguientes requisitos:⁵¹

- ✓ Cura parasitol6gica en casos agudos y cr6nicos.
- ✓ Efectividad en una 6nica o en pocas dosis.
- ✓ De bajo costo.
- ✓ No poseer efectos laterales o teratog6nicos.
- ✓ No requerir hospitalizaci6n para el tratamiento.
- ✓ No inducir resistencia en el par6sito.

1.3.3. RESEÑA HIST6RICA DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS.

Los primeros compuestos utilizados experimentalmente para el tratamiento de la enfermedad inclu6an arsenicales, fucsina y cloruro de mercurio, entre otros. Mayer y Rocha Lima los emplearon entre 1912 y 1914 sin resultados efectivos por lo que, hasta 1935 no hubo tratamiento espec6fico para la enfermedad.

En el per6odo siguiente y hasta 1962, se destac6 el uso de derivados de la quinole6ina; antimal6ricos; arsenobenzoles y otros arsenicales; fenantridinas; sales de oro, bismuto, cobre y esta6o; yoduro de sodio; violeta de genciana; aminopterina; 6cido p-amino salic6lico; antihistam6nicos; sulfonamidas; cortisona; derivados de la stilomicina; amfotericina B; m6s de treinta antibi6ticos y algunos nitrofuranos.⁵¹ Asimismo, en la

⁵¹ Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. *Mem6rias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002

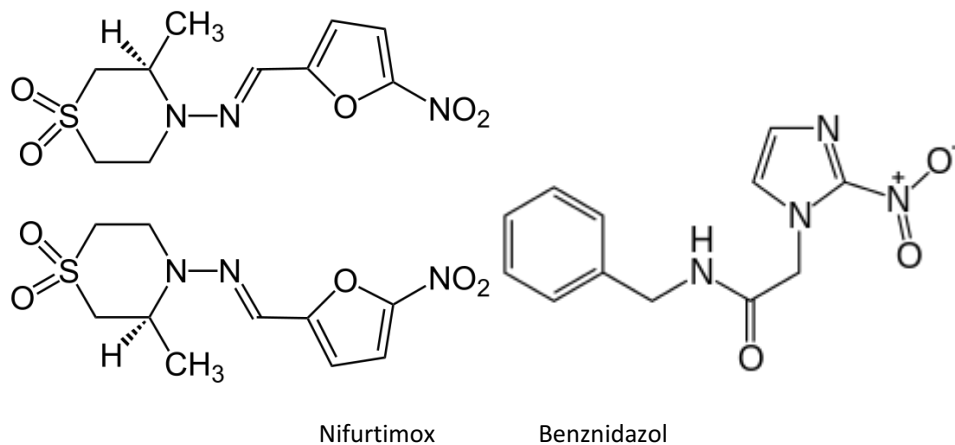
década del 50 se abrió una línea de nuevas drogas potenciales con los nitrofuranos, entre ellos la nitrofurazona (5-nitro-2-furaldehído-semicarbazona). Se la utilizó en una gran variedad de estudios experimentales y con pacientes en etapa aguda y crónica, con resultados dispares y, en algunos casos, con suspensión del tratamiento por aparición de eventos adversos, principalmente sobre el sistema nervioso.

En 1968 se registraban 27 compuestos y más de treinta antibióticos, ensayados experimentalmente, tanto *in vivo* como *in vitro*, resultando todos inactivos. Entre ellos, Bayer 7602 (Cruzón), varias aminoquinolinas, arsenicales trivalentes (Bayer 9736 y Bayer 10557), nitrofuranos y antibióticos con efecto supresivo de la parasitemia pero no curativo.⁵² Los estudios llevados a cabo hasta ese momento carecían de metodologías de ejecución controladas y estandarizadas de manera de armonizar la selección de los casos agudos a estudiar. De aquí surgió, luego de la evaluación de estos ensayos terapéuticos, un criterio básico para la evaluación de un tratamiento específico, aprobado posteriormente por la OPS/OMS en 1998.⁵²

1.3.4. DROGAS UTILIZADAS EN LA ACTUALIDAD:

Las dos drogas utilizadas son el 3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenamino)tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido o NFX de Bayer (Lampit) y la N-bencil-2-nitroimidazol acetamida o BNZ que hasta hace poco solo era comercializado por Roche (Radanil). **Figura 1.3.4.1.**

Figura 1.3.4.1. Estructuras químicas del BZN y el NFX



⁵² Raether W, Hänel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology research* 1:S19-39, 2003

Enfermedad aguda vectorial:

En todo paciente con infección aguda por *T. cruzi* se deberá realizar un examen clínico para detectar posibles manifestaciones que requieran tratamiento sintomático, además del tratamiento antiparasitario específico. Se deberá realizar interrogatorio y examen físico completos. Adicionalmente se recomienda la realización como mínimo de un electrocardiograma (ECG), una teleradiografía de tórax y un laboratorio incluyendo hemograma, eritrosedimentación, creatinina o urea, y hepatograma. Estos últimos estudios permitirán realizar un monitoreo de seguridad del tratamiento farmacológico. La realización de otros estudios complementarios debe ser guiada por la presencia de signos y síntomas, así como de la capacidad instalada del centro asistencial. Debe tenerse en cuenta que la realización de estudios cardiológicos no debe retrasar el inicio del tratamiento.

El objetivo principal del tratamiento en la fase aguda de la infección consiste en la eliminación del parásito mediante el tratamiento antiparasitario específico. Debido a que el tratamiento tripanocida comparte características similares en todas las fases de la infección por *T. cruzi*, independientemente de la vía de transmisión, el tratamiento específico se describe en forma global en la sección Tratamiento etiológico tripanocida. Se debe recordar además que se deben suministrar todas las medidas de soporte y control sintomático necesarias dependiendo de la presentación clínica y las manifestaciones que presente el paciente con infección aguda.

Chagas congénito (Algoritmo descrito en la Figura 1.3.4.1.1.)

Control de la embarazada: de acuerdo a la ley nacional Nro. 26.281/07, toda mujer embarazada debe ser estudiada para confirmar o descartar una infección crónica por *T. cruzi* a través de una muestra de sangre. Idealmente, dicho estudio debería solicitarse en su primer control prenatal. Para ello deben realizarse dos pruebas serológicas en paralelo. Toda mujer embarazada que llegue al parto sin este estudio, debe realizarse el mismo durante su internación en el Centro Asistencial. Se recomienda verificar el resultado antes del alta.

⁵³ Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012.
http://www.msal.gob.ar/chagas/images/stories/Equipos/Guia_Nacional_Chagas_version_27092012.pdf

Control del recién nacido: de acuerdo a la Ley nacional de pesquisa neonatal Nro 26.279 del año 2007, todos los recién nacidos vivos deben ser estudiados luego del nacimiento para descartar una eventual infección congénita por *T. cruzi*. Además, la Ley Nro 26.281/07 hace obligatorio el seguimiento y estudio de todo niño de madre con infección crónica por *T. cruzi* hasta el año de vida.

Primer control del recién nacido: Implementar la búsqueda directa de *T. cruzi* por medio de un micrométodo parasitológico en el período perinatal, preferentemente antes del alta del Centro Asistencial o lo más cercano al nacimiento.

Control del niño a partir de los 10 meses de edad: Llegados a este momento del seguimiento de un posible caso de infección congénita, la parasitemia será negativa. Por tal motivo, será necesario estudiar la respuesta inmunológica del niño mediante la realización de un análisis de sangre con dos técnicas serológicas en paralelo. Una vez que se descarte la infección congénita por métodos serológicos el niño podrá ser dado de alta del seguimiento. En el caso que los estudios confirmen la ocurrencia de la infección congénita, el niño deberá ser tratado.

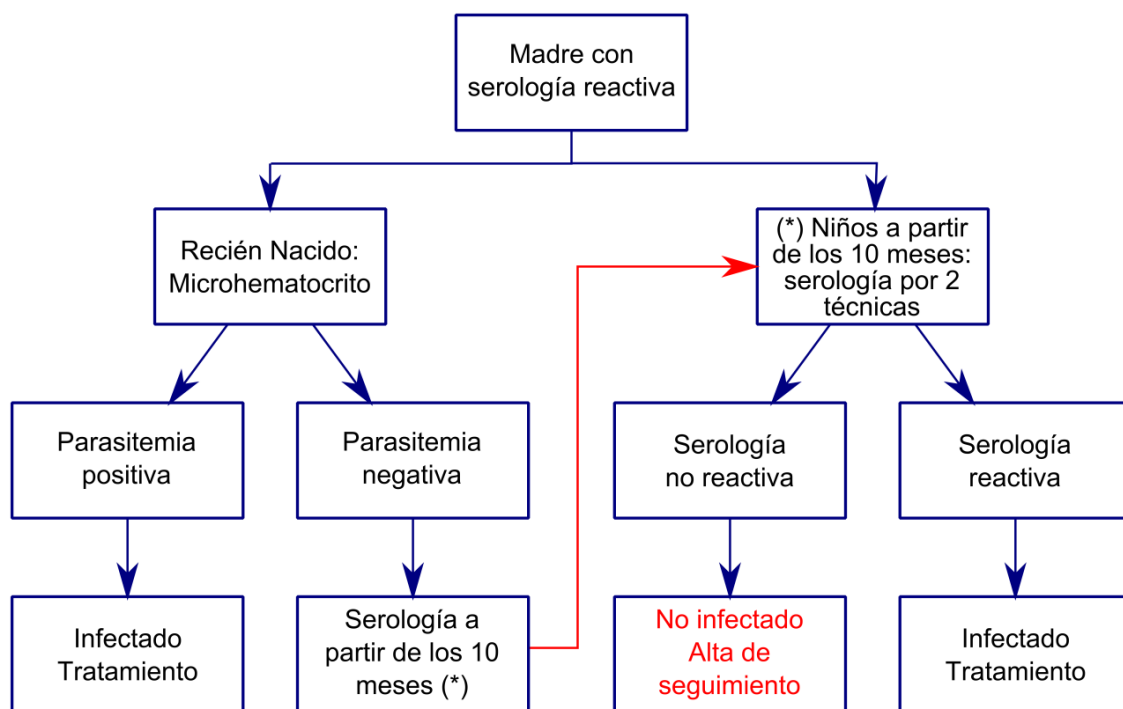


Figura 1.3.4.1.1. Algoritmo para el estudio de Chagas congénito en recién nacidos y menores de 1 año.

Pacientes inmunocomprometidos: Existen dos posibilidades que pueden suceder en un paciente inmunocomprometido: i) que una infección crónica se reactive, o ii) que adquiera una infección aguda por diferentes vías de transmisión. En ambas circunstancias, el cuadro clínico es muy grave y requiere un rápido diagnóstico para que el tratamiento etiológico sea efectivo, para evitar complicaciones asociadas.

Accidentes de trabajo con material contaminado con *T. cruzi*: Los trabajadores que realizan su actividad con materiales que contienen o puedan contener *T. cruzi* deben controlarse serológicamente antes de iniciar la actividad laboral. Estas actividades son, entre otras: diagnóstico de laboratorio, investigaciones biomédicas, cirugía y hemodiálisis. Se deberá realizar seguimiento y control de los trabajadores en forma anual o bianual y frente a toda ocurrencia de signos o síntomas compatibles con infección por *T. cruzi*.

Trasplante de órganos y de células hematopoyéticas: Todo donante y receptor de órganos deben tener el estudio serológico para esta parasitosis. Dicha evaluación debe realizarse con dos reacciones simultáneas. Cualquiera sea la indicación de intervención terapéutica por la patología de base sobre el paciente, es necesario que se siga un protocolo estandarizado de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la potencial reactivación en un paciente con infección crónica que será inmunodeprimido, así como de la infección aguda transmitida por el órgano donado o trasplantado.

Infección por vía transfusional: Ante la sospecha de Enfermedad de Chagas postransfusional deben realizarse estudios parasitológicos cada 72 h las primeras 2 semanas y luego quincenalmente, y serológicos seriados cada 15 días hasta los 90 días posteriores a la última transfusión de sangre y/o sus componentes. En laboratorios que cuenten con un método estandarizado, podrían usarse métodos moleculares para detección del parásito (PCR). Si se comprueba la infección (por detección del parásito o seroconversión positiva), se debe proceder a administrar el tratamiento específico tripanocida.

1.3.4.2. TRATAMIENTO ETIOLÓGICO TRIPANOCIDA

El tratamiento etiológico tiene objetivos a nivel individual y colectivo.

A nivel individual:

- ✓ Prevenir lesiones viscerales o disminuir la probabilidad de progresión de la lesión establecida.
- ✓ Curar la infección.

A nivel colectivo:

- ✓ Disminuir la posibilidad de transmisión del *T. cruzi* por todas sus vías.

El tratamiento tripanocida en la fase aguda reduce la gravedad de los signos y síntomas y acorta el curso clínico y la duración de la parasitemia detectable. La cura parasitológica (demostrable por negativización de la parasitemia y de la serología) es superior al 80% en fase aguda vectorial y más del 90% en los casos congénitos tratados durante el primer año de vida. En el caso de reactivaciones en pacientes con infección por VIH, que conlleva una alta mortalidad, el tratamiento tripanocida administrado en forma temprana mejora el pronóstico. En pacientes trasplantados con reactivación, la terapia tripanocida anticipada (tratamiento con parasitemia positiva sin signos o síntomas de reactivación) y el tratamiento precoz de la reactivación con signos o síntomas reduce la morbilidad y mortalidad asociadas.

En niños y adolescentes con infección crónica el tratamiento tripanocida es en general bien tolerado y ha demostrado una alta tasa de curación de la infección, demostrable por la seroconversión negativa. Todas las guías y recomendaciones actuales coinciden en indicar que los niños y adolescentes con Chagas crónico deben ser tratados lo más precozmente posible dado que presentan menos eventos adversos y mejor respuesta terapéutica. Un beneficio adicional del tratamiento en esta población sería la reducción subsecuente del riesgo de Chagas congénito en la descendencia de las niñas tratadas y el aumento del número de potenciales donantes de sangre y órganos.⁵⁴

En adultos con infección crónica el tratamiento etiológico también ha demostrado asociarse a seroconversión negativa sugiriendo la curación de la infección, aunque la tasa observada es menor que en niños y adolescentes, y el tiempo requerido hasta la seroconversión es mucho mayor. Adicionalmente, el tratamiento tripanocida en adultos menores de 50 años con infección crónica y con lesión cardiológica incipiente reduciría la progresión a estadios clínicos más avanzados. Sin embargo, el tratamiento etiológico en este grupo de pacientes es en general menos tolerado que en niños y adolescentes. El uso de tratamiento tripanocida en pacientes con lesión orgánica moderada o grave es todavía motivo de investigación.

⁵⁴ Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartrolí, J. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44: 2498-502, 2000

1.3.4.3. DISPONIBILIDAD DE LOS FÁRMACOS Y CONSIDERACIONES SOBRE LA TERAPÉUTICA TRIPANOCIDA

BZN: Se presenta en comprimidos birranurados de 50 y 100 mg. En otros países de la región existen presentaciones dispensables de 12,5 mg, las cuales pueden estar disponibles en el futuro para su uso en Argentina.

Dosis:

✓ Todas las edades: 5-8 mg/kg/día, administrados en dos tomas diarias (cada 12 horas) luego de las comidas. Se sugiere una dosis máxima de 400 mg/día.

NFX: Se presenta en comprimidos birranurados de 120 mg.

Dosis:

✓ Recién nacido y hasta los dos meses de vida: 10-12 mg/kg/día, administrados en dos tomas (cada 12 horas).

✓ Lactantes, primera y segunda infancia: 10-12 mg/kg/día, administrados en tres tomas (cada 8 horas).

✓ Adolescentes y adultos: 8 – 10 mg/kg/día (máximo 700 mg en 24 horas), administrados en tres tomas (cada 8 horas).

Las tomas deben administrarse luego de las comidas. En prematuros o niños de bajo peso se recomienda iniciar el tratamiento con dosis bajas de la droga seleccionada, la que puede administrarse en una sola toma diaria. Luego se puede aumentar la dosis cada 48 a 72 horas, realizando control de hemograma hasta alcanzar la dosis terapéutica.

Tanto con BZN como con NFX, la duración del tratamiento recomendada es de 60 días. Ante el caso de intolerancia al medicamento que impida completar los dos meses, se puede considerar aceptable si cumplió al menos 30 días. En caso de suspender el tratamiento por la presencia de eventos adversos antes de los 30 días, y luego de controlados los mismos, se recomienda comenzar un nuevo tratamiento con la droga no utilizada.

1.3.4.4. EVENTOS ADVERSOS

Entre los eventos adversos más comunes del NFX se encuentran los producidos sobre el sistema nervioso central y los trastornos gastrointestinales. En cambio, en el caso del BZN las reacciones cutáneas, polineuropatías y trastornos gastrointestinales son los más comúnmente encontrados.⁵¹ En la **Tabla 1.3.4.4.1** se enumeran más detalladamente estos eventos.

Los eventos adversos del tratamiento tripanocida son variables según la droga utilizada. En general, la mayoría se presenta entre los 15 y 30 días de iniciada la administración del fármaco. En el caso de las poblaciones pediátricas, la frecuencia e

intensidad de dichos eventos es mayor a medida que aumenta la edad de los pacientes.⁵⁵ Estas ideas se profundizarán en la discusión de los resultados de este trabajo.

Tabla 1.3.4.4.1. Eventos adversos más comunes

| Signo | Síntoma | nifurtimox | benznidazol |
|--|----------------------------|------------|-------------|
| Trastornos digestivos | | | |
| <i>Anorexia</i> | | +++ | ++ |
| <i>Pérdida de peso</i> | | ++ | + |
| <i>Diarrea</i> | | + | ++ |
| | <i>Náuseas</i> | +++ | ++ |
| | <i>Vómitos</i> | +++ | ++ |
| | <i>Gastralgia</i> | +++ | + |
| <i>Intolerancia hepática</i> | | + | + |
| Trastornos del sistema nervioso | | | |
| | <i>Cefalea</i> | ++ | + |
| | <i>Vértigo</i> | + | + |
| <i>Excitación psíquica</i> | | +++ | - |
| | <i>Neuritis periférica</i> | + | - |
| <i>Polineuropatía</i> | | ++ | + |
| | <i>Parestesias</i> | ++ | + |
| <i>Insomnio</i> | | ++ | + |
| <i>Depresión psíquica</i> | | + | - |
| <i>Fotosensibilidad</i> | | + | ++ |
| <i>Adinamia</i> | | - | + |
| Trastornos dermatológicos | | | |
| <i>Dermatitis</i> | | + | +++ |
| | <i>Prurito</i> | + | ++ |
| | <i>Urticaria</i> | + | ++ |
| <i>Eritema</i> | | - | + |

Frecuencia de aparición: – ausente; + escasa; ++moderada; +++ elevada. *Adaptado de Storino 1994.*⁵⁶

⁵⁵ Altchek J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* 2011; 127:212–218.

⁵⁶ Storino R, Gallerano R, Sosa R. Capítulo 28: “Tratamiento antiparasitario específico”. *Enfermedad de Chagas*. Storino R, Miles J (Eds). Doyma Argentina, p 557-69, 1994

1.3.5. NUEVAS DROGAS EVALUADAS CLÍNICAMENTE

De las dos drogas existentes para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, sólo el BZN ha estado disponible en los últimos años. Esto, sumado a que el desarrollo de nuevas drogas es de nulo o poco interés para la industria farmacéutica, hace que sean pocas las sustancias ensayadas últimamente para el tratamiento de esta enfermedad. Entre los compuestos evaluados a tal fin se encuentran el alopurinol, ketoconazol, fluconazol e itraconazol.⁵¹

El alopurinol es un análogo de la hipoxantina que actúa como sustrato alternativo de la hipoxantina-guaninafosforibosiltransferasa, y es incorporado de esta manera al ARN. Así, se forman nucleótidos no fisiológicos que bloquean la síntesis de nucleótidos purínicos nuevos. En ensayos clínicos con pacientes crónicos y en casos de reactivación por trasplante cardíaco, se obtuvo la cura parasitológica en el 50 % de los casos, aproximadamente. Resta llevar a cabo nuevos estudios para reevaluar la eficacia del uso de este medicamento.

El ketoconazol, inhibidor de la síntesis de esteroides, es uno de los primeros compuestos imidazólicos que mostraron actividad *in vitro* contra el *T. cruzi*. En el tratamiento de pacientes crónicos fue incapaz de eliminar los parásitos.

El fluconazol e itraconazol son compuestos azólicos que interfieren en la síntesis del ergosterol. Se han ensayado, sin resultados totalmente satisfactorios, en pacientes chagásicos VIH positivos y en pacientes crónicos. Esta información se resume en la **Tabla 1.3.5.1.**

Tabla 1.3.5.1. Compuestos evaluados clínicamente

| | Familia de compuestos | Mecanismo de acción | Efectividad |
|--------------------------|-----------------------|---------------------------------|--|
| Alopurinol | Análogo hipoxantina | Interfiere síntesis nucleótidos | 50% cura parasitológica en pacientes crónicos |
| Ketoconazol | Imidazol | Interfiere síntesis ergosterol | Actividad <i>in vitro</i> . Nula en pacientes crónicos |
| Fluconazol e Itraconazol | Triazol | Interfiere síntesis ergosterol | 53% cura parasitológica en pacientes crónicos Baja en pacientes crónicos VIH + |

1.3.6. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

Otra de las alternativas para la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas es el reposicionamiento (Drug Repositioning), que consiste

en el proceso de desarrollo de fármacos basado en la identificación y el desarrollo de nuevas aplicaciones para moléculas existentes.⁵⁷

Esta variante, implica la exploración de la actividad tripanocida de fármacos ya aprobados para su uso en otras patologías o de moléculas que, habiendo superado los ensayos de toxicidad y seguridad no hayan tenido éxito en los ensayos de eficacia para otras patologías. Esta estrategia tiene la enorme ventaja del ahorro de recursos y de tiempos, dado que ya han superado los ensayos de seguridad y toxicidad para el ser humano, sumamente costosos y que exige tiempos prolongados. Recientemente se han reportado algunos esfuerzos interesantes de screening *in vitro*⁵⁸ e *in silico*,⁵⁹ aprovechando esta estrategia.

1.4. MECANISMOS DE ACCIÓN TÓXICA Y FARMACOLÓGICA DE NITROCOMPUESTOS:

1.4.1. GENERALIDADES. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Los efectos biológicos de sustancias exógenas, entre los que se incluye a los fármacos, se inician a través de interacciones físicoquímicas entre la sustancia química o sus intermediarios reactivos y macromoléculas.⁶⁰ Estos intermediarios reactivos generalmente interactúan con sitios nucleofílicos, tales como grupos sulfhidrúlicos de enzimas y péptidos como el GSH (glutatión) y cisteína o grupos amino o hidroxilo presentes en el ADN, ARN o proteínas.⁶¹

El rol de los intermediarios reactivos en la inducción de la toxicidad es cada vez más estudiado y a éstos, actualmente se los clasifica en tres grupos:

- ✓ las *estructuras electrofílicas*, entre ellos, los epóxidos y quinonas

⁵⁷ Padhy, B. M., & Gupta, Y. K. Drug repositioning: Re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *Journal of Postgraduate Medicine Technology Review*, 57(2), 153-160. (2011)

⁵⁸ Kaiser M, Mäser P, Tadoori LP, Ioset JR, Brun R. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLoS One*. 2015 Aug 13;10(8).

⁵⁹ Bellera CL, Balcazar DE, Vanrell MC, Casassa AF, Palestro PH, Gavernet L, Labriola CA, Gálvez J, Bruno-Blanch LE, Romano PS, Carrillo C, Talevi A. Computer-guided drug repurposing: identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *Eur J Med Chem*. 2015 Mar 26;93:338-48.

⁶⁰ Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochemical pharmacology* 31: 3335-46, 1982

⁶¹ Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 3ª Ed. Klaasen CD, Amdur MO, Doull J (Eds). Macmillan Publishing Company, New York, p 70, 1986

- ✓ los *radicales libres*, que abarcan todas las especies reactivas que no son formas reducidas del O₂
- ✓ las *especies reactivas de oxígeno* (ERO), que son las derivadas de la reducción del mismo

Todas las células del organismo están expuestas constantemente a agentes oxidantes de origen endógeno y exógeno, además de la generación continua de radicales libres *in vivo*, ya que son parte integral del metabolismo oxidativo.⁶² Los radicales libres son especies con uno o más electrones no apareados en su orbital exterior por lo que resultan ser extremadamente reactivos. Pueden llevarse a cabo una variedad de reacciones como la formación de dobles enlaces, interacción con hidrógeno de otras moléculas o combinaciones con ellos mismos para formar dímeros.⁶⁰ Los radicales libres son esenciales para el desarrollo de muchos procesos biológicos, interviniendo por ejemplo, en la cadena respiratoria y en la respuesta a microorganismos invasores, a través de la acción de los fagocitos. Sin embargo, pueden dañar las células y tejidos si su producción no es controlada.⁶³

Algunos procesos iniciados por radicales libres son particularmente deletéreos debido a que son conservativos y propagativos. Es decir, las interacciones entre radicales y constituyentes celulares pueden producir radicales libres secundarios y terciarios derivados de macromoléculas como los lípidos, aminoácidos, GSH, ácido ascórbico y componentes de ácidos nucleicos. Uno de los procesos más conocidos como producto de la interacción de radicales libres con lípidos es la peroxidación lipídica (PL). Además, pueden activar al O₂ por reducción a anión superóxido (O₂^{•-}), con la formación de nuevas ERO. Los efectos acumulativos de tal cascada de reacciones pueden llevar a la muerte celular, resultando en necrosis tisular y fibrosis o pueden estimular el desarrollo de futuros neoplasmas.⁶⁰

Del estudio de la bioactivación de compuestos inertes a intermediarios reactivos surge que, a pesar del hecho que estos intermediarios son químicamente muy reactivos, las células están protegidas contra sus acciones. De hecho, se observa citotoxicidad sólo cuando las defensas celulares han disminuído significativamente, en especial el GSH tisular.⁶⁰

⁶² Hwang E. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology* 229: 1-10, 2007

⁶³ Rice Evans CA, Diplock AT, Symons MCK. Capítulo 2: Mechanisms of radical production. En: Techniques in free radical research. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Burdon RH, Van Knippenberg PH (Eds), Elsevier, p 19-50, 1991

Las defensas bioquímicas y enzimáticas incluyen, entre otros a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, GSH peroxidasa, GSH reductasa, GSH, α -tocoferol, ácido ascórbico y β -caroteno.

De esta manera, siempre que la homeostasis se mantenga entre la tasa de generación de radicales libres y la de eliminación de los mismos, la generación de radicales libres no será dañina para la célula. Al contrario, si las defensas celulares son disminuídas o si hay un aumento significativo en la generación de radicales, este balance puede romperse dando origen a lo que se denomina estrés oxidativo (EO).

1.4.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE NITROCOMPUESTOS:

Los compuestos pueden ser activados a intermediarios reactivos por mecanismos enzimáticos y/o no enzimáticos.

Algunos xenobióticos como 6-hidroxiopamina y 7,8-dihidroxiclorpromazina pueden autooxidarse, probablemente a la semiquinona radical respectiva, generando ERO. Los iones metálicos, tales como el hierro o cobre, facilitan este proceso y algunos agentes reductores como el ácido ascórbico intervienen en la regeneración del compuesto original, estableciéndose un ciclo redox no enzimático.⁶⁰ Sin embargo, la mayoría de los procesos por los cuales se generan radicales es a través de la catálisis enzimática.

En general, la probabilidad de que un compuesto pueda ser reducido enzimáticamente depende de su potencial de reducción por lo que, los compuestos con alta afinidad electrónica son más fácilmente reducidos por sistemas biológicos que otros.⁶⁰ Aunque el sistema del citocromo P₄₅₀ microsomal es clasificado como una oxigenasa, también cataliza la biotransformación reductiva de algunos xenobióticos cuando la presión de oxígeno es muy baja.⁶¹

Debido a la transferencia de equivalentes de reducción en las reacciones catalizadas por el citocromo P₄₅₀, algunos xenobióticos aceptan uno o dos electrones. Es decir, el sustrato acepta los electrones y se reduce, en lugar de hacerlo el oxígeno molecular. Los grupos nitro se reducen enzimáticamente de la misma manera que químicamente. Los equivalentes de reducción disminuyen el estado de oxidación del nitrógeno y el grupo nitro forma la amina mediante una serie de reacciones secuenciales. En la reducción están involucradas las llamadas nitrorreductasas, entre ellas muchas flavoenzimas y la NADPH citocromo P450 reductasa, además del citocromo P₄₅₀.⁶¹ Los

potenciales redox muy bajos, la baja especificidad de sustrato y las uniones fuertes de estos sistemas con el ligando hacen que se transfieran los electrones a xenobióticos, resultando una biotransformación reductiva en lugar de una oxidación, que es lo más frecuente.⁶¹

Existe consenso generalizado en cuanto a la asociación de la toxicidad de los nitrocompuestos (RNO_2) con la reducción metabólica de su grupo nitro por medio de nitrorreductasas.⁶⁴

El proceso comienza con una reducción catalizada por una flavoenzima que actúa sobre el grupo nitro formando el radical nitro anión ($\text{RNO}_2^{\bullet-}$).⁴⁹ La formación de intermediarios reactivos puede demostrarse utilizando espectroscopía de resonancia de spin electrónico (ESR), sin embargo, el espectro se obtiene solo bajo anaerobiosis dado que en presencia de O_2 , el intermediario reactivo se reoxida rápidamente al sustrato original.⁶⁰

La catálisis por parte de la NADPH citocromo P_{450} reductasa de la incorporación de uno o dos electrones a la vez determinará cuáles serán las ERO generadas. La toma de un electrón por parte de un RNO_2 , que tienen la capacidad de aceptar hasta seis electrones, genera el $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ que, en condiciones aeróbicas, le transfiere el electrón al O_2 regenerando el RNO_2 y produciendo $\text{O}_2^{\bullet-}$.⁶⁴

Este fenómeno causa una vía de transferencia de electrones entre el donador, generalmente NADPH, y la flavoproteína. La reacción del radical $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ con O_2 es usualmente más rápida que la habilidad de la enzima para agregar un segundo electrón, con lo que se inhibe la reducción posterior del RNO_2 por incorporación de un nuevo electrón.⁶⁵

Los xenobióticos involucrados en la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ son las sustancias llamadas generadoras de ciclos redox.⁶⁶ En cambio, la incorporación de dos electrones al RNO_2 genera intermediarios nitroso extremadamente reactivos, y la reducción por un electrón de éstos genera a su vez el radical hidronitróxido, que deriva luego de una segunda reducción en hidroxilamina.⁶⁵ En ambos casos, si el ciclo redox y/o la generación de intermediarios reactivos continuaran por tiempo indeterminado, los mecanismos de

⁶⁴ Docampo R, Moreno SNJ. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of *American trypanosomiasis* (Chagas disease). *Reviews in biochemical toxicology* 7: 159-204, 1985

⁶⁵ Biaglow JE, Varnés ME, Roizen-Towle L, Clark EP, Epp ER, Astor MB, Hall EJ. Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochemical pharmacology* 35: 77-90, 1986

⁶⁶ de Vries J. Capítulo 10: Cytotoxicity : molecular mechanisms of cell death. En: *Toxicology. Principles and applications*. Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (Eds). CRC Press, Boca Ratón, ISBN 0849392322, p 289-314, 1996

defensa celulares se verían excedidos, permitiendo la acumulación de estas especies radicales y el daño a las biomoléculas.⁶⁰

En resumen, una vez que se ha formado el RNO_2^{\bullet} se puede observar un aumento en la generación de radicales libres dependiendo de la oxigenación de la célula, o puede resultar un metabolismo en varias etapas enzimáticas. No solo puede existir cooperación entre sistemas enzimáticos sino que también pueden darse las reacciones puramente químicas.⁶⁰

1.4.2.1. ENZIMAS METABOLIZADORAS

Entre los sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo de xenobióticos se pueden mencionar a las enzimas microsomales oxidasas de función mixta y a las enzimas citosólicas xantino-oxidoreductasa (XO) y aldehído oxidasa (AO).⁶⁰

1.4.2.1.1. ENZIMAS MICROSOMALES

El citocromo P_{450} cumple un rol fundamental en este sistema enzimático, catalizando diferentes tipos de reacciones. Además se encuentran dos flavoproteínas, que transfieren los equivalentes de reducción tomados del NADPH, NADH y el citocromo b_5 .

El citocromo P_{450} es una hemoproteína con Fe en estado di y trivalente. y es el sitio de este sistema enzimático donde se unen el sustrato y el oxígeno. La NADPH citocromo P_{450} reductasa es la encargada de trasladar un electrón desde el NADPH y, alternativamente interviene la NADH citocromo b_5 reductasa incorporando un segundo electrón proveniente del NADH.⁶⁷

Debido a su importancia en el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos, el citocromo P_{450} está ampliamente distribuido en muchos órganos y tejidos, ubicándose en el retículo endoplásmico además de estar asociado a la membrana nuclear y mitocondrial. Dentro de los inhibidores del citocromo P_{450} en las reacciones oxidativas, el monóxido de carbono (CO) es uno de los más potentes ya que compite con el O_2 por el

⁶⁷ Blaauboer BM. Capítulo 3: Biotransformation: detoxication and bioactivation. En: Toxicology. Principles and applications. Niesink RJM, de Vries J, Hollinger MA (Eds). CRC Press, Boca Ratón, ISBN 0849392322, p 41-66, 1996

sitio de unión del citocromo P₄₅₀ reducido. Por otra parte, la catálisis de las reducciones de xenobióticos es inhibida por el O₂ ya que compite con el sustrato por los equivalentes de reducción.⁶¹

1.4.2.1.2. ENZIMAS CITOSÓLICAS

La XO y la AO son metaloflavoproteínas extremadamente similares entre sí y distintas de otras. Contienen molibdeno (Mo), FAD y hierro como grupos prostéticos y coexisten en varias especies, incluyendo al hombre. Catalizan la hidroxilación del sustrato incorporando oxígeno proveniente del agua en vez del O₂, como lo hace el sistema de oxidasas de función mixta. Ambas enzimas pueden oxidar una variedad de compuestos heterocíclicos nitrogenados, así como aldehídos alifáticos y aromáticos.⁶⁸

Respecto a la especificidad con los aceptores de electrones, estas enzimas se pueden clasificar como oxidasas ya que el O₂ es uno de los aceptores de electrones. Sin embargo, la XO se clasifica también como deshidrogenasa ya que existe una serie de compuestos que funcionan como aceptores electrónicos más afines que el O₂. Ejemplo de éstos son: la ferredoxina y el NAD.⁶⁸

Además, ambas enzimas pueden transferir electrones a una cantidad de agentes oxidantes. La XO probó transferir electrones al O₂, azul de metileno, nitratos, quinonas, H₂O₂, dinitrobenzenu, etc. La AO probó tener especificidades de sustrato similares a la XO con la excepción de las quinonas, como la menadiona, que resulta ser uno de los inhibidores más potentes de esta enzima. En este sentido, la reducción del O₂ por la XO y AO genera O₂^{•-} y H₂O₂, y la de nitrocompuestos aromáticos produce las correspondientes hidroxilaminas.⁶⁸ La actividad de esta enzima se ha detectado en todas las especies animales, incluyendo a las bacterias. En los mamíferos está ampliamente distribuida, y es en el hígado y los intestinos donde se encuentra en mayor proporción.

La enzima existente en los mamíferos se presenta en dos formas interconvertibles, la xantino-deshidrogenasa y la xantino-oxidasa y la reducción del O₂ por cualquiera de estas formas genera O₂^{•-} y H₂O₂ y es esta capacidad de generar ERO la que se asocia con el rol fisiopatológico de la XO.⁶⁹

El alopurinol, uno de los inhibidores de XO más utilizados, se convierte enzimáticamente en oxipurinol que luego se une estequiométricamente al sitio Mo

⁶⁸ Rajagopalan KV. Capítulo 14: Xanthine oxidase and Aldehyde oxidase. En: Enzymatic basis of detoxication, Vol 1. Academic Press Inc., ISBN 0-12-380001-3, p 295-309, 1980.

⁶⁹ Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free radical biology & medicine* 33: 774-97, 2002.

reducido de la enzima. Éste compuesto inactiva a la enzima por coordinación irreversible, inhibiendo la formación de ácido úrico. A pesar de que la unión es muy fuerte, la inhibición es dependiente del tiempo.⁷⁰ Como la XO puede aceptar electrones de otros sustratos diferentes de la xantina, el sitio FAD también está involucrado en la generación de ERO.

1.4.3. MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

1.4.3.1. MECANISMOS ENZIMÁTICOS

Existen tres clases de enzimas que protegen contra las ERO. Entre ellas, las catalasas y peroxidasas reaccionan específicamente con el H_2O_2 y las superóxido dismutasas catalizan la conversión del $O_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O_2 y son casi exclusivamente intracelulares.⁶⁶

De las dos enzimas que dispone la célula para eliminar el H_2O_2 , la catalasa contiene el grupo hemo y convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 , cooperando de esta manera con la remoción del H_2O_2 generado por dismutación del $O_2^{\bullet-}$. Se encuentra en los peroxisomas y su actividad es máxima a concentraciones altas de H_2O_2 . A diferencia de otras peroxidasas, la catalasa sólo cataliza la descomposición del H_2O_2 .⁶⁶

Las GSH-peroxidasa/ GSH-reductasa contiene selenio y cataliza la conversión de H_2O_2 así como también la de otros peróxidos orgánicos. Es específica para el GSH y se encuentra en la mayoría de los tejidos, tanto en el citosol como en las mitocondrias. Se encuentra en mayor proporción en los eritrocitos y en el hígado.⁶⁶

1.4.3.2. MECANISMOS NO ENZIMÁTICOS

Las enzimas detoxificantes descritas conforman la primera línea de defensa, ya que evitan que los radicales $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 se conviertan en OH^{\bullet} . La segunda línea de defensa la constituyen un grupo de sustancias que eliminan los radicales, entre ellas las vitaminas E y C que, dada su lipofilicidad e hidrofílicidad, se ubican en las membranas y en el citosol, respectivamente. La vitamina C reacciona rápidamente con $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 pero aún más rápido con OH^{\bullet} , además de poder eliminar el oxígeno sigulete (1O_2).⁶⁷ Los radicales que surgen durante las reacciones de detoxificación llevadas a cabo por estas vitaminas son

⁷⁰ Tamta H, Kalra S, Mukhopadhyay AK. Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine-based inhibitors of xanthine oxidase. *Biochemistry (Moscow)* 71: 49-54, 2006

menos reactivos debido a que se estabilizan por resonancia y son transformados en la vitamina de origen por sistemas dependientes de GSH.⁶⁷

1.4.4. INTERACCIONES ENTRE INTERMEDIARIOS REACTIVOS Y MACROMOLÉCULAS

1.4.4.1. TIPOS DE INTERACCIONES

Las interacciones principales de los metabolitos intermediarios son las reacciones covalentes y las oxidaciones, que pueden incluir EO y PL.⁶⁷

Los intermediarios reactivos pueden unirse covalentemente a macromoléculas tales como ácidos nucleicos, proteínas, cofactores, lípidos y polisacáridos. Los efectos potenciales pueden ser, entre otros, la disminución de la producción de energía, cambios en la permeabilidad de la membrana e inhibición de la síntesis de macromoléculas. Por otra parte, un nivel constante de reacciones de oxidación dentro de un organismo genera una disminución de equivalentes de reducción que son utilizados para contrarrestar a estas reacciones oxidativas. Cuando se superan los niveles normales y los equivalentes de reducción disminuyen notablemente, se produce el llamado EO. Los equivalentes de reducción almacenados en las células son el NADPH, GSH, sulfhidrilos protéicos y las vitaminas E y C y entre ellos, el GSH es una de las reservas más importantes.⁶⁷

Las células con bajos niveles de GSH serán vulnerables a los hidroperóxidos lipídicos producidos por los OH^\bullet durante el ciclo redox del RNO_2 , que ocurre en presencia de O_2 .⁶⁵ Además, la acumulación de H_2O_2 probó ser causa de daño celular y depende de los niveles de GSH intracelular.

Entre las causas de EO más importantes se encuentran las ERO y entre ellas, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede interactuar directamente con grupos sulfhidrilos.

En conclusión, las sustancias generadoras de ciclos redox pueden aumentar la producción de ERO y el consumo de los equivalentes de reducción. Además, este tipo de sustancias pueden reaccionar directamente con moléculas que intervienen en la defensa celular, disminuyéndolas aún más.⁶⁷

1.4.4.2. DAÑO CELULAR

El radical OH^\bullet es la ERO más reactiva y se supone que es el responsable de los daños que ocurren durante los procesos redox, como peroxidación de lípidos de membrana y daño a proteínas y ADN.⁷¹ Debe existir una disminución significativa de los niveles de defensa para que una ERO u otro radical libre pueda iniciar la PL. Además, es necesario que la generación de radicales se mantenga por un período suficiente para que se observe un aumento de la misma.⁶⁰

La PL es un proceso de degradación oxidativa de los lípidos mediado por radicales libres, de naturaleza autocatalítica e involucra principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados. Para producirse se deben dar las tres etapas consecutivas de iniciación, propagación y terminación, en las que se generan como subproductos gran cantidad de radicales libres, compuestos carbonílicos, hidroperóxidos y aldehídos.⁷²

Las membranas celulares están compuestas principalmente por fosfolípidos, que contienen ácidos grasos insaturados. Dada la naturaleza insaturada de estas cadenas, las membranas están sujetas naturalmente a las reacciones de oxidación mediadas por radicales y esto se ve aumentado por el hecho que el O_2 es más soluble en regiones hidrofóbicas lipídicas. Un aumento significativo en el flujo de ERO resultaría en una mayor oxidación de las sustancias que captan radicales y, la peroxidación de los lípidos de la membrana llevaría a la pérdida de fluidez de la misma y de la compartimentalización celular. A su vez, el daño protéico por ERO produce la oxidación de aminoácidos, llevando a cambios conformacionales e inactivación enzimática y el daño al ADN lleva a citotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad.⁷¹

1.5. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL NFX Y DEL BZN

1.5.1. ENZIMAS INVOLUCRADAS

Al momento, está consensuada la noción de que tanto NFX como BZN actúan como pro-drogas que necesitan ser activadas mediante reducción enzimática para poner de manifiesto su actividad citotóxica⁷³. Sin embargo, recién en los últimos años se avanzó en

⁷¹ Kappus H. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochemical pharmacology* 35: 1-6, 1986.

⁷² Castro GD, Castro JA. Reacciones de abstracción de hidrógeno de los radicales libres, peroxidación de lípidos y toxicología. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 24: 127-46, 1990.

⁷³ Urbina J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* 115. 55-68, 2010.

clarificar los detalles moleculares de tales mecanismos. Ambas drogas son activadas mediante flavoproteínas llamadas nitroreductasas de Tipo I (NTR) tales como la “vieja enzima amarilla” (TcOYE, del inglés: “old yellow enzyme”)^{74,75} y una NTR mitocondrial descrita hace pocos años.⁷⁶

Así mismo, el estudio de la acción de diversos inhibidores sobre la reducción del NFX en microsomas hepáticos de rata demostró que ésta es catalizada por la enzima NADPH citocromo P₄₅₀ reductasa. La ausencia de efectos de inhibidores específicos del citocromo P₄₅₀, tales como el CO y metirapone, sobre la formación del radical RNO₂^{•-} indica que éste no estaría involucrado en la reacción de reducción inicial. Sin embargo, estos compuestos inhiben el consumo de O₂ y de la oxidación del NADPH producidas por el NFX, por lo que el citocromo P450 intervendría en la conversión del radical RNO₂^{•-} en otros productos de reducción del NFX.⁷⁷

Además de las enzimas microsomales, se sabe que en la reducción del NFX participa la nitroreductasa dependiente de NADPH ubicada en la membrana externa de la mitocondria.⁷⁸ Por su parte, en la fracción citosólica de varios tejidos, la XO probó nitrorreducir al NFX y BZN, al igual que la AO hepática.

En ensayos llevados a cabo con BZN se comprobó que NADP y p-hidroximercuribenzoato inhiben el consumo de O₂ y la formación de O₂^{•-} y, tanto SKF-525-A como metirapone resultaron negativos. Los primeros resultados indican la participación fundamental de la NADPH P₄₅₀ reductasa microsomal, mientras que los segundos indican que el citocromo P₄₅₀ no intervendría mayormente en el primer paso de la nitrorreducción.⁷⁹ Sin embargo, al igual que con NFX, la participación del citocromo P450 en los pasos reductivos posteriores no se descarta.

⁷⁴ Kubata, B.K., Kabututu, Z., et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *T. cruzi*. *J. Exp. Med.* 196 (9), 1241–1251. 2002

⁷⁵ Murta, S.M., Krieger, M.A., et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146 (2), 151–162. 2006

⁷⁶ Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (13), 5022–5027. 2008

⁷⁷ Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM. Nitrofurantoin enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics* 207: 316-24, 1981

⁷⁸ Moreno SNJ, Mason RP, Docampo R. Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. Evidence of an outer membrane-located nitroreductase. *The Journal of biological chemistry* 259: 6298-305, 1984

⁷⁹ Moreno SNJ, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AOM. Different behaviours of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of biochemistry and biophysics* 218: 585-91, 1982

1.5.2. NIFURTIMOX: MECANISMOS DE ACCIÓN TRIPANOMICIDA

El modo de acción tripanocida del NFX está asociado a la generación del RNO_2^{\bullet} y la subsiguiente autooxidación que genera O_2^{\bullet} y H_2O_2 . Aunque el *T. cruzi* posee SOD, no tiene catalasa y GSH-peroxidasa y tiene sólo bajos niveles de una peroxidasa alternativa que utiliza ascorbato.⁶⁴

Entre resultados obtenidos en ensayos *in vitro* e *in vivo* se puede resumir que: El NFX puede ser reducido enzimáticamente por flavoproteínas en un proceso de intercambio de un electrón y los radicales RNO_2^{\bullet} formados usualmente reducen el O_2 a O_2^{\bullet} , regenerándose el NFX e iniciándose un ciclo redox que produce grandes cantidades de O_2^{\bullet} . Éste dismuta a H_2O_2 y O_2 en una reacción catalizada por la SOD. A su vez, O_2^{\bullet} y H_2O_2 pueden formar parte de reacciones catalizadas por metales para formar ERO más tóxicas, como el OH^{\bullet} y el $^1\text{O}_2$. Estas reacciones pueden llevar a daño permanente en el ADN, inhibición enzimática, PL y oxidación de grupos sulfhidrúlicos de proteínas.⁸⁰

De esta manera, estas reacciones parecen conformar los mecanismos más razonables que subyacen a la compleja cadena de reacciones que lleva a alteraciones bioquímicas y ultraestructurales observadas en *T. cruzi* tratado con NFX.⁶⁴

1.5.3. BENZNIDAZOL: MECANISMOS DE ACCIÓN TRIPANOMICIDA

A fines de los 60 se reportó por primera vez la actividad de 2-nitroimidazoles en infecciones experimentales por *T. cruzi* y, a principios de los 70, el BZN probó ser tan efectivo como el NFX en el control de infecciones agudas en animales y en cultivo celular.⁶⁴

Además de su uso en el tratamiento de enfermedades bacterianas y parasíticas, los nitroimidazoles se han utilizado en la quimioterapia del cáncer, como agentes citotóxicos y radiosensibilizadores.

Se ha propuesto una nitroreducción enzimática (de tipo II) de BNZ, mediante una serie de reacciones secuenciales con potenciales redox muy bajos, que daría lugar al amino derivado ($\text{NH}_2\text{-BNZ}$), en donde la formación del radical RNO_2^{\bullet} es el primer paso de bioactivación común. También está propuesta una vía de nitroreducción (de tipo I) en

⁸⁰ Hwang E. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology* 229: 1-10, 2007

donde el último derivado correspondería a un nitrilo ($C\equiv N$) altamente tóxico para la célula del parásito y del huésped. En este último caso, la especificidad estaría dada por la expresión de las nitroreductasas de tipo I exclusivamente en el parásito.⁸¹

1.6. FUNDAMENTOS DEL USO DE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

Las distintas hipótesis planteadas respecto al comportamiento de los nitrocompuestos, tanto de su actividad tripanocida como de los efectos adversos producidos en pacientes tratados con fármacos derivados de dichos compuestos, se asemejan en la premisa de que éstos actúan debido a una reducción electroquímica en su estructura molecular. En algunos de los trabajos citados, se observa la reducción del grupo nitro del compuesto hasta la obtención de la hidroxilamina⁸² a través de diferentes intermediarios reactivos, mientras que otros trabajos postulan al glioxal como producto final⁸³ sin descartar la formación de la hidroxilamina y su unión con ácidos nucleicos y proteínas. Se mencionan distintos intermediarios de estas vías metabólicas que se obtienen por la transferencia de uno o más electrones y probablemente por la presencia o ausencia de O_2 .

La toxicidad aeróbica crónica que pueden producir los nitroimidazoles, está relacionada con la afinidad electrónica que poseen, sugiriendo además que los procesos redox están involucrados en cada uno de estos fenómenos.⁸² Así, se observa la importancia de los procesos redox en la activación de los nitrocompuestos para ejercer su acción tóxica.

1.6.1. DEFINICIONES SOBRE ELECTROQUÍMICA

La *electroquímica* es la disciplina química que trata el estudio de los procesos y factores que afectan el transporte de carga a través de la interfase formada entre dos fases, generalmente un electrodo y una disolución en contacto con él.

⁸¹ Wilkinson SR & Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev. in Molec. Med.* Vol 11; e31 Cambridge University Press, 2009

⁸² Bartel L.C. Estudio de los efectos laterales tóxicos de fármacos antichagásicos en tejido mamario de rata. Tesis para optar al grado de Doctor en Química. Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional de San Martín. 2009

⁸³ Wilkinson S.R., Taylor M.C., Horn D., Kelly J.M., Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105:5022–5027

La *electroquímica analítica* puede definirse como el estudio de los procesos de reacción que ocurren en la interfase conductor – disolución, generados espontáneamente o por medio de una perturbación externa, con el objetivo de resolver un problema de tipo químico.

Los procesos de reacción son el conjunto de eventos que ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación del tipo eléctrico. De todos los procesos de reacción, el principal es la reacción electroquímica y la magnitud de su respuesta dependerá de los demás eventos que la acompañen. Éstos transcurren durante la imposición de la perturbación y dependen del tiempo y la manera en que ésta se mantiene. Al cesar la perturbación se alcanza un nuevo estado de equilibrio.

De acuerdo al tipo de perturbación que se imponga será el tipo de respuesta que se manifestará y de ella dependerá el tipo de información que se obtendrá para caracterizar a las moléculas, las reacciones al electrodo, la cantidad de analito y la forma en que acontece dicha transformación. Si se impone una diferencia de potencial se obtendrá una corriente de electrólisis; en cambio, si se impone una corriente constante la respuesta se manifestará por medio de un cambio de potencial en la interfase conductor – disolución. Las técnicas electroquímicas pueden dividirse de acuerdo a la manera en que realizan mediciones y la perturbación del sistema.⁸⁴

1.6.2. USOS DE LA ELECTROQUÍMICA

El interés en la electroquímica de las sustancias orgánicas ha crecido continuamente en las últimas décadas. Sus técnicas se aplican al análisis y síntesis de compuestos orgánicos, a la elucidación o confirmación de estructuras, al estudio de intermediarios y a la obtención de información mecanística de las posibles reacciones químicas homogéneas que anteceden o suceden a la(s) transferencia(s) de carga. Son importantes también sus posibilidades en la investigación de la naturaleza de la actividad catalítica, en el estudio de las relaciones entre estructura y electroactividad, en electropolimerizaciones y en el estudio de sistemas redox biológicos.

Las síntesis por vía electroquímica frecuentemente tienen buenos rendimientos y se llevan a cabo a temperatura más baja que los procesos térmicos comparables. Cuentan

⁸⁴ Baeza Reyes A., García Mendoza A.J. Principios de Electroquímica Analítica. UNAM 6/1/2011

además con la ventaja de usar equipos simples, relativamente poco costosos y de fácil control automático. Los procesos electroquímicos suelen tener una mayor selectividad que los que usan compuestos químicos como agentes oxidantes o reductores debido a la existencia de un parámetro adicional tal como el potencial de electrodo.

Puesto que los productos de reacción son generados en o cerca de la interfase, muchas técnicas electroquímicas dinámicas pueden, no sólo generar los intermediarios, sino también detectar y analizar las reacciones homogéneas o electroquímicas posteriores de estos resultando de gran utilidad en el análisis de mecanismos de reacción.

Finalmente puede decirse que los procesos electrosintéticos son ambientalmente benignos pues disminuye la posibilidad de formación de subproductos y productos secundarios; además, la posibilidad de trabajar principalmente a temperatura ambiente, favorece la selectividad de ciertas reacciones sólo por modificación del potencial aplicado. Por otro lado, hay muchas reacciones que sólo pueden llevarse a cabo electroquímicamente, por ejemplo, reacciones que involucran el acoplamiento de dos electrófilos o dos nucleófilos, que químicamente serían imposibles o muy dificultosos pues involucrarían muchas etapas.

La electroquímica se ha convertido en una poderosa herramienta de síntesis, aunque su implantación industrial avanza lentamente. La incorporación de la electrosíntesis orgánica a las líneas de producción de la industria química permite nuevas oportunidades de enfrentarse a los desafíos tecnológicos que el mundo industrial impone en busca de sistemas eficientes, pero sustentables. Existe un número relativamente importante de reacciones electrosintéticas de moléculas orgánicas. El costo de estos procesos es similar al de los procesos térmicos usados comúnmente, pero en general con menor daño ambiental. La electrosíntesis es un aspecto sumamente importante de la electroquímica, poco desarrollado en nuestro país y en franco crecimiento en el mundo debido a la creciente preocupación por aspectos ecológicos de las actividades de producción de sustancias químicas.

1.7. CONTEXTO DEL TRABAJO DE TESIS

El presente trabajo de tesis, pretende exponer los resultados hallados sobre los diferentes estudios farmacológicos desarrollados en el contexto de la terapéutica de la Enfermedad de Chagas pediátrico.

La farmacología, estudia como interactúan los fármacos con el organismo, sus acciones y propiedades. Tiene aplicaciones clínicas cuando las sustancias son utilizadas en el diagnóstico, prevención y tratamiento de una enfermedad o para el alivio de sus manifestaciones. Si bien podríamos encuadrar los estudios de esta tesis dentro de esta gran área, los desarrollos se enfocaron en la generación de herramientas bioanalíticas que permitan la detección y cuantificación de los fármacos en estudio y sus metabolitos. Estas herramientas fueron caracterizadas como farmacométricas, atendiendo a la definición etimológica de la palabra. Con su aplicación se evaluaron estudios clínicos de farmacocinética/toxicocinética poblacional pediátrica de BZN y NFX, se abordó el análisis del riesgo de exposición al lactante a concentraciones elevadas de dichos fármacos a través de la leche materna y se realizó una búsqueda e identificación de metabolitos plasmáticos y urinarios del BZN.

La farmacocinética se define como una rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo en función de tiempo. Trata de dilucidar qué sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo.

En cambio, se utiliza el término toxicocinética cuando la sustancia a evaluar, ya sea por los niveles de concentración en los que se trabaja o por desconocimiento del efecto que produce, son considerados tóxicos. Las principales diferencias se producen en los objetivos y métodos de cada uno. Mientras que la farmacocinética estudia conforme a protocolos e indicadores ya establecidos, la toxicocinética no puede disponer de ellos porque los compuestos tóxicos son impredecibles. Otra diferencia es que la farmacocinética contribuye a la definición de la actividad de un medicamento, mientras que la toxicocinética busca los efectos de la exposición para predecir el riesgo y la tolerancia.

Los estudios clínicos pretendieron abordar estas dos definiciones, por un lado para determinar parámetros farmacocinéticos no evaluados en pacientes pediátricos hasta el momento, y por el otro para poder trazar un límite definido sobre el proceso toxicocinético/farmacocinético asociado a la excreción de BZN en la leche materna. En ambos casos, se suma también la evaluación del rol de las concentraciones de los fármacos en estudio y su incidencia en la aparición de eventos adversos durante la terapéutica.

Estos conceptos son los ejes conductores a largo de los distintos capítulos y son parte de las estrategias a abordar definidas en los objetivos de los trabajos enmarcados en esta tesis.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aportar estudios sobre fármacos antichagásicos actualmente en uso, que permitan proponer farmacoterapéutica racional de la Enfermedad de Chagas, en contexto de pediatría. La población pediátrica ha sido huérfana de estudios farmacológicos para esta patología, aunque los fármacos hoy en uso han demostrado una gran efectividad potencial.

A su vez, se busca mejorar los protocolos de tratamiento actualmente existentes, para permitir un uso más seguro y racional de los fármacos en niños y eventualmente en adultos.

2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(1) Desarrollar técnicas analíticas de laboratorio mediante el uso de HPLC-UV, HPLC-MS/MS para la detección y cuantificación de BNZ, NFX y sus metabolitos, en muestras biológicas de interés pediátrico.

(2) Búsqueda de metabolitos: Estudiar las vías de reducción de BNZ para la obtención y caracterización de amino derivados *in vitro*, asociándolos luego con lo hallado en las matrices biológicas de interés pediátrico. En este sentido, se abordará la búsqueda, detección e identificación de compuestos relacionados con la droga madre para BZN en dichas matrices, para dilucidar aspectos no conocidos del metabolismo de esta droga.

(3) Aportar en la evaluación de la transferencia de los fármacos BZN y NFX a la leche materna. Se busca poder determinar si existe riesgo de exposición al lactante a altas concentraciones de dichos fármacos.

(4) Mediante las herramientas farmacocinéticas desarrolladas se plantea aplicar un modelo de farmacocinética poblacional para BNZ, para pacientes pediátricos con Enfermedad de Chagas. Se espera que los resultados obtenidos puedan aportar información respecto de un régimen de BZN adaptado a la edad para la población pediátrica, así como relacionar las concentraciones de los mismos y su incidencia en la aparición de eventos adversos (ADRs) en la terapéutica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

Se abordarán en este capítulo todos los estudios y desarrollos realizados (concluyentes o no) en el contexto farmacométrico propuesto para las matrices biológicas, haciendo foco en nuestro interés en contextos pediátricos.

Este contexto determina cotas a los volúmenes de muestras disponibles y a los rangos de las concentraciones posibles, tanto de las drogas madre, como de sus metabolitos en las técnicas desarrolladas.

3.1. MATRICES BIOLÓGICAS ESTUDIADAS:

Los trabajos se desarrollaron abordando en cada instancia alguna de las siguientes matrices biológicas humanas en el contexto pediátrico: plasma heparinizado, sangre entera, leche materna, orina de 24 horas.

Tanto para BZN como para NFX las dosis utilizadas fueron las expuestas en el **Capítulo I: 1.3.4.3. Disponibilidad de los fármacos y consideraciones sobre la terapéutica tripanocida.**

Los consentimientos informados, protocolos propuestos y los avales del comité de ética del HNRG, obtenidos para la realización de estudios clínicos se presentan en el **ANEXO 7.3**

3.1.1. PLASMA HUMANO:

3.1.1.1. COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

El plasma es la fracción líquida y acelular de la sangre. Se obtiene al centrifugar la sangre en presencia de anticoagulantes, separando las células como los glóbulos rojos y los glóbulos blancos del líquido que las rodea y contiene. Es un líquido ligeramente más viscoso que el agua, coloreado en la gama de amarillos que según el estado metabólico del individuo puede ser más intenso y concentrado en algunos casos y en otros la coloración es tenue y casi transparente. Parámetros como la densidad, oxigenación y el pH del plasma también están íntimamente relacionados con el estado metabólico del individuo.

Su composición desde el punto de vista de las moléculas y macromoléculas que lo componen será en términos medios: un 90 % de agua, un 7 % de proteínas, y el 3 %

restante por lípidos, glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo como el ácido úrico, urea y sales.

En las determinaciones farmacométricas, generalmente se utiliza el plasma como matriz biológica para la detección, identificación y cuantificación de drogas, pero en algunas situaciones en las cuales la presencia del anticoagulante pueda interferir con el desarrollo analítico, la detección o la identificación, el suero debería ser la matriz de elección. Éste, a diferencia del plasma, es el remanente del plasma sanguíneo una vez consumidos los factores hemostáticos mediante la cascada de reacciones que tienen lugar en el proceso de coagulación de la sangre.

Las drogas estudiadas se espera que estén en el mismo orden de concentraciones que los elementos constituyentes. Por otro lado, fundamentalmente las proteínas y otros elementos mayoritarios, actuarán como interferencias en la detección y cuantificación para la mayoría de los métodos cromatográficos, de manera que deben ser eliminadas en las etapas preanalíticas de preparación de la muestra.

3.1.1.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Población objetivo: Pacientes pediátricos ambulatorios. Los criterios de selección de pacientes se resumen en la siguiente **Tabla 3.1.1.2.1.**

Selección y tamaño de la muestra:

La cantidad de pacientes estuvo supeditada a la disponibilidad de los mismos que acudieran al servicio de pediatría del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez y que cumplieran con todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión (**Tabla 3.1.1.2.1**). Se reclutaron en total 40 pacientes que participaron del estudio en algunas de sus etapas. Los pacientes fueron divididos en tres grupos.

- A. Pacientes que recibieron su primera dosis.
- B. Pacientes en fase de estado estacionario.
- C. Pacientes que recibieron la última dosis.

Las muestras fueron obtenidas por punción venosa utilizando heparina como anticoagulante.

Tabla 3.1.1.2.1.

| Criterios | |
|---------------------|---|
| de Selección | |
| | Niños de 2 a 12 años, con infección por <i>T. cruzi</i> |
| | Niños de 2 a 12 años de ambos sexos en plan de tratamiento con BNZ por Enfermedad de Chagas. |
| de Inclusión | |
| | Diagnóstico de Enfermedad de Chagas al presentar al menos dos técnicas serológicas reactivas: ELISA, hemoaglutinación y aglutinación de partículas. |
| | En tratamiento por Enfermedad de Chagas con BNZ desde su inicio y hasta 60 días de tratamiento. |
| | Consentimiento informado de los padres y asentimiento del menor a participar. |
| de Exclusión | |
| | Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad al BNZ. |
| | Sujetos inmunocomprometidos: historia compatible con VIH-SIDA, enfermedades oncológicas, tratamiento prolongado con corticoides orales, inmunodeficiencias primarias. |
| | Función hepática alterada. |
| | Función renal alterada. |
| | Embarazo. |

3.1.2. ORINA HUMANA:

3.1.2.1. COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS:

La orina es el producto del ultrafiltrado renal de la sangre. Es un líquido acuoso transparente y amarillento, de olor característico, secretado por los riñones y eliminado al exterior por el aparato urinario. Análogamente a lo dicho para el plasma, la densidad, el pH, el color, el olor, el aspecto macro y microscópico de la misma nos da cuenta del estado metabólico del individuo. Las funciones del sistema urinario a través de la orina influyen en la homeostasis de los organismos mediante las siguientes funciones:

- ✓ eliminación de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo endógeno
- ✓ eliminación de sustancias tóxicas producto del metabolismo exógeno
- ✓ control electrolítico mediante la regulación en la excreción de sodio y potasio
- ✓ regulación hídrica mediada por la volemia, manteniendo la presión arterial
- ✓ control del equilibrio ácido-base

La orina normal contiene 95 % de agua, 2 % de sales minerales y 3 % de urea y ácido úrico. Cerca de la mitad de los sólidos lo constituye la urea, el principal producto de

degradación del metabolismo de las proteínas. El resto incluye nitrógeno, cloruros, cetosteroides, fósforo, amonio, creatinina y ácido úrico.

En general, las concentraciones a medir de las drogas de interés estarán en el orden de 0,01 mg/mL, lo que permite definir un rango de trabajo para las técnicas de dosaje, ubicado por encima de 0,001 mg/mL y por debajo de 0,1 mg/mL. Los componentes de la orina tales como el urobilinogeno, la creatinina, la presencia de proteínas podrían actuar como interferencia, por tal motivo se debe tratar a la orina mediante algún proceso para eliminar/separar las posibles interferencias.

3.1.2.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los criterios de selección de pacientes pediátricos fueron los mismos que se plantearon para la obtención de muestras de plasma. También se trabajó con orina humana de voluntario adulto sano que tomó una monodosis de BZN (sin consumir ningún otro tipo de fármaco al menos por 15 días antes de la recolección de la orina).

Las muestras de orina estudiadas fueron obtenidas por recolección total del volumen de orina producido durante las micciones de 24hs (diuresis), almacenados en frasco limpio y estéril en freezer (-18 °C).

3.1.3. LECHE MATERNA HUMANA:

3.1.3.1. COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS:

La leche materna es una suspensión acuosa de micronutrientes y macromoléculas (glúcidos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) células, hormonas, factores de crecimiento, inmunoglobulinas, enzimas, entre otros.

Esta suspensión tiene una composición variable entre individuos y para un mismo individuo también puede variar dependiendo de factores como: la ingesta, la actividad física, la hora del día en la que se toma la muestra entre otras cosas, y para una extracción dada la composición cambia dependiendo si es el comienzo o el final de la extracción. Todas estas variaciones son funcionales, la leche materna humana tiene el potencial de adaptarse a las necesidades individuales de cada lactante.

Los fármacos bajo estudio tienen un rango de interés clínico de entre 1 a 20 µg/mL. Éste rango está definido en su cota inferior por un valor de seguridad para el lactante y en su cota superior por valores máximos esperados para una excreción del 100% en el pico de BNZ plasmático en un paciente bajo tratamiento según protocolo. Los componentes de

la leche como las proteínas y los lípidos entre otros, podrían actuar como interferencias, por lo que se recomienda una etapa de desproteinización de esta matriz.

3.1.3.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Obtención de muestra:

Para la selección de pacientes, las madres en etapa de amamantamiento deben cumplir con todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión (**Tabla 3.1.3.2.1.**)

Las muestras de leche materna para el dosaje de los fármacos en estudio se obtienen en un volumen aproximado de 10 mL, por expresión en un frasco estéril, con registro de día y horario de la muestra por parte del paciente. Las muestras se conservan a -20°C hasta su posterior procesamiento.

Tabla 3.1.3.2.1.

| Criterios | |
|--------------|--|
| de Inclusión | |
| | Mujeres lactantes con Enfermedad de Chagas |
| | Uso de métodos anticonceptivos |
| de Exclusión | |
| | Antecedentes de alergia o efectos adversos severos asociados al BNZ o NFX, o alguno de sus excipientes, en la madre o en el bebé amamantado. |
| | Embarazo. |
| | Enfermedad sistémica significativa que según el criterio del investigador principal interfiera con la interpretación de los resultados. |
| | Madres cuyos bebés lactantes se encuentren recibiendo medicamentos que pudieran presentar eventos adversos similares a los de los medicamentos antichagásicos: vómitos, diarrea, cefaleas o reacciones cutáneas alérgicas y otras, que a criterio del investigador pudieran confundir la interpretación de los resultados. |
| | Madres cuyos bebés lactantes presenten enfermedades sistémicas significativas, que a criterio del investigador puedan interferir con la interpretación de los resultados. |

3.1.4. SANGRE ENTERA EN PAPEL DE FILTRO:

3.1.4.1. COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

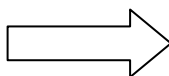
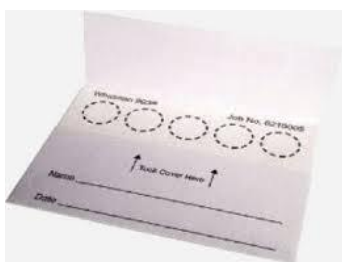
La **sangre** es un tejido especializado del tipo conectivo y de consistencia semilíquida.

En la **composición de la sangre** hay dos fracciones principales. Estas son la fracción líquida (plasma) y la fracción celular (eritrocitos y glóbulos blancos). Es un líquido viscoso de coloración rojo intenso donde las propiedades fisicoquímicas son muy aproximadas a las de la fracción líquida de la sangre (plasma).

3.1.1.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los criterios de selección de pacientes fueron los mismos que se plantearon para la obtención de muestras de plasma pediátrico.

Las muestras de sangre se obtienen por punción venosa con heparina como anticoagulante y desde jeringa gota a gota se embebe la superficie limitada por una circunferencia impresa en un papel de filtro.



Papel de filtro recolector de sangre entera.

Forma correcta de llenado con la muestra

3.2. DETERMINACIONES REALIZADAS

3.2.1. DOSAJES DE BZN

3.2.1.1. EVOLUCIÓN EN EL DESARROLLO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN PLASMA HUMANO POR HPLC

Preparación de soluciones patrón de BZN

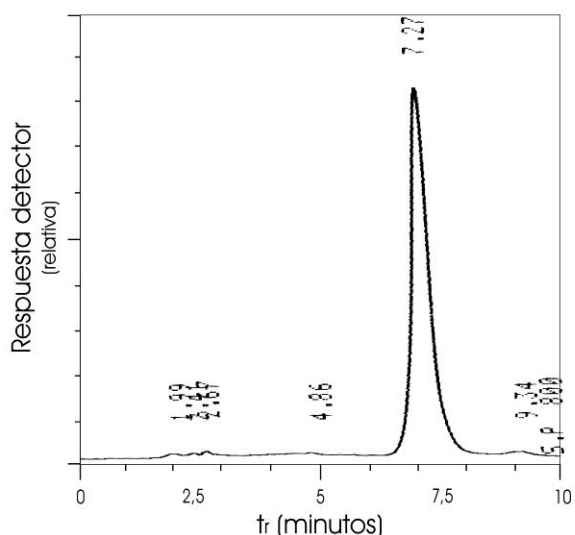
Se dispuso de BZN, de grado de pureza indeterminado, provisto por Roche Argentina. Este se presenta como una sustancia pulverulenta, de granulación regular, inodora e incolora. Se evaluó en una primera instancia la solubilidad de la droga sólida en

distintos solventes orgánicos. Estos resultados se exponen en la sección **Resultados: Tabla 4.2.1.1.**

Se preparó una solución patrón (SP) de concentración 4,512 mg/mL, mediante la solubilización total de la droga sólida por agregados consecutivos de volúmenes de DMSO y luego el enrrase en matraz de 5,00 mL con acetato de etilo.

Se comprobó la pureza cromatográfica del patrón mediante las condiciones cromatográficas descritas en la **Tabla 3.2.1.1.1** presentada a continuación, observándose la ausencia de impurezas significativas, como podemos apreciar en el siguiente cromatograma de la **Figura 3.2.1.1.1.**

Figura 3.2.1.1.1.



Soluciones de trabajo (ST) de 18,048 $\mu\text{g/mL}$ y 4,512 $\mu\text{g/mL}$, se prepararon por la dilución de cantidades adecuadas de SP en solvente de corrida (más adelante se explica la selección del solvente de corrida). Se verificó la estabilidad de las soluciones, conservadas a 5°C, observándose que después de 6 meses, no hay pérdida significativa del título.

SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS EVALUADOS:

Para la selección de la longitud de onda se realizó barrido del espectro UV para localizar los máximos de absorción. Si bien se halló más un máximo de absorbancia se

eligió una longitud de onda donde se esperaba que la interferencia por parte de otros compuestos fuera mínima. **Ver Resultados: Gráfico 4.2.1.1.**

En base a las publicaciones existentes al inicio de nuestros desarrollos con BZN,^{85,86,87} y teniendo en cuenta estimaciones teóricas respecto de la polaridad del compuesto y su solubilidad en distintos solventes y buffers, se realizaron ensayos cromatográficos con las ST realizadas de BZN corroborando que respondieran aceptablemente a la relación señal/ruido del equipo.

Se probó una columna de relleno C-18 de dimensiones: 100 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Se evaluaron tiempos de retención, resolución de picos cromatográficos en distintas condiciones de flujo y fase móvil. Se evaluó un modo cromatográfico de fase reversa y para distintos gradientes y fases móviles fijas para un sistema isocrático. **Ver en Resultados: Tabla 4.2.1.3.**

De estos ensayos se eligió la fase móvil, la longitud de onda y la composición de los solvente de disolución del BZN que generaron las mejores respuestas cromatográficas, tal como se indica en la **Tabla 3.2.1.1.1.** La elección de un buffer con par iónico fue en virtud de las propuestas de la bibliografía consultada.⁸⁶ El buffer glicina se preparó con una solución 0,20 M en glicina, 5,00 mM en ONA y llevado a pH 2,5 con HCl concentrado.

Tabla 3.2.1.1.1.

| Condiciones cromatográficas seleccionadas | |
|---|--|
| Columna: | C-18; (100 x 4,6) mm. 5 µm |
| Fase Móvil: | Buffer Glicina-ONA: Acetonitrilo (70:30) |
| Flujo: | 1 mL/min |
| Longitud de onda: | 313 nm |

Para el desarrollo de un método para la extracción, detección y cuantificación por HPLC-UV de BZN en plasma humano, en una primera instancia se evaluaron las técnicas propuestas en bibliografía.^{85,86,87}

⁸⁵ Raaufaub J, Ziegler WH. Single-dose pharmacokinetics of the trypanomicide benznidazole in man. *Arzneim Forsch Drug Res* 1979;29:1611–1614

⁸⁶ Walton MI, Workman P. Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the 2-nitroimidazole benznidazole and its amine metabolite in biological fluids. *J Chrom* 1986;375:190–196

⁸⁷ Guerrero L, Pinazo MJ, Posada E, Gascón J, Ribas J, Soy D. A high-performance liquid chromatographic method for benznidazole quantitation in plasma of patients with Chagas disease. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:77–82

Se probaron las siguientes variantes de extracción. Las recuperaciones de BZN encontradas para cada variante se exponen en **Resultados: Tabla 4.2.1.1.1.**

EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO VARIANTE (1):

Para 2,0 mL de plasma oxalatado adicionado con BZN a concentración fija conocida, se le adicionó 4,0 mL de agua y 2,0 mL de ácido metafosfórico al (20%p/v). Se vorteoó enérgicamente por el lapso de 30 segundos y se centrifugó a velocidad máxima 10 minutos. Luego, se tomaron 5,0 mL del sobrenadante y se agregó 280 µL de NaOH 5N. Se agitó manualmente y se procedió a una etapa de extracción con solvente orgánico: 20,0 mL de cloroformo con isoamilcarbinol al 1%v/v. Se vorteoó durante 1 minuto y se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno. Se resuspendió en metanol y otra fracción procesada de la misma manera en acetonitrilo. Los extractos resuspendidos se inyectaron en HPLC.

EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO VARIANTE (2):

A 2,0 mL de plasma adicionado con BZN a concentración conocida y anticoagulado con heparina, se le agregaron 4,0 mL de metanol y luego se agitó por 30 segundo con vórtex. Se centrifugó a velocidad máxima 10 minutos. El sobrenadante se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno.

Se resuspendió en metanol y otra fracción procesada de la misma manera en acetonitrilo. Los extractos resuspendidos se inyectaron en HPLC.

EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO VARIANTE (1):

En esta técnica se recurrió a la variante de trabajar con un volumen de plasma adicionado con BZN a concentración fija conocida y heparinizado, previamente liofilizado.

Se partió entonces, de 2,0 mL de plasma heparinizado liofilizado que luego de una etapa de pulverización con varilla se le adicionó 4,0 mL de metanol como solvente de extracción. Se agitó en vortex por 30 segundos y luego se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos.

El sobrenadante se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno y se resuspendió en distintas oportunidades con metanol, acetonitrilo y mezclas de de ambos. Los extractos resuspendidos se inyectaron en HPLC.

EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO VARIANTE (2):

A 2,0 mL de plasma liofilizado adicionado con BZN a concentración fija conocida y heparinizado, se le agregó 4,0 mL de acetato de etilo como solvente de extracción. Se agitó en vortex por 30 segundos y luego se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos. El sobrenadante se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno y se resuspendió en metanol, acetonitrilo y mezclas de de ambos. Los extractos resuspendidos se inyectaron en HPLC.

Del análisis de las recuperaciones halladas para cada variante se eligió continuar estudiando la que arrojaba mejores porcentaje de recuperación (% R). **Resultados: Tabla 4.2.1.1.1.** Para optimizar la técnica elegida se evaluaron pasos de desproteínizado del plasma liofilizado, ajuste de pH, llevado a sequedad mediante rotavapor en lugar de corriente de nitrógeno y sonicado de la muestra, antes de la etapa de centrifugación (**Tabla 3.2.1.1.2**).

Tabla 3.2.1.1.2.

| Pasos evaluados: | Solvente utilizado | Volumen utilizado (µL) | Tiempos evaluados(min) |
|-------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| Desproteínización ácida | TCA 10%, 30%p/v | 100, 150 y 200 | - |
| Ajuste a pH neutro | NaOH 10 %, 20%p/v | 100, 150 y 200 | - |
| Sonicado | - | - | 5, 10 y 15 |
| Centrifugado | - | - | 5, 10 y 15 |

Los resultados de estas evaluaciones se analizan en **Resultados: 4.2.1.2. Optimización de la técnica seleccionada para la extracción de BZN en plasma humano.**

3.2.1.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO:

Se propuso el siguiente método para la extracción de BZN a partir de plasma liofilizado:

Se parte de 2,0 mL de plasma heparinizado y liofilizado (llamaremos este volumen: V mta). Se disgrega con varilla de vidrio y se adhieren 2 V mta del solvente de extracción acetato de etilo (AE) y 1/10V mta de ácido tricloroacético (TCA) al 30% p/v como agente desnaturalizante. Se vortea 1 minuto y se sonica por 5 min. La mezcla se centrifuga a velocidad máxima por 10 min.

Se toma el sobrenadante y se lleva a sequedad en rotavapor (40°C a 90-120 bar) para ser resuspendido en 600 µL de acetonitrilo. El extracto se agita manualmente y se vortea 15 segundos y centrifuga 2 minutos a velocidad máxima antes de ser inyectado en el equipo.

En base a las recuperaciones halladas para las técnicas probadas, la complejidad y tiempos demandantes de los pasos, la robustez y versatilidad de los resultados, se seleccionó el mejor método para la extracción de BZN en plasma humano heparinizado.

Mediante esta técnica, se armó una curva de calibración de plasma adicionado con BZN que contó de 7 niveles de concentración por triplicado para los dos niveles inferiores y duplicado para el resto de los niveles. Las muestras preparadas fueron seguidamente liofilizadas y guardadas en heladera (4°C) por 24 a 48hs hasta su pretratamiento y luego analizadas por HPLC. El plasma utilizado para las curvas de calibración fue obtenido mediante punción venosa de donantes adultos voluntarios sanos, sin tratamiento farmacológico alguno por al menos 15 días antes de la toma de muestra.

Con los datos de las áreas bajo la curva de triplicados y duplicados se evaluó el coeficiente de variación porcentual (CV%) intradía para cada nivel. El procedimiento para elaborar la curva de calibración fue repetida en 3 días distintos, respetando las mismas condiciones experimentales y se calculó con estos datos el CV% interdía respecto de la pendiente cada recta de calibración.

Así mismo se evaluó la estabilidad de la matriz utilizada mediante el estudio de congelado a -21°C y descongelado de muestras dopada de concentración fija. Estas muestras las llamaremos de control de calidad (QC). Las mismas fueron descongeladas, pretratadas y analizadas luego de 15, 30 y 60 días de congelado. Se calculó el porcentaje de recuperación (R%) y el CV%.

Con el método validado se dosaron concentraciones de BZN plasmático de pacientes pediátricos que participaron de un estudio clínico para la determinación de la farmacocinética poblacional (POPPK) de BZN. Se pretrataron y analizaron cromatográficamente en torno a 120 muestras. Los resultados desprendidos de este

estudio se presentan en **Resultados 4.2.2. Dosajes de BZN en plasma humano** y también fueron publicados.⁸⁸

3.2.1.3. MODELO DE FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL (POPPK):

La estructura del modelo utilizado fue llevado a cabo usando un modelado no lineal de efectos mixtos mediante la implementación del programa NONMEM (versión 7.0; ICON Development Solutions, Ellicott City, MD). NONMEM utiliza regresiones no lineales de efectos mixtos (fijos y aleatorios) para estimar los parámetros poblacionales promedio y las variabilidades inter e intraindividuos (residuales). Un procedimiento paso a paso fue usado para encontrar el modelo que mejor se ajusta a los datos de partida. Se evaluaron modelos clásicos de uno y dos compartimientos.

Modelo de covariables: La influencia de las covariables se evaluó primero mediante inspección visual gráfica de los parámetros farmacocinéticos (PK) vs los gráficos de covariables. Covariables de influencia conocida o potencial fueron incorporadas secuencialmente en el modelo de PK. Las covariables evaluadas incluyeron peso, edad, dosis, género y si el sujeto era niño o adulto (es decir, si los datos provenían del estudio poblacional pediátrico o de literatura).

Modelo de errores: Las variaciones inter e intraindividuos de los parámetros PK fueron descriptos usando un modelo exponencial de errores.

Estimación de parámetros y selección del modelo: Los datos fueron fitiados usando una estrategia secuencial combinada. Primero la estimación de parámetros se realizó mediante el método Monte Carlo de importancia de muestreo (IMP), seguidamente como confirmación se utilizó la cadena de Markov, del método de aproximación estocástica de maximización de expectativa (SAEM). La selección del modelo se basó en el test de proporción de probabilidades, las estimaciones de los parámetros PK y sus respectivos intervalos de confianza (CI), y mediante controles visuales predictivos.

Finalmente, se considera que un modelo es un avance estadísticamente significativo por sobre un modelo previo si produce una disminución de la función objetiva (ΔOF) de 3,84 para un parámetro adicional ($P; 0,05$).

⁸⁸ Altcheh J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Marson ME, Ballering G, Bisio M, Koren G, García-Bournissen F. Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. *PLOS Neglected Tropical Diseases* (2014); 8(5) e2907

Evaluación del modelo: El modelo final seleccionado se validó en base al error estándar de las estimaciones “visual predictive check” (VCP) plot. Se usó el método “bootstrap” con reemplazo para evaluar la estabilidad del modelo final para construir los CI de los parámetros PK usando la versión 3.5.3. del equipo de herramientas PSN-Toolkit.

Mil sets de datos fueron reconstruídos por remuestreo a partir de los datos originales. Se compararon las medias y al 95% de los valores del CI de las estimaciones paramétricas para cada uno de los sets de datos replicados con los valores de los datos originales. Los parámetros PK obtenidos se presentan en **Resultados: Tablas 4.2.3.1 y 4.2.3.2.**

El modelo utilizado para el estudio de PK, se presenta a fin de contextualizar y brindar un significado clínico de los dosajes de BZN realizados en el marco de la tesis. El estudio de los modelos y las evaluaciones de los mismos están en marcados dentro de los aportes de todo un equipo de trabajo.

3.2.1.4. EVOLUCIÓN EN EL DESARROLLO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BNZ EN ORINA

Teniendo en cuenta por un lado las características de recolección de una muestra de orina de 24hs, la composición de la misma y por el otro, cálculos teóricos respecto a la eliminación del BZN (o metabolitos) y las concentraciones halladas en plasma, es que las concentraciones de estas especies en la orina de 24 horas sugiere bajos requerimientos analíticos. Nuestra ventana de búsqueda se encontraba en un rango de concentraciones entre 5 y 100 µg/mL.

Además de esto, en base a las publicaciones estudiadas donde se plantean la extracción de fármacos urinarios de características químicas similares al BZN, se trabajó con métodos tradicionales de extracción sólido-líquido y líquido-líquido:

Pasos evaluados en la extracción Sólido-Líquido:

- ✓ Muestra: Para 2500 µL de orina dopada con BZN, se trabajó con varias concentraciones dentro de rangos de concentración que van desde los 5µg/mL a los 100 µg/mL.
- ✓ Para desproteínizar se agregaron 400µL TCA (30%p/v), se vorteoó.
- ✓ Se agregaron 5,0 mL de AcN calidad HPLC. Se vorteoó y centrifugó.
- ✓ Se separó fracción líquida por inversión directa del tubo y se rotavaporó.

✓ Las muestras concentradas se resuspendieron en distintos volúmenes de solventes y/o mezclas de solventes (ver columna 6, **Tabla 3.2.1.4.1**).

Las muestras así procesadas no pudieron ser llevadas a completa sequedad, dejando un remanente concentrado de orina “caramelizada”. Esto trajo varios inconvenientes: por un lado que no se podía conocer con exactitud el volumen remanente y por lo tanto calcular correctamente el factor de concentración. Por el otro, los extractos que se generaban no eran lo suficientemente límpidos como para su inyección directa en el equipo HPLC. Sumado a esto, a pesar de una centrifugación previa a la inyección, los perfiles cromatográficos que se obtuvieron fueron sucios y con superposición de picos entorno al pico del BNZ.

Por estas razones se evaluó un método de extracción que permitiera trabajar con fracciones de solventes orgánicos inmiscibles en agua que resultaran más fáciles de llevar a sequedad.

Pasos evaluados en la extracción Líquido-Líquido:

Se trabajó con fracciones de distintos volúmenes de muestra dopada con BZN en tubos plásticos de punta cónica. A saber: 1500µL, 2500 µL y 5000 µL. En una primera instancia se evaluaron las recuperaciones (%R) obtenidas para una concentración fija: 10 µg/mL.

Se evaluó la desproteínización mediante la adición de 1/10 volúmenes de muestra de TCA 30% p/v ó 10% p/v. Se planteó un paso de centrifugación para separar el sedimento luego de la desproteínización.

Se separó la fase orgánica (superior o inferior dependiendo del solvente utilizado) luego de la centrifugación, mediante pipeta automática y se realizaron extracciones con los solventes presentados en la **Tabla 3.2.1.4.1** a distintos pHs. Se llevó a pH ácido y básico mediante TCA y NaOH 30% p/v respectivamente.

Se recolectaron los volúmenes de las fracciones extraídas y se llevaron a sequedad en Rotavapor. Condiciones del Rotavapor: 40°C, disminuyendo la presión hasta 100-150 barr, tiempo de secado: 20 minutos mínimo o más, si el solvente usado presenta puntos de ebullición altos (cercaos a los 100°C).

Se evaluó la posibilidad de extraer de la muestra los solventes de extracción mediante una etapa de congelamiento de la fase acuosa de la muestra en freezer a -22°C y como algunos de los solventes orgánicos utilizados presentan su punto de fusión a

temperaturas más bajas (ejemplo, AE presenta un punto de fusión de $-83,6^{\circ}\text{C}$), estos se encontraban en estado líquido, de todos modos no se avanzó con esta estrategia porque resultó muy engorrosa la separación.

Los extractos llevados a sequedad mediante rotavapor fueron resuspendidos con distintos solventes (ver columna 6, **Tabla 3.2.1.4.1**) y distintos porcentajes de mezclas de ellos. Se homogenizaron mediante vorteo, se centrifugaron y se analizaron mediante inyección en HPLC-UV a una longitud de onda de 313 nm.

Tabla 3.2.1.4.1.

| Solvente de extracción utilizado | Volumen de extracción (μL) | Ciclos de extracción | Volumen total utilizado (μL) | pH aproximado | Solvente de resuspensión |
|----------------------------------|---|----------------------|---|---------------|------------------------------------|
| Diclorometano (DCM) | 500, 1250 | 2, 3, 4 | 1500, 2500, 5000 | 3, 7 y 9 | Agua/AcN, AcN Agua/MeOH MeOH |
| Acetato de etilo (AE) | 500, 1250 | 2, 3, 4 | 1500, 2500, 5000 | 3, 7 y 9 | Agua/AcN, AcN Agua/MeOH MeOH |
| Acetona | 500, 1250 | 2, 3, 4 | 1500, 2500, 5000 | 3, 7 y 9 | Agua/AcN, AcN Agua/MeOH MeOH |

Condiciones cromatográficas experimentales evaluadas para el análisis de los extractos de orina por HPLC-UV:

Se estudiaron las siguientes fases móviles para las corridas de las muestras evaluando las características resolutivas de los cromatogramas:

Mezclas

- ✓ Buffer (glicina-ONA):AcN con proporciones que variaron desde 90:10 hasta 60:40
- ✓ Buffer (glicina-ONA): Metanol con proporciones que variaron desde 90:10 hasta 60:40
- ✓ Buffer (glicina-ONA):Metanol:AcN con proporciones que variaron desde 80% hasta 50% de buffer y diversas combinaciones de los restantes solventes.

Debido a las bajas resoluciones de los perfiles cromatográficos se buscó como alternativa reemplazar el buffer glicina-ONA por un buffer de Acético/acetato de amonio (pH 3,5), pero no se obtuvieron mejores resoluciones.

Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de trabajar sin buffer, por un lado buscando mejorar los perfiles obtenidos y por el otro, para acondicionar la corrida cromatográfica de modo de que sea apta para un análisis posterior mediante HPLC-MS/MS en donde los buffers con detergentes o sales de sodio, no son apropiados para el instrumental a utilizar. Por estas razones se probaron las siguientes mezclas de solventes:

- ✓ Agua: MeOH con proporciones que variaron desde 90:10 hasta 50:50
- ✓ Agua: AcN con proporciones que variaron desde 90:10 hasta 50:50
- ✓ Agua: MeOH:AcN con proporciones que variaron desde un 80% hasta un 50% de agua y diversas combinaciones de los restantes solventes.

Las mejores resoluciones de los perfiles cromatográficos para la cuantificación de BZN en extractos urinarios se encontraron trabajando con un sistema isocrático de fase móvil (FM) compuesta por agua:AcN (75:25) con flujo de 1 mL/min y con tiempos de retención para BZN entorno a los 7 min.

Se encontró a su vez, que los mejores perfiles de los extractos se obtenían por resuspensión con solventes de composición y % igual al utilizado en la FM de la corrida cromatográfica.

3.2.1.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En base a las recuperaciones halladas para las técnicas probadas, la complejidad y tiempos demandantes de los pasos, la robustez y versatilidad de los resultados, se seleccionó el mejor método para la extracción de BZN en orina humana. Se resumen los pasos para una muestra genérica M de volumen $V = 2500 \mu\text{L}$ de orina humana con BZN:

- ✓ Se toma un volumen V de muestra M
- ✓ Se le adiciona $1/10 V$ de TCA al (30% p/v) para generar la desproteización de M .
- ✓ Se vortea 20 segundos y se agregan aprox. $225 \mu\text{L}$ de NaOH al (10% p/v) para obtener un pH en torno a 7. Se vortea 20 segundos.
- ✓ Se adiciona $1/2 V$ en DCM y 200mg de Na_2SO_4 anhidro para facilitar la separación de las fases. Vortear 2 min.
- ✓ Se recolectan las fases orgánicas de 2 procesos de extracción consecutivos.
- ✓ Se lleva a sequedad en rotavapor a 50°C , a 40-80 bar. Tiempo estimado 7 minutos.
- ✓ Se resuspenden los extractos con $1500 \mu\text{L}$ de la FM usada en la cromatografía.

Utilizando esta técnica, se construyó una serie de calibración que contó de 4 niveles de concentración con triplicados para cada nivel. Con los datos de las áreas obtenidas para los triplicados se evaluó el coeficiente de variación % (CV%) intradía para cada nivel. Esta curva de calibración fue repetida en 3 días distintos, respetando las mismas condiciones experimentales y se calculó con estos datos el CV% interdía de la pendiente de las rectas de calibración.

Además también se evaluó la estabilidad de la matriz utilizada mediante el congelado y descongelado de una muestra dopada de concentración fija de 15,0 µg/mL (QC). La muestra fué descongelada, se tomó una fracción que fue pretratada y el resto se volvió a congelar. Este procedimiento se realizó luego de 15, 30 y 60 días. Para estas muestras se calculó el R% y CV%.

Finalmente, se calcularon las cifras de mérito de la curva de calibrado, la exactitud y precisión, el rango lineal y los límites de detección y cuantificación para el método desarrollado. Con el análisis de estos datos se realizó la validación del método: **ver en Resultados: 4.3.2. Validación de método de extracción de BZN en orina humana.**

3.2.1.6. EVOLUCIÓN EN EL DESARROLLO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN LECHE MATERNA HUMANA POR HPLC

Debido a las características de la matriz biológica con la que se trabajó, los estudios se enfocaron en la búsqueda de las mejores condiciones para:

La desproteínización de la muestra:

Se evaluaron las estrategias previamente analizadas para las matrices plasma y orina. Para esto se trató un volumen fijo de muestra con distintas cantidades de TCA 30% p/v contemplando la posibilidad de utilizar un volumen o concentración mayor de ácido debido al mayor porcentaje de proteínas y lípidos presentes en la muestra.

El desgrasado:

El desgrasado de la muestra consistió en una etapa de extracción, luego de la desproteínización ácida, con solventes orgánicos comúnmente utilizados para estos procedimientos: éter de petróleo y n-hexano.

El paso de extracción del BZN a evaluar:

Se evaluaron distintos procedimientos que condujeran a la extracción del BZN de la matriz generando un sobrenadante límpido, que pudiera ser fácilmente evaporado y/o analizado directamente por cromatografía sin una etapa previa de concentración.

Análisis del porcentaje de recuperación (R%) y selección de etapas:

Para los distintos procedimientos evaluados se calculó el R% de una muestra control de calidad (QC) a una concentración fija determinada.

Evaluación de la robustez del método seleccionado:

La robustez del método se evaluó debido a las variabilidades conocidas para dicha matriz respecto de su composición. Los lípidos fueron los componentes de la matriz a evaluar. **Ver 3.2.3.1. Composición y características de la leche materna.** Para ello se trabajó con un stock de 7 muestras de leche materna de distinta procedencia de donantes voluntarias sin tratamiento farmacológico. Se midió el contenido lipoproteico presente en cada muestra (lípidos + lípidos unidos a proteínas), denominada fracción lipoproteica (FLP) y una fracción lipídica (FL) que representa el contenido de lípidos luego de una etapa de desnaturalización ácida de proteínas. Otra fracción de las muestras fueron dopadas con BZN a concentración fija de modo de que todas tuvieran la misma concentración final. Fueron pretratadas mediante el método seleccionado y analizadas por HPLC-UV. Se trabajó mediante análisis estadístico de gráficos de correlación para evaluar si la variabilidad en el contenido lipídico de las leches afectaba o no el procedimiento de extracción del BZN.

3.2.1.6.1. TÉCNICAS PROBADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE BZN EN LECHE MATERNA:

Método de Extracción Sólido-Líquido:

Esta técnica se ensayó para un volumen de leche materna (2,5 mL) adicionado con BZN, de modo de obtener concentraciones finales del orden de los 1-10 µg/mL. Se colocaron en tubos de plástico de punta cónica y tapa a rosca. Luego se realizó un tratamiento de desproteinización seguida de precipitación por centrifugación de la leche por el agregado de 1/10 del vol. de muestra en TCA al 30%p/v (250 µL). Se homogenizó y vorteoó 30 segundos y luego se agregó el solvente de extracción AcN en relación a 2 veces el vol. de muestra (5mL para este caso particular). Se volvió a homogeneizar por otros 30 segundos y se llevó a centrifuga a velocidad máxima durante 10 minutos.

Luego del centrifugado se observó una capa superior semisólida de contenido graso, un precipitado en forma de botón que representa el contenido proteico en el fondo del tubo y en el medio un sobrenadante líquido turbio que se recoge por transvaso a un

tubo de vidrio. Para esto fue necesario desprender la capa grasa superior por raspado con espátula que se desprendió en forma de “moneda grasa”. Se transvasó la mayor cantidad de fase líquida teniendo en cuenta de no transferir elementos sólidos ni del tapón proteico ni de la “moneda grasa”. Esta fase líquida era una mezcla homogénea entre el solvente orgánico utilizado y el componente acuoso de la leche. Se llevó a sequedad mediante rotoevaporación, trabajando a 40°C y disminuyendo gradualmente la presión del sistema de modo de trabajar en un rango de 30-80 bar. Este paso llevó un tiempo entre 40 y 50 minutos de rotavapor.

Con el extracto seco, se resuspendió y vorteoó en la fase móvil utilizada para la corrida cromatografía, que en este caso se trató de un sistema Agua:AcN (75:25v/v). El volumen de resuspensión fue de 500µL por lo que la muestra en esta técnica fue concentrada 5 veces. Este paso pretende obtener una sensibilidad en la detección 5 veces mayor al esperado si la muestra no fuera preconcentrada.

Las corridas cromatográficas se realizaron a una longitud de onda de 313 nm con un tiempo de retención entre 6 y 7 minutos. Los resultados de curvas realizadas para este método mostraron pobre linealidad y valores de recuperación poco constantes por lo cual se sugirió probar modificaciones a esta técnica. Se realizaron pasos de desgrasado a través de la utilización de N-hexano y éter de petróleo como solvente de extracción que no mejoraron los resultados previos por lo que no se avanzó con esta técnica.

Método de extracción Líquido-Líquido:

Esta técnica es similar a la evaluada mediante extracción sólido-líquido, pero lo que se modificó en este caso es el solvente de extracción utilizado. Aquí se trabajó con AE que al ser inmiscible en agua, generó la formación de 2 fases homogéneas. La fase orgánica (superior) se recogió y se llevó sequedad con rotavapor y luego se resuspendió para inyectar en el HPLC.

Los pasos de desproteinización y desgrasado son los mismos, pero en este caso la “moneda grasa” que se obtiene luego de la centrifugación es más blanda y quebradiza haciendo que el paso de separación y trasvaso sea muy engorrosa y difícil. Por esta razón, sumado a que los datos de recuperación para muestras de igual concentración eran inconstantes y muy por debajo de los deseados, es que se descartó continuar evaluando esta técnica.

Pasos de la técnica: Un volumen de leche materna (2.5mL) adicionado con BZN concentrado de modo de obtener concentraciones finales en el rango de 1-10 µg/mL, se colocó en tubo plástico de punta cónica y tapa a rosca. Luego se realizó un tratamiento de precipitación y desproteización de la leche por el agregado de 1/10 vol. de muestra en TCA al 30%p/v (250µL). Se homogenizó y vorteoó 30 segundos y luego se agregó 2 veces el vol. de muestra del solvente de extracción AE (5mL). Se volvió a homogeneizar la muestra por 30 segundos y se llevó a centrifuga a velocidad máxima durante 15 minutos.

Luego del centrifugado se observó una capa superior de contenido graso, un precipitado en forma de botón en el fondo del tubo y en el medio un sobrenadante líquido turbio formado por dos fases líquidas. Una fase orgánica superior de AE y una capa inferior acuosa proveniente de la leche. La fase orgánica es la que se recogió en tubo de vidrio mediante succión con pipeta automática, previo desprendimiento de la “moneda grasa”. Para desprender la capa grasa superior se raspó cuidadosamente con una espátula los bordes del tubo. La fase orgánica AE se llevó a sequedad en rotavapor, trabajando a 40°C y disminuyendo gradualmente la presión del sistema de modo de trabajar en un rango de 100-150 bar, en el cual se observó ebullición suave. Este paso consume entre 20 y 25 minutos.

El tubo seco, se resuspendió y vorteoó en 500 µL de la fase móvil utilizada para la corrida cromatográfica, agua:AcN (75:25). La muestra fue entonces concentrada 5 veces. Se buscó de esta manera, aumentar la sensibilidad en la detección. Las corridas cromatográficas se realizan a una longitud de onda de 313 nm con un tiempo de retención entre 6 y 7 minutos para esta técnica.

Método de extracción mediante cartuchos SPE (Solid Phase Extraction):

Esta técnica utilizó el principio de absorción reversible de la molécula del fármaco en el relleno del cartucho (que es de igual naturaleza química que la columna cromatográfica). Se eluyó mediante el agregado de un solvente de polaridad similar a la molécula en estudio. Esta fracción elución se llevó a sequedad y se resuspendió e inyectó en el HPLC.

Las dificultades para esta técnica estuvieron dadas por las bajas recuperaciones halladas. Esto podría deberse a perdidas en el pretratamiento de la leche (desgrasado, desproteizado) y a una deficiente elución del analito del cartucho SPE.

Pasos de la técnica:

Acondicionamiento de la muestra:

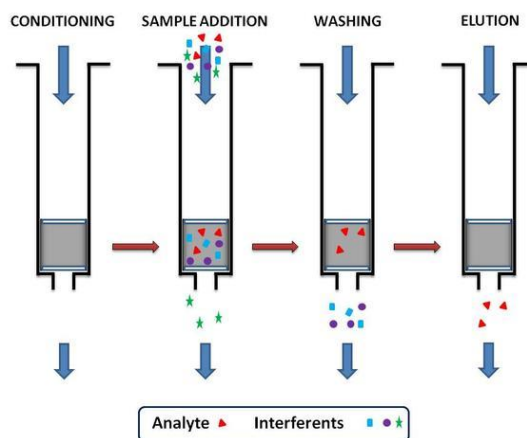
- 1) vol. de muestra: 5 mL de leche materna dopada con BZN, 5 µg/mL
- 2) TCA al 30%p/v 500µL
- 3) vortear 20 segundos y llevar a neutralidad con NaOH 30% p/v 200 µL
- 4) medir pH con tira reactiva
- 5) sonicar 5 min.
- 6) centrifugar 5 minutos a máxima velocidad
- 7) separar la capa lipídica superior con espátula
- 8) cargar sobrenadante en cartucho SPE-C18, (previamente acondicionado)

Acondicionamiento, carga y elución del cartucho SPE:

- 1) Se hidrata la columna con 6mL de agua y luego 6mL de MeOH (en ese orden)
- 2) Se carga la muestra en el cartucho
- 3) Se lava el cartucho con 6mL de agua
- 4) Se eluye el contenido retenido en el cartucho con 6mL de AcN como solvente de extracción

Temperatura de trabajo: Se trabajó en una primera instancia a temperatura ambiente, luego en busca de optimizar el procedimiento de extracción se llevó a 4 °C los cartuchos y solventes a utilizar. La fracción elución se llevó a sequedad en rotavapor 40°C, 100-150 bar y luego se resuspendió en la fase móvil utilizada en el HPLC. Agua:AcN (75:25).

Figura 3.2.1.6.1.1.



Se recolectaron y midieron mediante HPLC-UV todas las fracciones obtenidas de los cartuchos SPE, es decir, se recolectó una primera fracción agua y otra de MeOH de la Herramientas farmacométricas para antichagásicos

etapa de acondicionamiento. Luego, la fracción recogida durante la carga de la muestra, seguido de esto se juntó la fracción lavado de la columna previa a la elución. Finalmente se recogieron varios volúmenes de elución, cada uno en tubos separados. La **Figura 3.2.1.6.1.1** muestra un esquema de los pasos a seguir mediante SPE.

Se midieron cada una de las fracciones, previo llevado a sequedad y resuspensión en un volumen de 500 μL en la composición de la fase móvil utilizada. Sin embargo, no se obtuvieron buenas recuperaciones de BZN en la fracción elución y también se encontró BZN en las fracciones de lavado y carga. Se buscó probar otras técnicas.

Método Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe)

Esta técnica se basa en la disminución de la solubilidad de una solución dado por un gran aumento de la fuerza iónica del medio (salting-out). Este fenómeno se logra mediante el agregado de grandes cantidades de sales a la muestra. Luego de una agitación vigorosa y centrifugación se separa el sobrenadante, se lleva a sequedad, se resuspende en fase móvil y se inyecta en el HPLC.

Pasos de la técnica:

Se trabajó con un volumen de leche materna de 2,5 mL dopada con BZN para obtener una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un tubo cónico plástico al cual se le agregó un vol. de muestra en el solvente de extracción (AcN, 2.5mL). Se agregó aproximadamente el peso de la leche en sales (sulfato de magnesio y cloruro de sodio en partes equimolares). Se agitó vigorosamente y luego se centrifugó. Se obtuvo un precipitado y un líquido opalescente como sobrenadante, el cual se transvasó a otro tubo plástico y se repitió el paso de agregado de sales pero esta vez con sulfato de magnesio y silica gel. Se agitó nuevamente y se centrifugó.

El sobrenadante se llevó a sequedad en rotapavor usando las mismas condiciones del equipo que en las otras técnicas evaluadas. Se resuspendió en 500 μL de fase móvil y se midió por HPLC. Se descarta esta técnica debido a las bajas recuperaciones halladas.

Método por Filtración en tandem:

Esta técnica consistió de un pretratamiento de desproteínización seguido de una filtración mediante un tren de filtrado dado por dos filtros consecutivos de diferente tamaño de poro.

Pasos de la técnica:

Se colocó 2,5 mL de leche materna dopada con BZN en un tubo de vidrio de modo de obtener una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se agregó 1/10 del volumen de muestra en TCA

30%p/v (250 μ L). Se agitó mediante vórtex durante 30 segundos y se congeló por 24 hs para una mejor digestión de la muestra.

Luego se descongeló, agitó manualmente y se volcó en jeringa adaptada en un extremo con un tren de 2 portafiltros con membranas de nylon de 0,8 y 0,45 μ m respectivamente, en ese orden y uno a continuación del otro. Este sistema de jeringa y portafiltros es contenido en un tubo Falcon plástico de tapa a rosca el cual se centrifugó 20 min. El filtrado obtenido fue una solución límpida y translúcida la cual se inyectó directamente en el HPLC. La **Figura 3.2.1.6.1.2** muestra el sistema de filtración en tándem utilizado para esta técnica.

Figura 3.2.1.6.1.2.



Esta técnica arrojó mejores recuperaciones que las encontradas con el resto de las técnicas. Entonces, se procedió a buscar condiciones para la optimización de la técnica mediante las siguientes modificaciones:

- ✓ Se probó una etapa de sonicado por 5 minutos con y sin etapa de congelado. Se decide eliminar la etapa de congelado, sustituyéndola por el sonicado de la muestra. Esto generó un acortamiento importante de los tiempos de procesado.
- ✓ Se trabajó con menores volúmenes de muestra hasta alcanzar un volumen de 1.00 mL
- ✓ Se evaluó la recuperación y linealidad de las siguientes concentraciones: 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 10.00 y 15 μ g/mL.

3.2.1.7. ENSAYO DE ROBUSTEZ: EVALUACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO DE LA LECHE MATERNA Y SUS INFLUENCIAS EN LA RECUPERACIÓN DE BZN.

Considerando que una de las características más variables descriptas para la leche materna es el tenor graso de las mismas, se evaluó en qué medida dicho factor podría influir en el dosaje de BNZ. Para ello, se trabajó con 7 muestras de leche materna de

madres en distintas etapas del amamantamiento, sin tratamiento farmacológico de ningún tipo por al menos quince días antes a la extracción.

Distintas fracciones de las muestras fueron utilizadas para la determinación de la fracción lipoproteica (FLP) y la fracción lipídica (FL) de la leche, buscando correlación con la recuperación de BZN (R%), dopando a concentración fija (5 µg/mL) y pretratando mediante el método seleccionado.

La FLP se determinó mediante técnica del “crematocrito”⁸⁹ que básicamente consiste en llenar un capilar de vidrio (100 µL aproximadamente) de los utilizados en la determinación del hematocrito sanguíneo con leche previamente homogeneizada. Se cierra el capilar, se centrifuga 5 minutos a 3000g se mide con regla o calibre la altura total de la muestra de leche y la altura del sobrenadante (fracción de crema o lipoproteica) y se expresa esta relación en porcentajes.

La FL se determinó de la misma manera que la FLP, agregando un paso previo a la carga del capilar que consistió en el agregado de ácido sulfúrico concentrado (10 µL) como el utilizado en el método Gerber (H₂SO₄ 98% v/v) para desnaturalizar proteínas y posibles uniones lipoproteicas presentes. Se miden las alturas nuevamente y se expresa esta relación en porcentajes, ajustando un 10% los valores debido a la dilución de la muestra por el agregado del ácido.

Los resultados hallados para estas determinaciones se presentan en **Resultados: 4.5.2.Optimización de la técnica seleccionada para extracción de BZN en leche materna.**

3.2.1.8. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BZN EN LECHE MATERNA

En base a las recuperaciones halladas para las técnicas probadas, la complejidad, los tiempos que demandan los pasos, la robustez y versatilidad de los resultados, se seleccionó el mejor método para la extracción de BZN en leche materna humana. Esta técnica presenta importantes aspectos a tener en cuenta:

- 1) Trabaja con volúmenes pequeños de muestra, considerando los volúmenes que generalmente se obtienen en las extracciones de leche.
- 2) Los reactivos utilizados promueven el uso de la “química verde” debido a que no se usan solventes orgánicos.
- 3) No requiere de equipamiento complejo para su pretratamiento.

⁸⁹ Mayans E, Martell M. Estimación del valor calórico de la leche materna mediante la técnica del crematocrito. Rev Med Uruguay 1994; 10: 160-164

- 4) A pesar de no presentar pasos de preconcentración de la muestra, las cifras de mérito halladas son razonables y clínicamente adecuadas.

Se resumen los pasos de la técnica seleccionada para la extracción de BZN de leche materna:

- 1) Se toman 1000 μL de leche materna con BZN
- 2) Se le adiciona 100 μL de TCA al (30% p/v) para desproteínizar la muestra.
- 3) Se vortea 20 segundos y se sonica 7 min.
- 4) Se adapta jeringa con extremo a un tren de 2 portafiltros con membranas de nylon de 0,8 y 0,45 μm respectivamente, en ese orden y uno a continuación del otro. Este sistema de jeringa y portafiltros es contenido en un tubo Falcon de polietileno con tapa a rosca.
- 5) Se carga jeringa con muestra y se centrifuga 20 min.
- 6) El líquido filtrado es inyectado en el equipo cromatográfico para su análisis.

Utilizando esta técnica, se obtuvo una serie de calibración que contó de 7 niveles de concentración con triplicado para los dos niveles inferiores y duplicado para el resto de los niveles. Con los triplicados y duplicados se evaluó el coeficiente de variación $\%(\text{CV}\%)$ intradía para cada nivel.

Esta curva de calibración fue repetida en 3 días distintos, respetando las mismas condiciones experimentales y se calculó con estos datos el $\text{CV}\%$ interdía de la curva de calibración.

Además también se evaluó la estabilidad de la matriz utilizada mediante el congelado y descongelado de una muestra dopada de concentración fija (QC de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las muestras fueron descongeladas, se tomó una alícuota que fue pretratada, analizada y el resto vuelto a congelar repitiendo este ciclo a los 15, 30 y 60 días. Para estas muestras se calculó el $\text{CV}\%$ y $\text{R}\%$.

Se calcularon las cifras de mérito de la curva de calibrado, la exactitud y precisión, el rango lineal y los límites de detección y cuantificación para el método desarrollado.

Así mismo con el análisis de estos datos y los parámetros de correlación arrojados por el ensayo de robustez, se realizó la validación del método. Las tablas y gráficos con los resultados y las cifras de mérito para la curva de calibración se presentan **en Resultados: 4.5.3. Validación del método de extracción de BZN en leche materna.**

3.2.1.9. EXPLORACIÓN SOBRE MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN EN SANGRE ENTERA EN PAPEL DE FILTRO

Inicialmente se evaluaron tres tipos distintos de papel absorbente:

- ✓ Hoja para técnica húmeda de 200 gr marca Fibrianno.
- ✓ Papel secante escolar marca Congreso
- ✓ Papel de filtro Whatman 903⁹⁰

Las dos primeras variantes no traen impresa una superficie a rellenar, por lo que se realizó mediante compás una circunferencia de diámetro constante para cada ensayo. En ambos casos, la permeabilidad del papel, la textura de la hoja entre otros parámetros no resultaron los más convenientes para los estudios a realizar.

Tabla 3.2.1.9.1. Evaluaciones preliminares para la extracción de BZN de sangre entera recolectada en papel de filtro Whatman 903

| Factor | Variables | | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|-----|-----------|-----------|
| Volumen de sangre recolectada (µL) | 50, 100 y 200 | | | |
| Tiempo de secado (hs) | ½, 1, y 24 | | | |
| Solventes de extracción evaluados | AcN/Agua | AcN | AcN + AE | MeOH/Agua |
| Proporción de los solventes | 70:30:00 | 100 | 100 + 100 | 80:20 |
| Tiempo de extracción (min) | 10, 15, 20 | | | |
| Ciclos de extracción por muestra | 2, 3 y 4 | | | |
| Desnaturalización | Mediante agregado de TCA al 30% p/v | | | |

En el caso del papel Whatman 903, corresponde a un material minuciosamente controlado en el proceso de fabricación, para asegurar una composición y grosor homogéneo, y una permeabilidad y una pureza uniformes. Se evaluó el volumen de recolección de sangre apropiado para que la circunferencia impresa en los papeles de filtro no se sature ni se excedan los límites definidos. Se evaluó la carga desde 50 µL hasta 200 µL de sangre heparinizada. Seguidamente se evaluaron los tiempos de secado de las muestras cargadas previo a una etapa de extracción con solventes orgánicos. Las muestras se dejan en posición horizontal al ambiente y descubiertas, lejos de corrientes de aire y en un lugar preferentemente seco o con baja humedad.

Los pasos evaluados para la extracción se presentan en la **Tabla 3.2.1.9.1**. Se trabajó con una muestra de sangre heparinizada de voluntario sano, a la que se dopó con un volumen de ST de BZN de modo de obtener concentraciones del orden de los 100 µg/mL

⁹⁰ Donado por la Fundación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. Material utilizado de rutina en la toma de muestra para la pesquisa neonatal de enfermedades congénitas.

ya que al trabajar con pequeños volúmenes de muestra la sensibilidad del método podría disminuir considerablemente. Los pasos de la técnica:

- 1) Se recorta una circunferencia o las necesarias de modo de obtener un volumen no menor a 500 μL de sangre en un tubo tipo Falcon plástico de punta cónica.
- 2) Se agregan los discos al frasco y luego el volumen de solvente de extracción.
- 3) Se agrega luego de un mezclado manual enérgico, 200 μL de TCA a 30 % p/v y se deja en reposo según tiempo evaluado (**Tabla 3.2.1.9.1.**)
- 4) Se sonica el tubo por 5 minutos y centrifuga a máxima velocidad por otros 5 minutos.
- 5) Se separa el sobrenadante, para luego volver a agregar solvente de extracción al precipitado.
- 6) Se recolectan las fracciones de extracción se filtran mediante papel de filtro y embudo, lavando el filtro con un volumen extra de solvente de extracción y juntando con el resto de la fracción filtrada.
- 7) Se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno.
- 8) Se resuspende en AcN para inyectar en HPLC

Los primeros protocolos de extracción evaluados (al comienzo del desarrollo de la tesis) generaban extractos demasiado coloreados y con sedimentos no apropiados para una inyección directa en el equipo de HPLC. Este inconveniente estaría dado por la presencia de la hemoglobina de la sangre, proteína que presenta un color rojo intenso y que las etapas de desnaturalización no logran desnaturalizar lo suficiente como para eliminar del medio las interferencias coloreadas. La existencia de residuos coloreados verdosos, pardos, en los productos de extracción de distintas fracciones de papel de filtro embebidos con sangre entera, plantearon inconvenientes analíticos que pospusieron el tratamiento de esta matriz para la extracción de los fármacos estudiados.

Finalmente, antes de concluir los trabajos enmarcados en esta tesis, se retomaron los estudios en esta matriz y se realizó una recolección de muestras de sangre heparinizada de rata y dopadas con BZN de modo de obtener un rango de concentraciones de 0,1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la realización de una curva de calibrado. También se buscó la detección de posibles metabolitos en muestras de rata tratadas con BZN.

A partir de la colaboración de otro grupo de investigación que contaba con técnicas instrumentales más sensibles se logró desarrollar un método para la extracción en dicha matriz.⁹¹

3.2.2. BÚSQUEDA DE METABOLITOS DEL BZN

3.2.2.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL BZN EN PLASMA HUMANO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

Se evaluaron cromatogramas HPLC/UV obtenidos de dosajes de BZN en muestras de plasma de pacientes pediátricos provenientes del estudio de POPPK desarrollado por nuestro grupo. Los cromatogramas evaluados fueron 117, los cuales provenían de muestras en distintas etapas del tratamiento con BZN.

Del análisis del perfil cromatográfico de los mismos se preseleccionó un grupo de cromatogramas que podrían ser analizados mediante HPLC/MS/MS. Se tuvieron en cuenta, aquellos cromatogramas que presentaban picos acompañantes (no identificados estructuralmente) en el entorno de elución del BZN. Este criterio descartó a la gran mayoría de las muestras. Luego, de los obtenidos en esta preselección se eligieron 3 cromatogramas que presentaron perfiles bien resueltos y a su vez fueron representativos del grupo preseleccionado. Ver en **Resultados: Figuras 4.2.5.1 y 4.2.5.2.**

Se buscaron duplicados de las muestras de plasma seleccionadas y previamente reservadas con la posibilidad de realizarles estudios de espectroscopía de masas/masas. Se le realizaron estudios mediante HPLC/MS/MS de alta resolución por derivación al laboratorio UMYMFOR, FCEyN-UBA.

Con los resultados obtenidos, se aplicaron criterios estructurales y espectroscópicos para confirmar la presencia de BZN en las muestras y para identificar sustancias acompañantes observadas en las señales cromatográficas. Se obtuvo una serie de iones M^+ para cada pico cromatográfico analizado y patrones de fragmentación para cada uno de estos. Se identificó la presencia en las 3 muestras de un compuesto llamado N-bencilacetamida (NBAA) que estructuralmente podría ser un derivado del BZN. Ver en **Resultados: 4.2.5. Identificación de la NBAA como metabolito plasmático del BZN.**

⁹¹ Martínez, N.; Marson, M.E.; García-Bournissen, F.; Altcheh, J.; Raba, J.; Cerutti, S. Desarrollo de una metodología de análisis multianalito para el monitoreo de la droga antichagásica benznidazol y sus metabolitos en muestras de sangre mediante UPLC/MS/MS. Presentación en poster, 8vo CAQA, Noviembre 2015

3.2.2.2. N-BENCILACETAMIDA (NBAA)

Para corroborar la presencia de dicho compuesto se planteó en una primera instancia la posibilidad de comprar el patrón químico NBAA (droga sólida) con el cual comparar los resultados cromatográficos para ratificar o rectificar la identidad del compuesto hallado en plasma.

Una forma de conseguir este patrón químico comercial sería mediante la importación pero, ante la dificultad de importar en tiempos prudentes para la realización del estudio propuesto en el plan de trabajo, se procedió a evaluar las posibilidades para la realización de la síntesis química del mismo. Para ello se realizaron varias reacciones de síntesis químicas en el laboratorio.

Por otro lado, se realizó una búsqueda bibliográfica⁹² para comparar los patrones de fragmentación de masas obtenidos para la NBAA respecto de los presentados en la bibliografía. El hecho de presentar patrones de fragmentación de masas que sean similares nos aporta valor de identidad del compuesto en estudio con el reportado en bibliografía.

A su vez se buscó en bibliografía las propiedades físico-químicas del compuesto tales como aspecto de los cristales macroscópicos, color, temperatura de fusión, solubilidad en solventes orgánicos, entre otros.

3.2.2.2.1. SÍNTESIS QUÍMICA DEL COMPUESTO: REACCIÓN DE N-ACETILACIÓN:

Variante (1):

En un vaso de precipitado de 250 mL se preparó una solución conteniendo 5,1 gr de acetato de sodio en 15,0 mL de agua y se enfrió en baño con hielo. Por otro lado, en un Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 75,0 mL de agua se colocaron 2,8 mL de ácido clorhídrico concentrado y 3,0 mL del reactivo a acetilar, bencilamina. Se agitó magnéticamente hasta obtener una solución y sobre esa solución se agregó 3,9 mL de anhídrido acético, previamente purificado mediante una destilación simple, y se continuó agitando magnéticamente para luego volcarlo sobre la solución fría de acetato de sodio preparada previamente.

⁹² Gilbert JR, Potter E, Stace AJ. The Mass spectrometric fragmentation of N-benzylacetamide. *Organic Mass Spectrometry*. 10:320 (1975).

Luego de obtenidos los cristales, se filtrarían por succión para ser recrystalizados. Al no obtener cristales, este procedimiento se realizó varias veces en días consecutivos, variando condiciones de la técnica (distintos volúmenes, distintas temperaturas, distintas marcas para un mismo reactivo), sin embargo no se obtuvo producto alguno.

Variante (2):

En virtud de los resultados obtenidos en el ensayo anteriormente descrito, se decidió utilizar un reactivo acetilante más energético, el cloruro de acetilo. En un balón de 50 mL con buzo de agitación magnética se colocaron 10,9 mL (10,7 gr; 0,100 moles) de bencilamina, 3,5 mL (3,9 gr; 0,050 moles) de cloruro de acetilo y 20,0 mL de acetato de etilo, sumergiendo todo en baño de hielo. Se mantuvo con agitación durante 30 minutos.

Posteriormente, se volcó la mezcla de reacción sobre 50,0 mL de agua. Se dejó decantar las fases en ampolla de decantación y se reservó la fase superior. La fase inferior se extrajo con dos porciones de 10,0 mL de acetato de etilo. Se reunieron las fases orgánicas y se lavan una vez con 10 mL de agua, tres veces con 10,0 mL de solución de NaHCO_3 al 5% p/v y por último nuevamente con 10 mL de agua. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 (como desecante). Posteriormente se filtra el desecante y se evapora el acetato de etilo, obteniendo un sólido blanco-amarillento. El sólido obtenido se seca en vacío y posteriormente se recrystaliza desde etanol. Los resultados de estos ensayos se presentan en **Resultados: 4.2.5.1. Síntesis y caracterización de la NBAA.**

3.2.2.3. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL BZN EN ORINA HUMANA MEDIANTE REACCIÓN ENZIMÁTICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Con el fin de estudiar el metabolismo del BZN e identificar posibles derivados metabólicos en muestras de orina, se decidió someterlas a tratamiento enzimático con las enzimas β -glucuronidasa y arilsulfatasa.

Los ensayos con β -glucuronidasa y aril-sulfatasa pueden brindarnos información inicial respecto de la presencia de metabolitos de fase II (productos conjugados con ácido glururónico o arilsulfatos) en una muestra de orina pediátrica. Ambas enzimas catalizan la reacción de hidrólisis de los enlaces N- β -glucurónidos y arilsulfato convirtiendo los metabolitos de fase II nuevamente en metabolitos de fase I.

Luego del tratamiento con estas enzimas, las muestras fueron sometidas a una etapa de extracción ácida y básica. Posteriormente, los extractos se llevaron a sequedad y se resuspendieron para analizarse por cromatografía líquida asociada a espectrometría de

masas con la finalidad de poder detectar e identificar metabolitos estructuralmente relacionados con el BZN.

Tratamiento de orina de 24hs con las enzimas β -glucuronidasa y arilsulfatasa de muestras pediátricas y de voluntario adulto sano:

La descripción de las muestras procesadas se encuentra en la **Tabla 3.2.2.3.1** a continuación. Se trabajó con 15,00 mL de orina de 24 hs en una primera instancia y luego con 10,00 mL en tubos Falcon. Se ajustó el pH lo más cercano posible al óptimo de las enzimas ensayadas: pH 6,5 (los pHs óptimos eran respectivamente 6,5 para β -glucuronidasa y 6,2 para arilsulfatasa) usando pHímetro y por medio del agregado gota a gota de HCl ó NaOH 75 mM, según pH inicial de la orina utilizada.

Tabla 3.2.2.3.1. Descripción de las muestras procesadas

| Muestra | Nombre de la fracción | Enzima evaluada | Descripción / procedencia |
|--|-----------------------|---|--|
| Orina pediátrica (paciente en tratamiento) | Ori A | β -glucuronidasa | Recombinante de <i>E.Coli</i> BL21. Sigma Aldrich. |
| | Ori B | arilsulfatasa (posee además actividad glucuronidasa) | <i>H.Pomatia</i> , Tipo HP-2. Sigma Aldrich. |
| | Ori C | Sin enzima (Se agrega vol. de solución fisiológica) | |
| Orina adulto (monodosis) | Ori A' | β -glucuronidasa | Recombinante de <i>E.Coli</i> BL21. Sigma Aldrich. |
| | Ori B' | arilsulfatasa (posee además actividad β -glucuronidasa) | <i>H.Pomatia</i> , Tipo HP-2. Sigma Aldrich. |
| | Ori C' | Sin enzima (Se agrega vol. de solución fisiológica) | |

Se agregó la enzima en exceso teórico según estimaciones de eliminación de droga madre (sustrato de la enzima) considerando peso corporal, dosis recibida, diuresis y la actividad enzimática enunciada por el fabricante. Se realizó el ensayo en baño termostatzado a 37°C (temperatura óptima de las enzimas) por un período de 3hs (estimado como tiempo infinito de reacción).

Tabla 3.2.2.3.2.

| Muestra | volumen orina (μl) | pH inicial | Volumen NaOH 10% (μl) | pH final | Volumen extracción DCM (μl) | Volumen de resuspensión en FM (μl) |
|----------------------|--------------------|------------|-----------------------|----------|-----------------------------|------------------------------------|
| Ori A | 1200 | 1* | 40 | 3 | 400 x 3 | 800 |
| Ori A | 1200 | 1* | 80 | 10 | 400 x 3 | 800 |
| Ori B | 1200 | 1* | 40 | 3 | 400 x 3 | 800 |
| Ori B | 1200 | 1* | 80 | 10 | 400 x 3 | 800 |
| Ori C | 1200 | 2* | 35 | 3 | 400 x 3 | 800 |
| Ori C | 1200 | 2* | 70 | 8 | 400 x 3 | 800 |
| Ori A´ | 1900 | 2* | 160 | 12 | 700 x 3 | 700 |
| Ori A´ | 1900 | 2* | 60 | 3 | 700 x 3 | 700 |
| Ori B´ | 1900 | 2* | 100 | 10 | 700 x 3 | 700 |
| Ori B´ | 1900 | 2* | 60 | 3 | 700 x 3 | 700 |
| Ori C´ | 1900 | 2* | 100 | 10 | 700 x 3 | 700 |
| Ori C´ | 1900 | 2* | 60 | 3 | 700 x 3 | 700 |
| Ori bl | 1200 | 5 | - | 5 | 400 x 4 | 800 |
| Ori bl | 1200 | 5 | 35 | 12 | 400 x 4 | 800 |
| Ori BNZ ⁺ | 1200 | 5 | - | 5 | 400 x 4 | 800 |
| Ori BNZ ⁺ | 1200 | 5 | 20 | 11 | 400 x 4 | 800 |

(*) Los pH ácidos de estas orinas están determinados por el agregado de TCA 10 %p/v utilizado para cortar la reacción enzimática provocando la desnaturalización de las enzimas utilizadas. **Ori C y C´**: Estas fracciones no recibieron tratamiento enzimático por lo que el volumen de la solución enzimática fue reemplazado por el mismo volumen de solución fisiológica. (´) Estas fracciones son realizadas a partir de la muestra de orina de 24 hs de voluntario sano adulto tratado con BNZ. (+) Estas fracciones son obtenidas de voluntario adulto sano sin tratamiento farmacológico alguno como mínimo durante 15 días previos a la toma de muestra. El resto de las fracciones son realizadas a partir de una muestra de orina de 24 hs de paciente pediátrico tratado con BNZ.

Se registró a tiempos constantes las condiciones de pH y temperatura de la mezcla de reacción. En caso de ser necesario, se realizó la corrección de la/s condición/es de modo de mantenerlas constantes durante el ensayo, de esto también se tomó registro.

Las fluctuaciones de pH se corrigieron con el agregado del ácido o base arriba mencionado. Los tubos con las mezclas de reacción se mantuvieron en agitación constante dentro del baño utilizando buzo magnético. Para finalizar/cortar la reacción

enzimática se agregó el 15% del volumen de muestra en TCA (30% p/v), de modo de desnaturalizar las proteínas deteniendo de este modo la actividad enzimática.

A estas muestras más un blanco de matriz (orina sin droga; Ori bl) y una orina dopada con BZN (ori BNZ) a concentración conocida, se les realizó extracción mediante técnica desarrollada y antes descrita, con la consideración de que algunas fracciones fueron extraídas en condiciones ácidas y otras en condiciones básicas. A cada fracción de orina se le realizaron los pasos de extracción presentados en la Tabla 3.2.2.3.2.

Condiciones experimentales para el análisis cromatográfico:

Si bien las condiciones de fase móvil y solvente de resuspensión de los extractos secos fueron evaluados durante la etapa de desarrollo del método de extracción de BZN en orina humana, se volvieron a evaluar estas condiciones debido a que para los estudios de espectrometría de masas se requería aumentar la inespecificidad y poder así detectar más compuestos. Por esto se trabajó a longitudes de onda menores respecto de la usada en el desarrollo del método (313 nm).

Para la búsqueda de metabolitos en orina se planteó inicialmente un esquema de trabajo en gradiente que fue de tiempo 0 a 10 min con agua: AcN en proporción 90:10 y luego un descenso lineal hasta 75:25 en otros 10 minutos y manteniendo a esas condiciones hasta media hora total de ensayo, con flujos que variaron desde 0.8 a 1 mL/min y a una longitud de onda de 220 nm. Se evaluaron algunas modificaciones de este esquema inicial, pero no logrando condiciones repetitivas del ensayo, se volvió a una estrategia isocrática evaluando flujos de 0,4 a 1,2 mL/min.

Finalmente, las mejores condiciones de fase móvil para el análisis de las metabolitos urinarios estuvieron dados por una corrida isocrática continua de Agua:AcN (90:10) y flujo 0.4 mL/min, con tiempos de retención para el BZN en torno a los 20 minutos y a longitud de onda de 220nm.

Columna utilizada: Lichrocart 125-4. Lichrospher 100 mm RP-8 (5µm), Merck. Los cromatogramas de referencia obtenidos para estas muestras se presentan en **Resultados: 4.3.4. Identificación de metabolitos urinarios del BZN.**

3.2.3. AMINO-BZN: ENSAYOS PRELIMINARES DE SÍNTESIS ELECTROQUÍMICA DEL COMPUESTO

Se realizaron ensayos preliminares de electrólisis a potencial controlado con el fin de obtener productos de reducción electroquímica del BZN en cantidades preparativas que, seguidas de técnicas analíticas como cromatografía en capa fina u otras variantes y técnicas espectroscópicas, permitieran la identificación, el aislamiento y posterior purificación de dichos productos.

Para esto, se tomó como punto de partida para las condiciones experimentales de las electrólisis a ensayar, los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo mediante estudios voltamperométricos de las propiedades electroquímicas del BZN.⁹³

La preparación de las soluciones y todos los experimentos electroquímicos, se llevaron a cabo dentro de una caja de guantes bajo atmósfera de nitrógeno seco **Figura 3.2.3.1**. Los solventes y demás reactivos fueron de grado analítico y se purificaron por métodos estándar.⁹⁴ Los solventes empleados fueron DMF, DMSO y EtOH. Se secaron con tamices moleculares tipo 4A activados y almacenados en la caja de guantes. Los electrolitos soporte utilizados fueron perclorato de sodio, perclorato de tetraetil amonio y perclorato de litio. Fueron secados al vacío a 150°C durante varias horas. La droga utilizada fue BNZ.

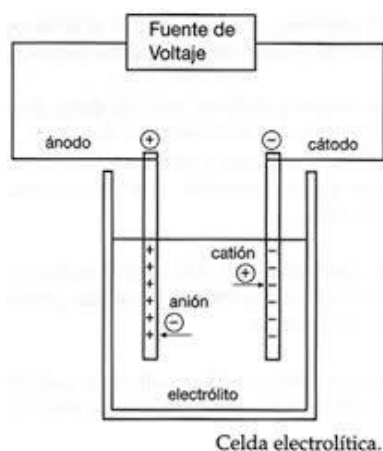
Las electrólisis preparativas se realizaron en celdas de vidrio separadas por un puente salino con entrada y salida de nitrógeno seco (ver **Figura 3.2.3.2**). El electrodo de trabajo (**ET**) fue un disco de carbón vítreo de diámetro 3 mm encapsulado en teflón y el contraelectrodo (**CE**) fue una chapa de Pt 2 cm². Se empleó como electrodo de referencia (**ER**) un electrodo de Ag⁺ (0,1 M, AgCl /Ag), respecto del cual están referidos todos los potenciales informados. Antes de cada medición electroquímica el **ET** fue pulido con alúmina de hasta 1 μm y luego colocado en un baño ultrasónico con agua. El secado final se realizó con gas nitrógeno seco.

La disposición simplificada de un equipo estándar para la aplicación de esta técnica electroquímica se muestra en el **Esquema 3.2.3.1**. En nuestro caso los compartimientos ánodo y cátodo están separados por una membrana de vidrio poroso. Para medir las características de corriente-potencial correspondientes a un solo electrodo (**ET**), se coloca en la celda un tercer electrodo (electrodo de referencia, **ER**) ubicado cerca del primero. El electrodo restante cuyas características se desea que no influyan en la medida se denomina contraelectrodo (**CE**).

⁹³ Propiedades Electroquímicas de Fármacos Antichagásicos: Benznidazol. Arce, L. Tesina de grado para la Licenciatura en Química.UNLPam 2014

⁹⁴ Perrin D.D., Armarego W.L.F., Purification of Laboratory Chemicals, *Oxford, Pergamon Press*, 1988

Esquema 3.2.3.1.



Desarrollo experimental:

Se pesó la masa de 50,00 mL de solución de BZN 1 mM aproximadamente, en DMF con NaClO_4 0,1M como electrolito soporte (ES). Se seteó la electrolisis en un potencial de 1909 mV = 1,91 Volts durante aproximadamente 2,7 horas, con agitación. Al finalizar la electrolisis se vuelve a pesar la masa de la solución final.

- ✓ Peso de la solución inicial: 45,955 gr
- ✓ Peso de la solución final: 45,564 gr

Tanto antes de iniciar como al finalizar la electrolisis se realiza un voltamperograma para obtener un gráfico de los procesos que le ocurren a la muestra a distintos potenciales vs corrientes (**Esquema 3.2.3.2**) Mediante el valor de la corriente en el voltamperograma inicial y el final se puede aproximar la concentración inicial y final de BZN en la muestra. A través de las diferencias de masa inicial y final de la muestra se puede calcular la carga que circuló por el sistema y con la corriente registrada evaluar el número de electrones puestos en juego en la reacción.

$$\Delta m = \Delta C/V = Q/nF = ixt /nF$$

Donde:

Δm = diferencia de masa de solución inicial- final

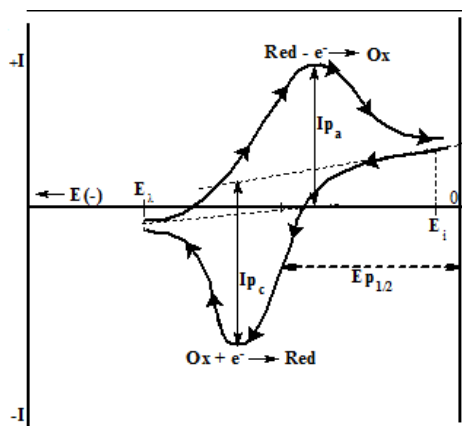
ΔC = diferencia de concentración de BZN en las soluciones inicial- final

V= voltaje

Q= Carga neta que circulo por el sistema

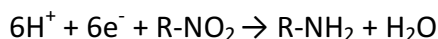
n= número de electrones
 F= constante de Faraday
 i= corriente eléctrica
 t= tiempo

Esquema 3.2.3.2. Voltamperograma cíclico típico



Dificultades durante los desarrollos:

- ✓ Del análisis de los voltamperogramas iniciales y finales encontramos que el sistema se comportó de manera “cuasi” reversible, por lo que no estaríamos encontrando productos reducidos estables
- ✓ Los análisis cromatográficos realizados a las soluciones pre y post electrolisis, no plantearon una disminución significativa del pico cromatográfico BZN, ni la aparición de un pico cuantitativo que pudiera ser el NH₂-BZN.
- ✓ No se pudo determinar si la corriente que circuló por el sistema fue efectivamente utilizada para la reducción al NH₂-BZN o para la formación de intermediarios
- ✓ Los intermediarios radicalarios en medios no acuosos suelen ser muy estables, pero no así en medios acuosos. Se sugirió realizar otra electrolisis en medio acuoso.
- ✓ Las reducciones pueden producir un aumento de pH y dejar de ser un sistema controlado, por lo que se sugirió en este caso repetir la electrolisis con soluciones buffereadas.
- ✓ Por otro lado, la electrolisis debería verse favorecida en condiciones ácidas según la siguiente reacción:



Nuevos ensayos

- ✓ Se evaluó a los 5 días la solución postelectrolisis mediante voltamperometría cíclica, donde encontramos que la corriente en el pico de interés se había reducido

a la mitad. Esto podría suponer que hubo una descomposición parcial de algún producto.

- ✓ Se realizó un nuevo voltamperograma en medio ácido con TFA de la solución electrolizada. Se generaron corrientes mayores y a potenciales más bajos, pero los picos de observados fueron los mismos que los encontrados en medio neutro.
- ✓ Se realizaron TLC de la solución inicial y postelectrólisis con distintos solventes: AE, AcN, MeOH, MeOH+AcN
- ✓ Se evaluó mediante HPLC con otros buffers no utilizados anteriormente (NH_4Ac).

Se propuso un nuevo sistema para la electrolisis: en medio neutro, con EtOH como solvente de reacción, con LiClO_4 como ES y BZN. En agitación y con burbujeo de N_2 .

- ✓ Masa de la solución inicial: 37,980gr
- ✓ Masa de la solución postelectrólisis: 37,752gr
- ✓ Voltaje: 1500 mV = 1,5Volts
- ✓ Tiempo de la electrolisis: 121 minutos

Se realizaron nuevas búsquedas cromatográficas mediante HPLC-UV con distintos sistemas de solventes, columnas y longitudes de onda. Finalmente se evaluó mediante HPLC-MS/MS la presencia de alguna estructura compatible con amino-BZN. Los resultados de estos ensayos se presentan en **Resultados: 4.4. Resultados preliminares de la síntesis electroquímica de $\text{NH}_2\text{-BZN}$.**



Figura 3.2.3.1. Caja seca. DRI-Train HE-193-1 Vacuum /Atmosphere Corporation

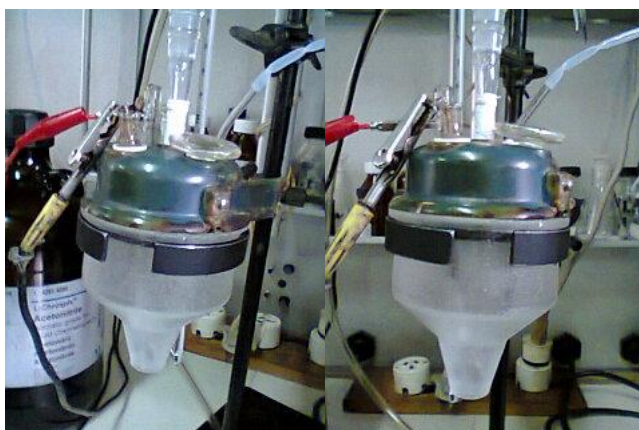


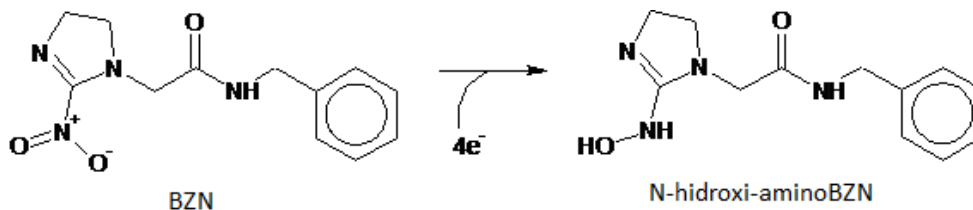
Figura 3.2.3.2. Celda utilizada en la electrólisis preparativa

3.2.4. N-HIDROXI-AMINO-BZN

En los estudios de espectroscopía de masas/masas en extractos de orina humana de paciente pediátrico en tratamiento y en voluntario adulto sano que recibió monodosis de BZN, se identificaron dos compuestos estructuralmente relacionados con el BZN. Uno de ellos es el N-hidroxi-amino-BZN (N-OH-NH₂BZN). La formación del mismo sería el producto de la reducción secuencial del grupo nitro del BZN mediante dos pares de electrones (cuatro electrones en total) ver **Figura 3.2.4.1.**

Este compuesto está planteado en la bibliografía existente como un intermediario en la vía de reducción del BZN en el metabolismo parasitario en donde la actividad de la enzima nitroreductasa de tipo I del parásito llevaría a la formación de metabolitos altamente reactivos.⁹⁵ A su vez, este compuesto fue indentificado en estudios de metabolómica en *T.cruzi*.⁹⁶

Figura 3.2.4.1. Reducción del BZN para formar el N-hidroxi-aminoBZN



⁹⁵ Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases results in glyoxal formation. *Antim Agents Chemother.* 2012.

⁹⁶ Trochine A, Creek DJ, Faral-Tello P, Barrett MP, Robello C. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. 2014

3.2.5. DOSAJES DE NFX:

3.2.5.1. DESARROLLO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN PLASMA HUMANO POR HPLC

Preparación de soluciones patrón de NFX:

Se dispuso de NFX, de grado de pureza indeterminado, provisto por Bayer. Este se presenta como una sustancia pulverulenta, de granulación regular, inodora pero de coloración amarilla intensa.

Debido a las similitudes en términos de polaridad e hidrofobicidad del NFX con el BZN, se tomaron como referencias las solubilidades halladas para el BZN en distintos solventes orgánicos. En este caso se preparó una solución patrón 1 (SP1) de droga sólida en DMSO. Se pesaron 0,1133 gr de NFX que se disolvieron en un volumen mínimo de DMSO y luego se llevó a volumen final de 5,00 mL en matraz aforado, también con DMSO. Se obtuvo una concentración final de 22,66 mg/mL. Se rotuló con nombre y fecha y se almacenó a 4 °C.

Se realizaron soluciones de trabajo (ST) de NFX mediante la realización de una dilución adecuada de la SP 1 inicial con metanol como solvente. Se trabajó con estas ST en la búsqueda de condiciones cromatográficas que permitieran una buena resolución del pico para NFX.

Se realizó una dilución de 1/5 de las SP con metanol para preparar una ST1 de concentración 4,532 mg/mL. Las condiciones exploratorias para el análisis mediante HPLC se fijaron según la bibliografía existente^{97,98} a saber:

Longitud de onda seleccionada: 395 nm

Proporción de solvente en la fase móvil: Metanol: Agua (60:40) %v/v

Flujo: 0,6 mL/min

Columna: C-18 de (100 x 4,6) mm de dimensiones internas y 5 micrones de diámetro de partícula.

Se probaron variaciones en los porcentajes de la fase móvil Metanol/agua, pero la que generó la mejor resolución del pico cromatográfico y sin generar un aumento excesivo de la presión del sistema fue la antes expuesta.

⁹⁷ Bulffer RF, Castro JA, Fanelli SL, *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 45 (2011) 463–470.

⁹⁸ Paulos C, Paredes J, Vasquez I, Kunze G, Gonzalez-Martín G, *J.Chromatogr. B* 433(1988)359–362.

Con estas condiciones instrumentales seleccionadas se volvió al trabajo de mesada en el laboratorio y siguiendo un esquema similar al desarrollado para las técnicas con BZN se probó un método para la extracción de NFX de plasma heparinizado. En una primera instancia se realizó una búsqueda bibliográfica de las técnicas exploradas al momento para NFX o drogas que pudieran comportarse similarmente.^{98,99,97}

A pesar de tener un método recientemente desarrollado en colaboración con nuestro grupo¹⁰⁰ en el cual se trabajó con NFX en plasma heparinizado mediante líquidos iónicos, se tuvo que abordar nuevamente la búsqueda de otra técnica de extracción para NFX ya que los requerimientos analíticos para la aplicación de la técnica no eran posibles desde los fines clínicos.¹⁰¹ El volumen de muestra requerido por esta técnica, está entorno a los 5,00 mL, mientras que la disponibilidad usual en muestras reales (obtenidos de pacientes) para este tipo de estudios rondan los 1,00 a 2,00 mL de plasma.

Abordamos las siguientes variantes para la extracción de NFX en plasma. Para ello se trabajó con muestras de plasma adicionado a concentraciones finales en torno a los 5 µg/ mL, valor obtenido de las estimaciones clínicas y comparativas respecto de lo desarrollado para BZN y la bibliografía consultada. Los resultados de las técnicas probadas se exponen en **Resultados: 4.7.1. Análisis de las metodologías propuestas para la extracción de NFX en plasma.**

Extracción mediante filtración con membrana:

Se partió de 1,0 mL de plasma heparinizado. Se agregó 100 µL de TCA al 30% p/v y se vorteo por 30 segundos. Se sonicó 5 minutos y centrifugó 10 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se filtró mediante portafiltro adaptado a jeringa de 1 mL y filtro de membrana nitrocelulosa de 0,45 micrones de diámetro de poro, en centrifuga (tiempos largos), de manera análoga a lo realizado en la filtración de leche materna para BZN. El ultra filtrado obtenido de esta manera se inyectó directamente en el HPLC.

Extracción líquido-líquido variante (1):

En esta técnica se recurrió a la variante de trabajar con una etapa de extracción líquido-líquido mediante el solvente orgánico acetato de etilo (AE). Se comenzó desde 1,0 mL de plasma heparinizado. Se agregó 100 µL de TCA al 30% p/v y se vorteo por 30 segundos. Se sonicó 5 minutos. Se realizaron 3 etapas de extracción cada una con 500 µL

⁹⁹ Medenwald H, Brandau K, Schlossmann K. *Arzneim. Forsch.* 9 (1972) 1613–1617.

¹⁰⁰ Dres. Padró y Reta. Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Métodos Analíticos (LIDMA), FCE-UNLP.

¹⁰¹ Padró JM, Marsón ME, Mastrantonio GE, et al. Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of nifurtimox and benznidazole in human plasma. *Talanta*. 2013;107:95–102

de AE: se agrega a la muestra 500 μ L del solvente, se vortea por 30 segundos, se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad, se extrae mediante pipeta automática la fase orgánica superior. Se recoge la fase orgánica y se comienza un nuevo ciclo de extracción.

Los extractos orgánicos de los ciclos de extracción se recolectaron en un mismo tubo de vidrio cónico de boca esmerilada para ser llevado a sequedad en rotavapor. El extracto seco se resuspendió en 500 μ L de AcN y se guardó en freezer a -20°C para su análisis por HPLC. Esta técnica plantea un factor de concentración de 2 respecto a la muestra original. En el momento del análisis instrumental, el extracto se descongeló y se centrifugó antes de ser inyectados en el equipo HPLC.

Extracción líquido-líquido variante (2):

En esta técnica se recurrió a la variante de trabajar con una etapa de extracción líquido-líquido mediante N-hexano como solvente.

Se partió de 1,0 mL de plasma heparinizado. Se agregó 100 μ L de TCA al 30% p/v y se vorteo por 30 segundos. Se sonicó 5 minutos. Se realizaron 3 etapas de extracción cada una con 500 μ L de N-hexano: se agrega a la muestra 500 μ L del solvente, se vortea por 30 segundos, se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad, se extrae mediante pipeta automática la fase orgánica superior y se comienza un nuevo ciclo de extracción.

Los extractos orgánicos se recolectaron en un mismo tubo de vidrio cónico de boca esmerilada para ser llevado a sequedad en rotavapor. El extracto seco se resuspendió en 500 μ L de AcN y se guardó en freezer a -20°C para su análisis por HPLC.

En el momento del análisis instrumental, el extracto se descongeló y centrifugó antes de ser inyectado en el equipo HPLC.

Extracción líquido-líquido variante (3):

En esta técnica se recurrió a la variante de trabajar con una etapa de desgrasado de la muestra. Se comenzó desde 1,0 mL de plasma heparinizado. Se agregó 100 μ L de TCA al 30% p/v y se vorteo por 30 segundos. Se sonicó 5 minutos. El desgrasado consistió en la extracción en dos etapas con 600 μ L de n-hexano. Luego se realizaron 3 etapas de extracción del fármaco cada una con 500 μ L de AE, como se describió anteriormente. El total del extracto orgánico se recolectó en un mismo tubo de vidrio cónico de boca esmerilada para ser llevado a sequedad en rotavapor. El extracto seco se resuspendió en 500 μ L de AcN y se guardó en freezer a -20°C para su análisis por HPLC. En el momento

del análisis instrumental, el extracto se descongeló y centrifugó antes de ser inyectados en el equipo HPLC.

Extracción líquido-líquido variante (4):

En esta técnica se recurrió a la variante de trabajar con una etapa de acondicionamiento del pH de la muestra, previo a la extracción líquido-líquido mediante solvente orgánico. Se comenzó desde dos fracciones de 1,0 mL de plasma heparinizado. A ambas se le agregó 100 µL de TCA al 30% p/v y se las vorteoó por 30 segundos. Se sonicó 5 minutos. Se realizó un ajuste de pH de modo de trabajar con dos fracciones de pH distintos: una fracción se mantiene a pH ácido (fracción acida) dado por el agregado del TCA en la desproteización y la otra fracción se llevó a pH neutro (fracción neutra) mediante el agregado de 80 µL de NaOH 1N.

Ambas fracciones continuaron con las etapas de extracción mediante el solvente AE según lo descripto anteriormente. El total de los extractos orgánicos para cada fracción se recolectaron en distintos tubos de vidrio cónicos de boca esmerilada para ser llevado a sequedad en rotavapor. Los extractos secos se resuspendieron en 500 µL de MeOH y se guardaron en freezer a -20°C para su análisis por HPLC.

En el momento del análisis instrumental, los extractos se descongelaron y centrifugaron antes de ser inyectados en el equipo HPLC. Del análisis de las recuperaciones halladas para cada variante se eligió continuar estudiando la que arrojaba mejores porcentajes de recuperación (% R). Ver en **Resultados: Tabla 4.7.1.1.**

Inconvenientes cromatográficos durante la evolución de los ensayos:

En el transcurso del desarrollo de la técnica, la columna C-18 con la que se estaba trabajando empezó a generar perfiles cromatográficos sucios, presentó poca capacidad resolutive y generaba aumentos de la presión del sistema. Debido a que no contábamos con otra columna C-18 de iguales características se cambió por una Intertsil C-18 ODS-3V (encapada) de (150 x 4,6) mm y 5 micrones de tamaño de partícula. Si bien la naturaleza química de este tipo de columnas le confiere propiedades menos polares al relleno de la misma, se encontraron muy buenos perfiles cromatográficos y tiempos de retención adecuados para el desarrollo de un método analítico.

Se tuvo que ajustar para esta columna nuevas condiciones experimentales para el seteo del equipo:

Fase móvil: Metanol: agua (50:50) %v/v

Flujo: 0,8 mL/min

Longitud de onda: 395 nm

Tiempo de retención para NFX en estas condiciones: en torno a los 8 min.

3.2.5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

En base a las recuperaciones halladas para las técnicas probadas, la complejidad y tiempos demandantes de los pasos, se seleccionó el mejor método para la extracción de NFX en plasma humano.

Utilizando esta técnica, se armó una curva de calibración que contó de 4 niveles de concentración con triplicado para todos los niveles. Con los triplicados se evaluó el coeficiente de variación % (CV%) intradía para cada nivel.

Esta curva de calibración fue repetida en 3 días distintos, respetando las mismas condiciones experimentales y se calculó con estos datos el CV% interdía de la pendiente de las rectas de calibración.

Para estimar la recuperación del método (R%), se evaluó una muestra de 5.01 µg/mL (llamada muestra control de calidad QC), procesándola y hallando la concentración mediante la utilización de la curva de calibrado. Se calcularon las cifras de mérito de la curva de calibrado, la exactitud y precisión, el rango lineal y los límites de detección y cuantificación para el método desarrollado.

3.2.5.3. EVALUACIÓN DE TÉCNICA DE FILTRADO PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NFX EN LECHE MATERNA HUMANA POR HPLC:

Preparación de soluciones patrón de NFX:

Se preparó una solución patrón (SP2) de droga sólida NFX en DMSO. Se pesaron 0,0135 gr de NFX que se disolvieron en un volumen mínimo de DMSO y luego se llevó a volumen final de 10,00 mL en matraz aforado con DMSO. Se obtuvo una concentración final de 1,35 mg/mL. Se rotuló con nombre y fecha y se almacenó a 4 °C.

Se realizaron ST2 de NFX mediante la realización de una dilución adecuada de la SP2 inicial con metanol como solvente. Se trabajó con estas ST2 en búsqueda de condiciones cromatográficas que permitieran una buena resolución del pico para NFX.

Condiciones cromatográficas para el análisis mediante HPLC fueron tomadas de lo propuesto para el análisis en plasma de NFX:

Longitud de onda seleccionada: 395nm

Proporción de solvente en la fase móvil: MeOH: Agua (50:50) %v/v

Flujo: 0,8 mL/min

Columna: Intertsil C-18 ODS-3V (encapada) de (150 x 4,6) mm y 5 micrones de tamaño de partícula.

Mediante estas condiciones instrumentales se realizó un esquema de trabajo similar al desarrollado para las técnicas con BZN. En esta instancia se evaluó una adaptación del método de extracción de BZN en leche materna por filtración.

Pasos del método de filtración:

Se tomó un volumen de 1000 µL de leche materna dopada con la ST2 de NFX de modo de obtener concentraciones finales del orden de los 5 µg/mL. La muestra se colocó en un tubo plástico de hemólisis. Se agregó 100 µL de TCA al 30% p/v para desproteínizar la muestra. Se vortió por 30 segundos, luego se sonicó durante 10 minutos. Se continuó mediante el filtrado de la muestra con un filtro, portafiltro y jeringa con membrana de 0,45 micrones de diámetro en centrifuga. El ultrafiltrado recogido, se guardó en tubo eppendorff rotulado en freezer a -20°C hasta su análisis mediante HPLC.

Inconvenientes hallados durante la evolución de los ensayos:

Tabla 3.2.5.3.1.

| Parámetro cromatográfico | |
|-------------------------------------|------------------------|
| Fase Móvil: Composición | MeOH: Agua |
| Fase Móvil: Proporción de solventes | de 80:20 a 25:75 |
| Flujo | de 0,6 a 1 (mL/min) |
| Fase Móvil: Composición | MeOH: Agua:AcN |
| Fase Móvil: proporción de solventes | de 80:10:10 a 40:10:50 |
| | de 70:15:15 a 35:45:20 |
| Flujo | de 0,4 a 1 (mL/min) |

Las primeras muestras pretratadas y analizadas mediante HPLC-UV arrojaron cromatogramas con perfiles donde la fracción frente de corrida tardaba en salir hasta casi el tiempo de retención del pico NFX. No se obtenía una línea de base clara antes del comienzo del pico para NFX, lo que resultó una gran dificultad para cuantificarlo. Además, los picos de NFX para las primeras concentraciones fijas eran bastante chicos. Ver en **Resultados: 4.7.4. Optimización de técnica de filtrado para la extracción de NFX en leche materna.** Se probaron distintas estrategias cromatográficas para minimizar estos

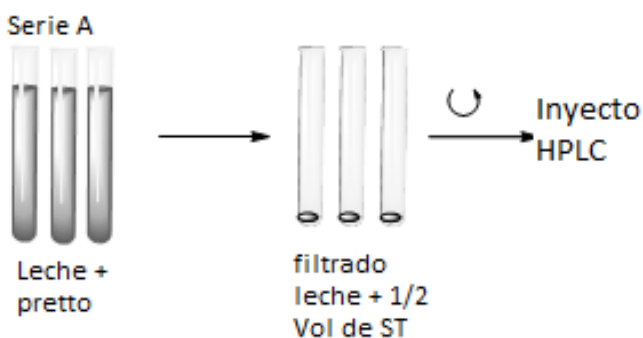
inconvenientes, mediante el ajuste de la fase móvil, la variación del flujo y por el agregado de AcN como tercer solvente de Fase Móvil. Estos ajustes se resumen en la **Tabla 3.2.5.3.1 siguiente:**

Sin tener mejoras sustanciales en los perfiles, se diluyó el ultrafiltrado de leche materna mediante el agregado de una cantidad fija de ST2 de NFX, tomando como base el método del sobreagregado.¹⁰² Así, por un lado se pretende minimizar los efectos de concentración de las especies que componen el frente de solvente de la muestra filtrada. Por el otro, el hecho de agregar a cada muestra una cantidad fija basal de NFX, favorece la obtención de picos más grandes y mejor cuantificables.

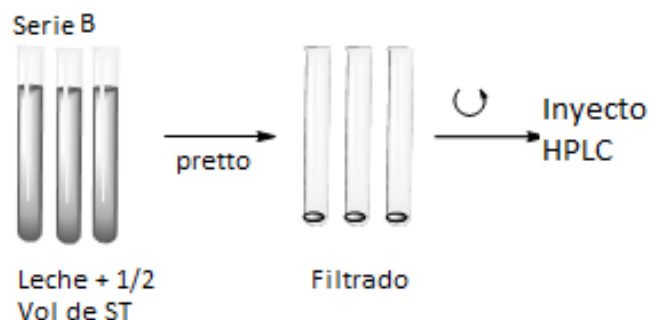
Se evaluó si el sobreagregado debía realizarse en el último paso del pretratamiento, es decir, en condiciones justo antes de medir en el equipo cromatográfico o si debía realizarse al comienzo de la etapa de pretratamiento de la muestra. Para esto se realizó un ensayo en paralelo de dos series de muestras de igual concentración de NFX. Una serie de 3 muestras se pretrató y al producto filtrado se le adicionó $\frac{1}{2}$ del volumen en una ST de concentración fija conocida. Se agitó manualmente, luego se centrifugó y se inyectó en el HPLC. Esta serie la llamamos serie A.

La serie B se compuso de otra tanda de 3 muestras donde el paso de la adición de $\frac{1}{2}$ del volumen en la ST ocurrió al inicio, luego de la toma de muestra. Se continuó con la etapa de pretratamiento y finalmente el filtrado obtenido se centrifugó e inyectó en el HPLC. El **Esquema 3.2.5.3.1** presenta la secuencia de los pasos para cada serie.

Esquema 3.2.5.3.1.



¹⁰² Guía de TP, Cátedra Química Analítica III para la Licenciatura en Química, FCE-UNLP. Año 2014



Los resultados de este ensayo y la técnica final seleccionada se presenta en **Resultados: 4.7.4. Optimización de técnica de filtrado para la extracción de NFX en leche materna.**

3.2.5.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NFX EN LECHE MATERNA

Utilizando la técnica propuesta, se armó una curva de calibración que contó de 5 niveles de concentración con triplicado para los dos niveles inferiores y duplicado para el resto de los niveles. El primer nivel de la curva de calibrado, será una muestra problema sin analito, excepto por el sobreagregado basal de la ST.

Con los triplicados y duplicados se evaluó el coeficiente de variación % (CV%) intradía para cada nivel. Esta curva de calibración fue repetida en 3 días distintos, respetando las mismas condiciones experimentales y se calculó con estos datos el CV interdía de la pendiente de las rectas de calibración.

Para estimar la recuperación del método (R%), se evaluó una muestra de 5 µg/mL (QC) (con el sobreagregado de NFX), procesándola y hallando la concentración mediante la utilización de la curva de calibrado.

Se calcularon las cifras de mérito de la curva, la exactitud y precisión, el rango lineal y los límites de detección y cuantificación para el método desarrollado. Con el análisis de estos datos se realizó la validación del método. (Ver en **Resultados: 4.7.5. Validación del método de extracción de NFX en leche materna.**)

Con la técnica validada se dosó la concentración de NFX en 21 muestras de leche de madres en período de lactancia bajo tratamiento farmacológico con NFX. Estos dosajes se presentan en **Resultados: 4.7.6. Dosajes de NFX en muestras de leche materna.**

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1. TRATAMIENTO DE DATOS:

Los cálculos estadísticos para establecer la validez de los parámetros obtenidos en los métodos desarrollados y las fórmulas utilizadas se presentan en el **ANEXO I**.

4.2. DE LOS DOSAJES DE BZN Y DERIVADOS EN PLASMA HUMANO

4.2.1. SOBRE EL DESARROLLO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN PLASMA HUMANO POR HPLC:

En la caracterización química inicial del BZN se determinó la solubilidad del mismo frente a distintos solventes (**Tabla 4.2.1.1.**):

Tabla 4.2.1.1.

| Solvente | Solubilidad |
|----------|-------------|
| Metanol | Intermedia |
| AE | Buena |
| AcN | Buena |
| DMSO | muy buena |
| Agua | Baja |
| DMF | muy buena |

Referencias: Baja: < 4 mg/mL, Intermedia: entre 5 y 10 mg/mL, Buena: > 10 mg/mL, Muy buena: > 100 mg/mL.

Elección de longitud de onda: En la búsqueda de condiciones cromatográficas para el BZN se realizó un barrido del espectro UV-visible para la detección de máximos de absorción. Se barrieron longitudes de onda desde el UV cercano al visible (200 a 800 nm) **Gráfico 4.2.1.1.** y **Tabla 4.2.1.2.**

Gráfico 4.2.1.1. Barrido de longitudes de onda para espectro UV-Visible. Solución de BZN 79 µg/mL en etanol.

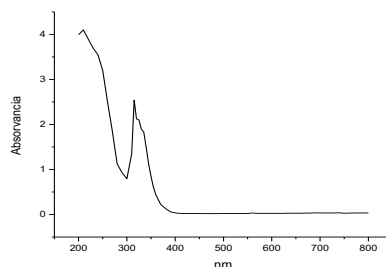


Tabla 4.2.1.2. Barrido de longitudes de onda para espectro UV-Visible. Solución de BZN 79 µg/mL en etanol.

| λ (nm) | Abs. | λ (nm) | Abs. | λ (nm) | Abs. | λ (nm) | Abs. | λ (nm) | Abs. |
|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|
| 200 | 3,994 | 325 | 2,100 | 410 | 0,025 | 540 | 0,023 | 680 | 0,031 |
| 210 | 4,100 | 330 | 1,900 | 415 | 0,023 | 550 | 0,022 | 690 | 0,037 |
| 220 | 3,900 | 335 | 1,830 | 420 | 0,020 | 560 | 0,035 | 700 | 0,034 |
| 230 | 3,700 | 340 | 1,479 | 430 | 0,022 | 570 | 0,027 | 710 | 0,033 |
| 240 | 3,550 | 345 | 1,130 | 440 | 0,022 | 580 | 0,025 | 720 | 0,034 |
| 250 | 3,200 | 350 | 0,842 | 450 | 0,022 | 590 | 0,025 | 730 | 0,035 |
| 260 | 2,500 | 355 | 0,610 | 460 | 0,021 | 600 | 0,025 | 740 | 0,038 |
| 270 | 1,855 | 360 | 0,438 | 470 | 0,021 | 610 | 0,025 | 750 | 0,030 |
| 280 | 1,125 | 370 | 0,224 | 480 | 0,021 | 620 | 0,026 | 760 | 0,032 |
| 290 | 0,928 | 380 | 0,134 | 490 | 0,021 | 630 | 0,028 | 770 | 0,033 |
| 300 | 0,795 | 390 | 0,064 | 500 | 0,022 | 640 | 0,029 | 780 | 0,033 |
| 310 | 1,350 | 395 | 0,047 | 510 | 0,021 | 650 | 0,030 | 790 | 0,034 |
| 315 | 2,540 | 400 | 0,037 | 520 | 0,022 | 660 | 0,030 | 800 | 0,034 |
| 320 | 2,125 | 405 | 0,029 | 530 | 0,022 | 670 | 0,031 | - | - |

Selección de condiciones cromatográficas:

Tabla 4.2.1.3.

| Solventes/proporción | Gradiente / tiempos (min) | Tiempo retención BZN (min) | Resolución cromatográfica | Flujos mL/min |
|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|
| Opción 1: Agua:AcN desde 90:10 a 70:30 | 0 a 5 | Sin aparición del pico | - | 0,8 |
| en 70:30 | 5 a 20 | 14 | pobre | 0,8 |
| Opción 2: Buffer gly:AcN en 90:10 | 0 a 3 | Sin aparición del pico | - | 0,9 |
| desde 90:10 a 65:35 | 3 a 7 | Sin aparición del pico | - | 0,9 |
| desde 65:35 a 60:40 | 7 a 12 | 10 | aceptable | 0,9 |
| Opción 3: Buffer gly-Ona:AcN desde 90:10 | 0 a 5 | Sin aparición del pico | - | 0,7 |
| desde 90:10 a 75:25 | 5 a 15 | 12 | Buena | 0,7 |
| Opción 4: Isocrático: Buffer Gly-Ona:AcN 80:20 | - | 7 | Muy buena | 0,8 |
| 75:25 | - | 6 | Muy buena | 1,0 |

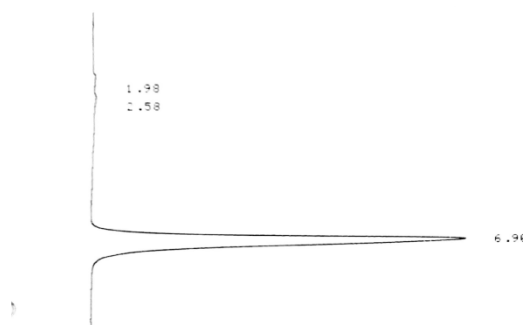
En la **Tabla 4.2.1.3** se presentan las condiciones evaluadas para los parámetros cromatográficos. Se trabajó con una columna de relleno C-18 de dimensiones: 100 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Se evaluaron sistemas en gradientes e isocráticos. Las condiciones finalmente seleccionadas se describen en la **Tabla 4.2.1.4**.

En la **Figura 4.2.1.1** se muestra un cromatograma representativo de la resolución cromatográfica encontrada mediante las condiciones seleccionadas para una solución patrón de BZN.

Tabla 4.2.1.4.

| Condiciones cromatográficas seleccionadas | |
|---|--|
| Columna: | C-18; (100 x 4,6) mm. 5 μ m |
| Fase Móvil: | Buffer Glicina-ONA: Acetonitrilo (75:25) |
| Flujo: | 1 mL/min |
| Long. de onda: | 313 nm |

Figura 4.2.1.1. Cromatograma representativo de una solución patrón de BZN en las condiciones seleccionadas.



4.2.1.1 ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE EXTRACCIÓN PARA BZN EN PLASMA HUMANO

En la Tabla **4.2.1.1.1** se resumen las cuatro variantes evaluadas, para el desarrollo de un método de extracción de BZN en plasma humano adicionado con BZN.

Para las alternativas de extracción líquido líquido, en el caso de la variante 1, las muestras “reales” (de pacientes) están anticoaguladas con heparina, no con oxalato, por lo que sería necesario evaluar la influencia del mismo en la determinación. Por otro lado, utiliza gran cantidad de solvente orgánico para la extracción. Para la variante 2, no se plantean etapas de desnaturalización de proteínas y la precipitación con MeOH no arroja buenas recuperaciones.

En cuanto a las alternativas con extracción sólido líquido, para la variante 1, tampoco se incorporan etapas de desnaturalización de proteínas, sin embargo, se mejora

mucho la recuperación iniciando el procedimiento desde una muestra liofilizada. En el caso de la variante 2, no se incorporan etapas de desnaturalización de proteínas y el AE mejora la extracción.

Tabla 4.2.1.1.1.

| Técnica Etapa | Extracción Liq/Liq variante 1 | Extracción Liq/Liq variante 2 | Extracción Sól/Liq variante 1 | Extracción Sól/Liq variante 2 |
|------------------------------|---|--|--|--|
| Pretratamiento | 2 mL plasma oxalatado 4 mL agua destilada 2 mL HPO ₃ al 20% p/v vortex -centrifugar | 2 mL plasma heparinizado | 2 mL plasma liofilizado pulverizado con varilla | 2 mL plasma liofilizado pulverizado con varilla |
| Extracción / Purificación | 5 mL sobrenadante 280 µL NaOH 5 N agitación manual 20 mL cloroformo con isoamil carbinol al 1% v/v | 4 mL de MeOH vortex centrífuga | 4 mL de MeOH vortex centrífuga | 4 mL de AE vortex centrífuga |
| Concentración / Purificación | vortex sequedad, corriente de N ₂ fracciones se resuspenden en MeOH y AcN | sobrenadante sequedad en corriente de N ₂ fracciones se resuspenden en MeOH y AcN | sequedad en corriente de N ₂ fracciones se resuspenden en MeOH, AcN y mezcla de ambos. | sequedad en corriente de N ₂ fracciones se resuspenden en MeOH, AcN y mezcla de ambos. |
| Resultados Analíticos | Recuperación 55% Pobre resolución cromatográfica | Recuperación <40% Pobre resolución cromatográfica | Recuperación 65% Resolución cromatográfica buena | Recuperación 72% Resolución cromatográfica buena |

4.2.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA SELECCIONADA PARA EXTRACCIÓN DE BZN EN PLASMA HUMANO

Según lo planteado en la Tabla **4.2.1.1.1**, la técnica de extracción sólido-líquido variante 2, arrojó las mejores recuperaciones con buenos perfiles cromatográficos para el pico de BZN. Se llevaron a cabo los ensayos planteados en la **Tabla 3.2.1.1.2** del capítulo anterior. Los resultados podrían listarse:

- ✓ La desnaturalización ácida con TCA 30% p/v y el agregado de volúmenes chicos (100 µL), produjo una desnaturalización suficiente para los fines analíticos buscados. Al trabajar con volúmenes mayores la muestra aumentaba mucho su viscosidad, dificultando los pasos siguientes de extracción con solvente orgánico. Concentraciones más bajas de TCA generaban un aumento en el volumen utilizado y esto diluye la muestra.
- ✓ El ajuste a pH neutro, no mejoró ni la calidad de los extractos ni la recuperación de la droga o la resolución cromatográfica de los mismos, por dichos motivos, se suprimió este paso de la técnica.
- ✓ El sonicado es un paso muy importante para obtener buenas recuperaciones. Un tiempo mínimo de 5 minutos fue necesario.
- ✓ El centrifugado 10 minutos a 8000g resultó ser la mejor opción entre tiempo y recuperación. También se agregó un paso de 5 minutos de centrifugado de los extractos secos al ser resuspendidos para garantizar extractos más límpidos, al momento de inyectar.
- ✓ Las recuperaciones en la extracción de BZN luego de los pasos de optimización de la técnica rondaron entre un 85 y 90% para una muestra de concentración fija de 5 µg/mL.
- ✓ El factor de concentración (F) para la técnica fue de: $2000/600 = 3,33$.

4.2.1.3. VALIDACIÓN DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BZN DE PLASMA HUMANO

Las curvas de calibración realizadas mediante la técnica seleccionada para la extracción y cuantificación de BZN en plasma liofilizado permitieron obtener parámetros analíticos y estadísticos para la validación del método.

Criterios evaluados para la validación del método:

- ✓ Selectividad: ausencia de interferencia

- ✓ Sensibilidad: Límite de detección y cuantificación < 0.01 mg/mL (en función de datos bibliográficos de valores hallados en pacientes adultos: promedio de concentración para BZN en adultos: entorno la los 0.01 mg/mL).
- ✓ Exactitud: CV < 20% en cada punto del intervalo de trabajo.
- ✓ Precisión y reproducibilidad:

Curvas interdías: CV de la pendiente < 5% para cada recta.

Estabilidad de muestra QC: CV < 5 % luego de los distintos períodos de conservación en frizzer.

En las **Tablas 4.2.1.3.1; 4.2.1.3.2; 4.2.1.3.3; 4.2.1.3.4; 4.2.1.3.5** siguientes, se presentan los datos obtenidos para los conjuntos de muestras utilizados para las 3 curvas de calibración realizadas en días distintos pero manteniendo las condiciones experimentales. Ver condiciones de las curvas en **3.2.1.2. Validación del método**. Los gráficos de las respectivas curvas se presentan en **Gráficos 4.2.1.3.1; 4.2.1.3.2; 4.2.1.3.3**.

Tabla 4.2.1.3.1.

| Día 1 | | Día 2 | | Día 3 | |
|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| x (µg/mL) | Y (área) | X (µg/mL) | Y (área) | X (µg/mL) | Y (área) |
| 0,219 | 1328 | 0,219 | 1610 | 0,219 | 1864 |
| 0,219 | 1612 | 0,219 | 1951 | 0,219 | 1532 |
| 0,219 | 1952 | 0,219 | 1439 | 0,219 | 1670 |
| 0,545 | 3239 | 0,545 | 3055 | 0,545 | 3143 |
| 0,545 | 2950 | 0,545 | 3270 | 0,545 | 2985 |
| 0,545 | 3120 | 0,545 | 2990 | 0,545 | 3060 |
| 1,050 | 5861 | 1,050 | 5819 | 1,050 | 5919 |
| 1,050 | 5999 | 1,050 | 5949 | 1,050 | 6286 |
| 2,090 | 11469 | 2,090 | 11589 | 2,090 | 12570 |
| 2,090 | 12432 | 2,090 | 12432 | 2,090 | 11852 |
| 4,760 | 31777 | 4,760 | 30523 | 4,760 | 32368 |
| 4,760 | 30990 | 4,760 | 32166 | 4,760 | 30671 |
| 10,829 | 70030 | 10,829 | 70880 | 10,829 | 71280 |
| 10,829 | 70880 | 10,829 | 70030 | 10,829 | 70890 |
| 18,098 | 114116 | 18,098 | 114520 | 18,098 | 113116 |
| 18,098 | 115927 | 18,098 | 113927 | 18,098 | 115427 |

Tabla 4.2.1.3.2.

| y = a +bx | a (S _a) | b (S _b) | r ² | CV pend % |
|-------------|---------------------------|--------------------------|----------------|-----------|
| Curva día 1 | -210,18488 (318,99108) | 6413,04293 (41,46544) | 0,99937 | 0,65 |
| Curva día 2 | -129,15898 (342,27929) | 6375,83999 (44,49265) | 0,99927 | 0,70 |
| Curva día 3 | -26,9165 (398,42855) | 6386,95473 (51,79146) | 0,99901 | 0,81 |

Gráfico 4.2.1.3.1.

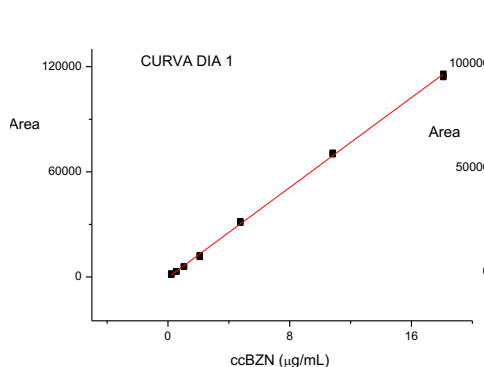


Gráfico 4.2.1.3.2.

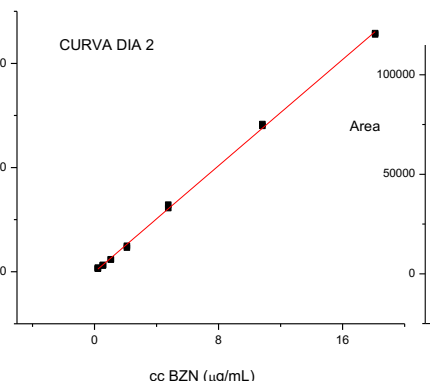


Gráfico 4.2.1.3.3.

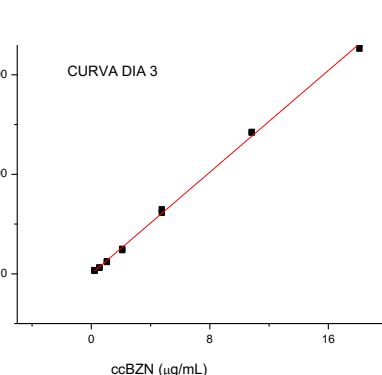


Tabla 4.2.1.3.3. Parámetros estadísticos para las curvas interdía

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | D 1 | D2 | D 3 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-----|----|-----|
| | Ymed | Ymed | Ymed | S | S | S | CV% | CV% | CV% | n | n | n |
| N₁ | 1630,7 | 1666,7 | 1688,7 | 312,42 | 260,66 | 166,78 | 19,16 | 15,64 | 9,88 | 3 | 3 | 3 |
| N₂ | 3103 | 3105 | 3062,7 | 145,25 | 146,54 | 79,03 | 4,68 | 4,72 | 2,58 | 3 | 3 | 3 |
| N₃ | 5930 | 5884 | 6102,5 | 97,58 | 91,92 | 259,51 | 1,64 | 1,56 | 4,25 | 2 | 2 | 2 |
| N₄ | 11951 | 12011 | 12211 | 680,94 | 421,5 | 507,70 | 5,70 | 3,51 | 4,16 | 2 | 2 | 2 |
| N₅ | 31384 | 31345 | 315205 | 556,49 | 1161,8 | 1200 | 1,77 | 3,71 | 3,81 | 2 | 2 | 2 |
| N₆ | 70455 | 70455 | 71085 | 601,04 | 601,04 | 275,77 | 0,85 | 0,85 | 0,39 | 2 | 2 | 2 |
| N₇ | 115022 | 114224 | 114272 | 1280,6 | 419,31 | 1634,1 | 1,11 | 0,38 | 1,43 | 2 | 2 | 2 |

N_i = nivel de concentración; n = número de replicados por nivel

Del análisis de los parámetros obtenidos para las distintas curvas de calibrado interdía, se calcularon las cifras de mérito de las rectas de calibración, **Tabla 4.2.1.3.4.**

Tabla 4.2.1.3.4. Cifras de mérito para las curvas obtenidas

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| LOD µg/mL | 0,16 | 0,18 | 0,20 |
| LOQ µg/mL | 0,45 | 0,48 | 0,56 |
| Exactitud (N₄) | -0,88 | -0,39 | 1,27 |
| Precisión (N₄) | 5,70 | 3,51 | 4,16 |
| Rango lineal µg/mL | (0,45;18,10) | (0,48;18,10) | (0,56;18,10) |
| ANOVA | $F = 23919,70515$ Prob > F = 0 | $F = 20535,16497$ Prob > F = 0 | $F = 15207,97513$ Prob > F = 0 |

Para una muestra control de estabilidad (QC) se evaluaron las recuperaciones halladas luego de distintos tiempos de conservación en freezer a -20°C. **Tabla 4.2.1.3.5.**

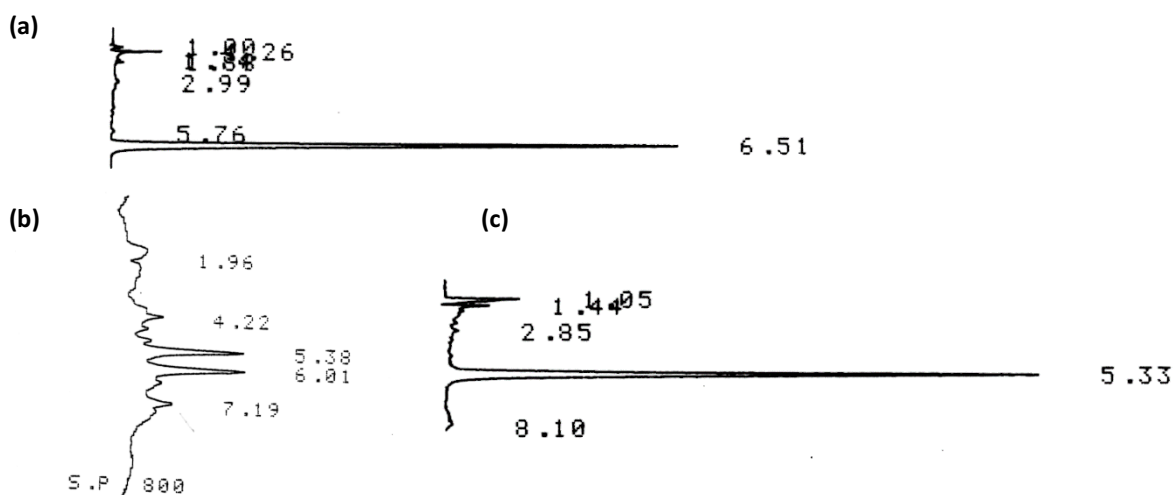
Tabla 4.2.1.3.5. QC de plasma liofilizado adicionado con BZN. Concentración final de 5 µg/mL

| | R% |
|---------|------|
| 15 días | 87,6 |
| 30 días | 88,0 |
| 60 días | 86,5 |
| CV% | 0,89 |

4.2.2. Dosajes de BZN en plasma humano:

Se dosó BZN en plasma pediátrico a 117 muestras pertenecientes a 38 pacientes. Las muestras correspondían a las distintas etapas del tratamiento, como se explicó en el capítulo anterior: **3.1.1.2. Criterios de selección de pacientes y obtención de muestra.**

Figura 4.2.2.1. Cromatograma de referencia de BZN en plasma de pacientes pertenecientes al grupo A **(a)**; cromatograma de referencia de BZN en plasma de pacientes pertenecientes al grupo B **(b)**; cromatograma de referencia de BZN en plasma de pacientes pertenecientes al grupo C **(c)**.



Del estudio participaron 40 niños con Enfermedad de Chagas diagnosticada de los cuales 38 contribuyeron en la recolección de las muestras, siendo 37 (93%) el número final de pacientes que concluyó el estudio de 60 días de tratamiento. Hubieron dos pacientes que comenzaron el estudio pero tuvieron que abandonarlo debido a la aparición de eventos adversos, uno participó en la instancia de toma de muestra y el otro no. Otro paciente abandonó el estudio por razones desconocidas, sin poder hacerle un seguimiento

del tratamiento. Además, se compararon las concentraciones halladas de estos pacientes pediátricos con 14 pacientes adultos presentados en la literatura.^{85,103}

Las concentraciones de BZN hallados en función del tiempo transcurrido luego de la última dosis, se presentan en el **Gráfico 4.2.2.1**. Cromatogramas representativos de los dosajes realizados de los tres grupos de muestras se presentan en la **Figura 4.2.2.1**.

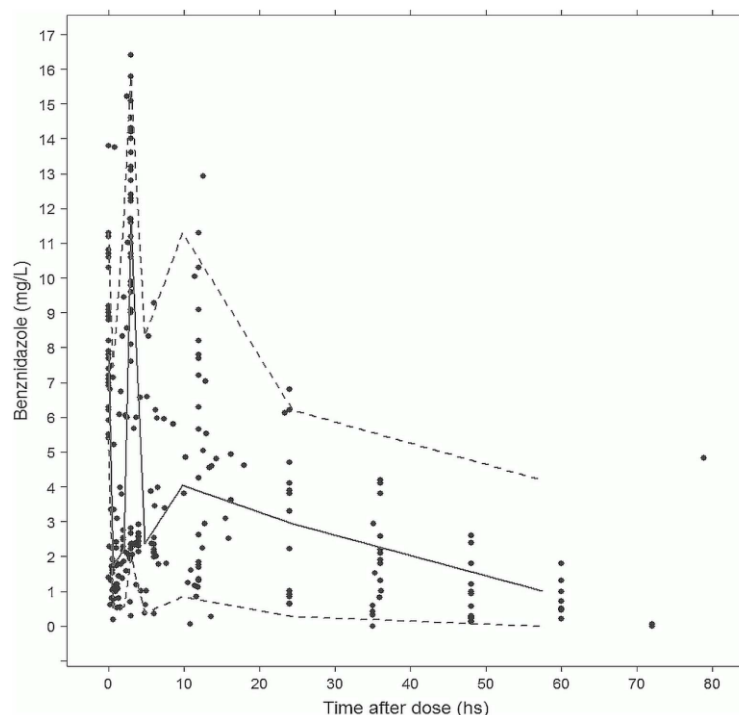


Gráfico 4.2.2.1. Gráfica de VPC para concentraciones plasmáticas de BZN vs tiempo luego de cada toma de dosis. Modelo Final (Covariables: Peso en el Volumen, Peso y Edad en el Clearance). (Línea entera: media, línea punteada: 5 al 95% del intervalo predictivo).

4.2.3. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos para un modelo simple unicompartimental con absorción de primer orden para BZN y sin covariables se presentan en la siguiente **Tabla 4.2.3.1**.

¹⁰³ Raaflaub J. (1980) Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benzimidazole in man. *Arzneimittelforschung*. 30: 2192–2194

Los puntos individuales estimados mediante CL/F fueron significativamente más bajos en los niños de nuestro estudio (hasta 13 años de edad) respecto de los adultos. En este mismo sentido, las estimaciones de puntos individuales para V/F fueron significativamente diferentes entre niños y adultos. Las estimaciones de K_a no presentaron diferencias entre las dos poblaciones. Sin embargo, en los análisis del modelo final (con covariables) estos resultados fueron en sentido opuesto.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el modelo final, unicompartimental con covariables se presentan en la **Tabla 4.2.3.2**. En el análisis de covariables se indentificó que el peso de los pacientes influía significativamente en el parámetro V/F, (ΔOF 216,34; p : 0,001). Otras covariables tales como ser niño o adulto resultaron ser estadísticamente significativos en la influencia de V/F para modelos univariados.

Tabla 4.2.3.1

| Parámetro | Media (95%CI) | Variabilidad Interindividuo (95%CI) |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Modelo Inicial (sin covariables) | | |
| K_a (h^{-1}) | 0,638 [0,34 - 1,52] | 123% [48,9 – 300%] |
| V/F (L) | 23,2 [18,23 - 42,6] | 74,2% [35,2 – 168,2%] |
| CL/F (L/h) | 1,54 [1,29 – 1,91] | 61,6% [33,5 – 90,3%] |
| Error residual (proporcional) | 27% [21 – 22,9 %] | |

El género no mejoró la permormance de los datos testeando los parámetros (V/F, K_a o CL/F) en el modelo final. Así mismo, relaciones no lineares para las covariables (exponenciales, sigmoideas), fueron evaluadas pero no arrojaron mejoras a la performance final del modelo. Los parámetros finales estimados fueron los siguientes:

$$V/F = 25,73 + 0,7076 \text{ Peso (kg)}$$

$$CL/F = 0,418 + 0,00496 \text{ Edad (años)} + (\text{Peso}/70)^{0,0743}$$

Finalmente, las estimaciones individuales corregidas por peso para el CL/F fueron significativamente más altas para los niños respecto de los adultos (el clearance medio fue de 0.0615 L/Kg/h vs. 0.0301 L/Kg/h respectivamente; p , 0.01). Niños menores de 7 años presentaron valores más altos para el CL/F corregido por peso comparado con niños mayores de esa edad y adultos. La concentración plasmática media de BZN hallada para los niños de nuestro estudio fué de 4.53 mg/L (rango: 3.73 – 5.58 mg/L) que comparada con la media hallada en adultos (10.96 mg/L, rango: 7.74 – 15.43 mg/L) es significativamente más baja. Así mismo, dentro de la población pediátrica, se pudo observar que los niños menores de 7 años presentaron concentraciones plasmáticas más

bajas (concentración media de 3.61 mg/L) comparada con niños mayores (concentración media de 6.88 mg/L).

Tabla 4.2.3.2. Modelo uni-compartimental con covariables: peso en el volumen, edad y peso en el clearance

| Parámetro | Media (95%CI) | Variabilidad Interindividuo (95%CI) |
|---|---|-------------------------------------|
| Modelo Final (con covariables) | | |
| Ka (h ⁻¹) | 0,294 [0,17 ; 0,606] | 246% [99 – 258%] |
| V/F (L) b ₀ x b ₁ x Peso | b ₀ = -5,73 [-8,106 ; -2,999] b ₁ = 0,707 [0,632 ; 0,802] | 27,05% [5 – 17%] |
| CL/F (L/h) b ₀ x b ₁ x Edad + (Peso/70) x b ₂ | b ₀ = 0,418 [0 ; 1,654] b ₁ = 0,0049 [0 ; 0,0186] b ₂ = 0,0743 [0 ; 3,497] | 43,35% [34 – 100%] |
| Error residual (proporcional) | 27% [22,8 – 32,3 %] | |

4.2.4. PARÁMETROS CLÍNICOS Y FARMACOLÓGICOS

La edad promedio de los pacientes fue 7,3 años (s: 3,5). El 45% de los pacientes eran niñas (18 pacientes). El peso promedio fue de 27,2 kg (s: 12,8; rango de 11,5 – 64,0 kg). Ninguno de los pacientes recibió medicación crónica concomitante. Todos los pacientes fueron asintomáticos sin patologías chagásicas asociadas, comorbilidad o laboratorio clínico anormal al momento del reclutamiento.

Al momento del diagnóstico, qPCR fue positiva en 31/37 (84%) de los pacientes con muestras disponibles. No se pudo obtener muestras iniciales disponibles para qPCR en los tres restantes pacientes enrolados debido a dificultades en la extracción de sangre. La dosis media de BZN fue de 6,4 mg/kg/día (s: 1; rango 5,0 – 8,7) en dos tomas por día.

La respuesta al tratamiento fue buena, para todos los 37 pacientes que completaron los 60 días de tratamiento obtuvieron la negativización de qPCR al final del mismo (día 60). Todos los pacientes fueron seguidos clínicamente por al menos 1,5 años después de haber completado el tratamiento, encontrando una constante disminución de los anticuerpos específicos para *T. cruzi* y una qPCR negativa persistente. No hubo

compromiso cardíaco ni eventos adversos a largo plazo como consecuencia del tratamiento luego de dos años de seguimiento.

En 4 pacientes (10%) se observó la aparición de eventos adversos (ADRs) relacionados con la terapéutica del BZN, todos moderados (1 rash leve, 1 prurigo moderado, 1 rash generalizado pero sin compromiso sistémico, 1 eosinofilia moderado)

La edad media de los niños con ADRs fue de 8,6 años y 3 de los 4 niños con ADRs tenían más de 7 años. Todos los ADRs disminuyeron mediante tratamiento sintomático con antihistamínicos y la discontinuación temporaria de la droga, finalmente todos los pacientes se recuperaron sin inconvenientes. En dos casos el rash cutáneo reapareció con la readministración de la droga, lo que planteó la retirada de estos dos pacientes del estudio. Sin embargo, estos dos pacientes fueron luego exitosamente tratados con NFX con buena respuesta. Otro de estos pacientes se retiró del estudio por decisión de la madre.

4.2.5. IDENTIFICACIÓN DE LA NBAA COMO METABOLITO PLASMÁTICO DEL BZN

Se presenta un cromatograma HPLC-UV de referencia de las muestras que se llevaron a analizar mediante HPLC con detección de MS/MS (**Figura 4.2.5.1.**). Se planteó el análisis de los tres picos identificados en el cromatograma. El pico que presenta tiempo de retención a los 16.9 minutos sería el correspondiente al BZN droga madre, los picos acompañantes antes y después del mismo, serían metabolitos a identificar.

En la **Figura 4.2.5.2** se presentan cromatogramas de referencia comparativos de pacientes al comienzo del tratamiento **(a)** y **(b)** en estado estacionario del tratamiento. Se puede observar que en el cromatograma **(b)** existe más de un compuesto mayoritario en circulación, este tipo de cromatogramas fueron la evidencia de la existencia de metabolitos circulantes.

Figura 4.2.5.1. Cromatograma de referencia

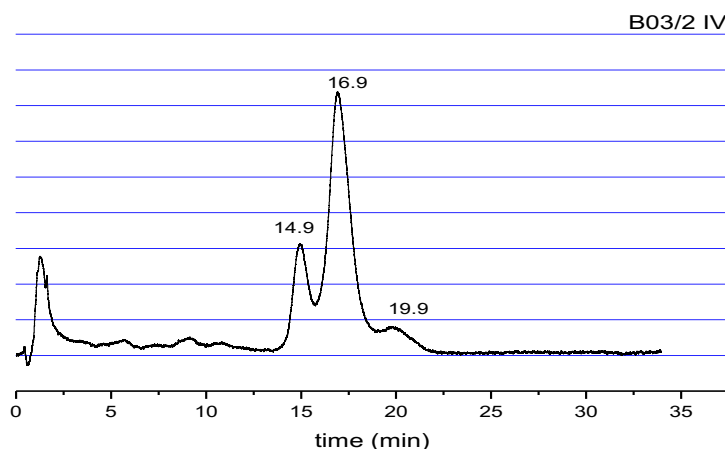
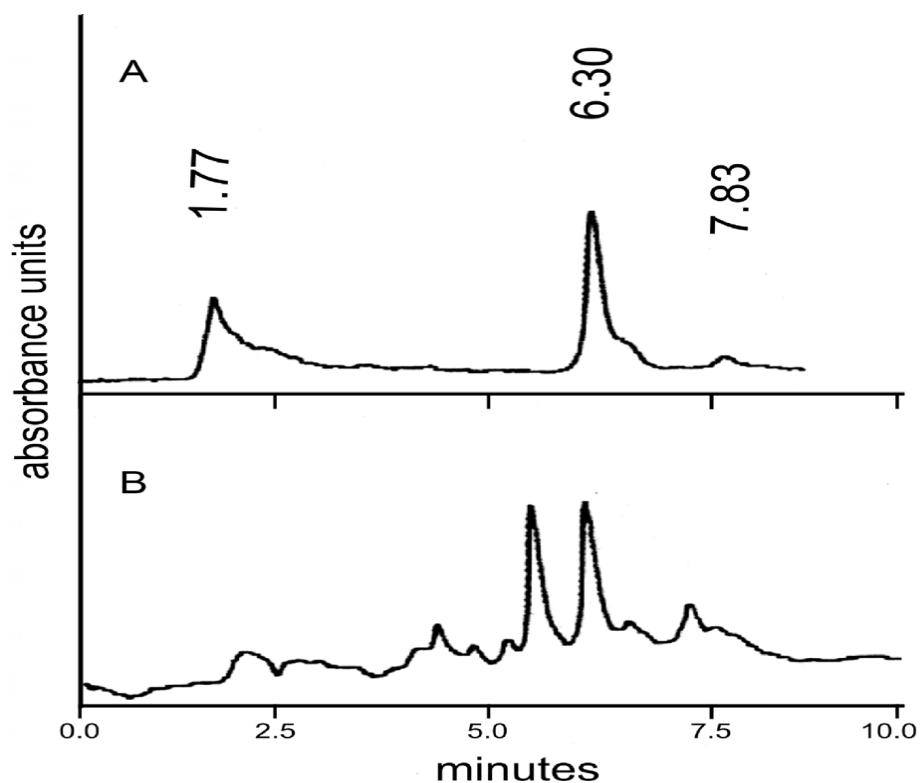


Figura 4.2.5.2 Cromatogramas de referencia comparativos: **(A)** Muestras de plasma de pacientes al inicio del tratamiento. **(B)** Muestras de plasma de pacientes en estado estacionario del tratamiento.

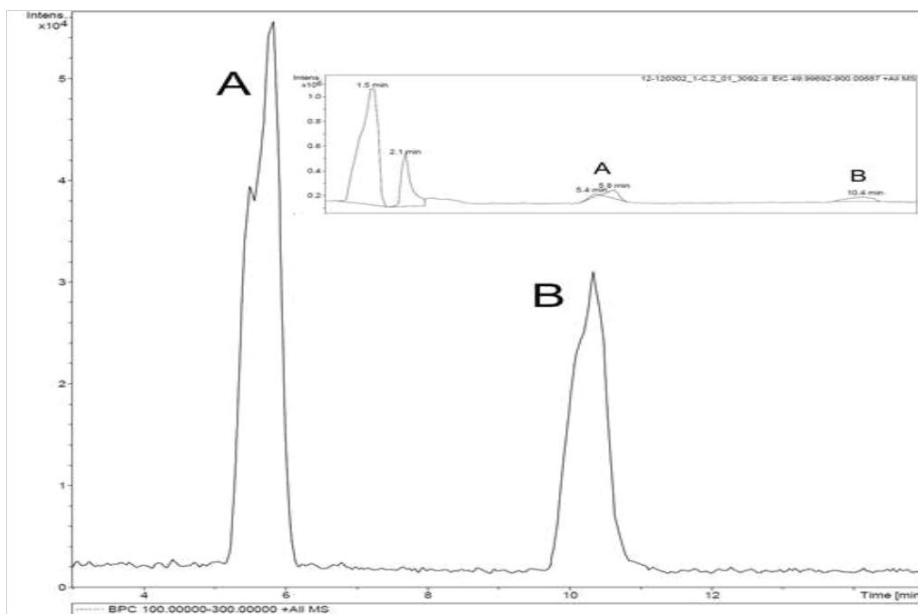


Observaciones mediante espectrometría de masas:

Todas las muestras analizadas mediante HPLC/MS/MS presentaron perfiles cromatográficos similares, con la presencia de dos picos, apareciendo el primer pico (pico A) a un tiempo de retención de 5,8 minutos y un pico de tardío (pico B) (**Figura 4.2.5.3**) con un tiempo de retención en 10,4 minutos.

Ambos picos no fueron simétricos y presentaban un pre-hombro. En el recuadro superior de la **Figura 4.2.5.3** se muestra el cromatograma del espectro de masa en el rango de 50 a 900 m/z para el tiempo total de elución. Los picos no resueltos que eluyen entre el minuto 1 y 3 es material no retenido cromatográficamente, predominantemente sales y acetonitrilo. Los picos asociados con el BZN son los marcados como picos A y B.

Figura 4.2.5.3. Cromatograma representativo de espectro de masas de extractos en acetonitrilo de muestras de plasma en un rango de 100 a 300 m/z eluidos en tiempos entre 3 y 15 minutos.



El espectro de MS del pico **A** (Figura 4.2.5.4), está compuesto de un ion molecular principal $[M + H]^+$ que aparece en un m/z de 261 y una menor señal de un ion molecular $[M + Na]^+$ que aparece en m/z de 283. El espectro de masa en tándem del ion molecular principal $[M + H]^+$ (261 m/z), también mostrado en la Figura 4.2.5.4, consistió en cuatro fragmentos principales de m/z de 214, 148, 107 y 91 para todas las muestras analizadas.

El análisis de masas exactas del ion principal es compatible con la formula molecular $C_{13}H_{13}N_4O_3$, que corresponde al ion $[BNZ + H]^+$, y el segundo ion es compatible con la formula molecular $C_{12}H_{12}N_4O_3Na$, que corresponde al ion $[BNZ + Na]^+$.

El espectro de MS del pico cromatográfico que presenta un tiempo de retención de 10,3 minutos se muestra en la Figura 4.2.5.5 (a). El espectro de masa en tándem del ion molecular principal $[M + H]^+$ con m/z de 150 también se presenta en la Figura 4.2.5.5 (c), y es compatible con el análisis de masas exactas para la formula molecular de $C_9H_{12}NO$ que puede ser asignado al compuesto N-bencilacetamida (NBAA). En el espectro en tándem de fragmentación de este ion principal se hallaron tres productos principales con m/z de 135, 120 y 107 para todas las muestras analizadas.

Figura 4.2.5.4. **(a)** ESI-MS positivo para el pico A (BNZ) de extracto de plasma. **(b)** Detalle del espectro de masas del ión molecular principal $[M + H]^+$ en un m/z de 261. **(c)** Patrón de fragmentación MS en tándem del ion molecular principal para el pico A (BZN).

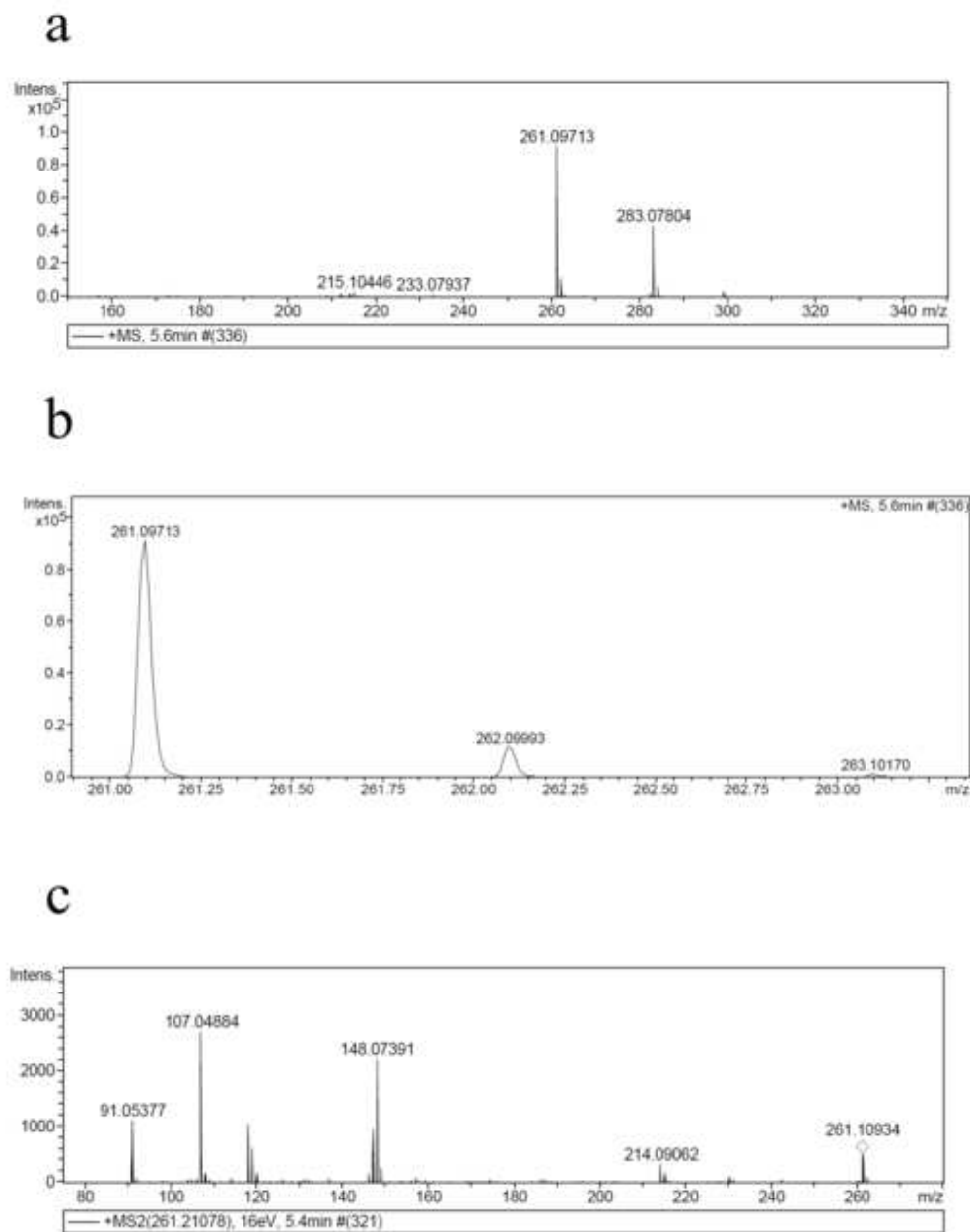
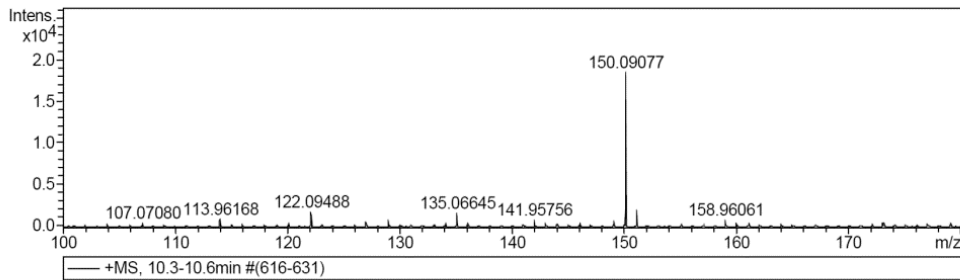
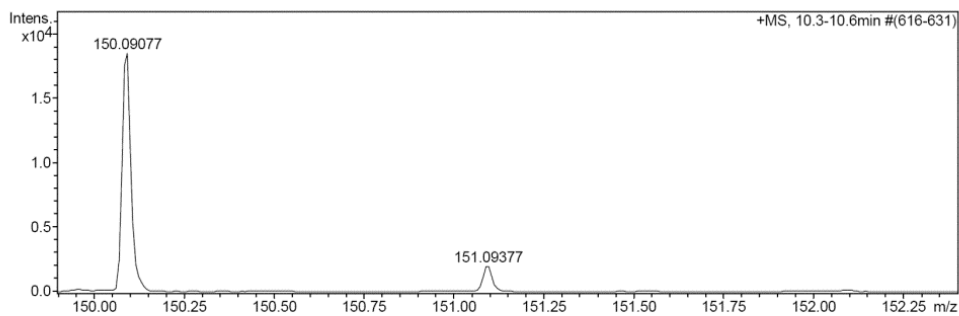


Figura 4.2.5.5. Perfil de fragmentación de N-BAA: **(a)** ESI-MS en modo positivo para el pico NBAA de extractos plasmáticos; **(b)** Detalle del espectro de masas del ion molecular principal $[M+H]^+$ para m/z de 150; **(c)** Análisis del perfil MS en tándem para el ion molecular principal NBAA de extractos plasmáticos.

a



b



c

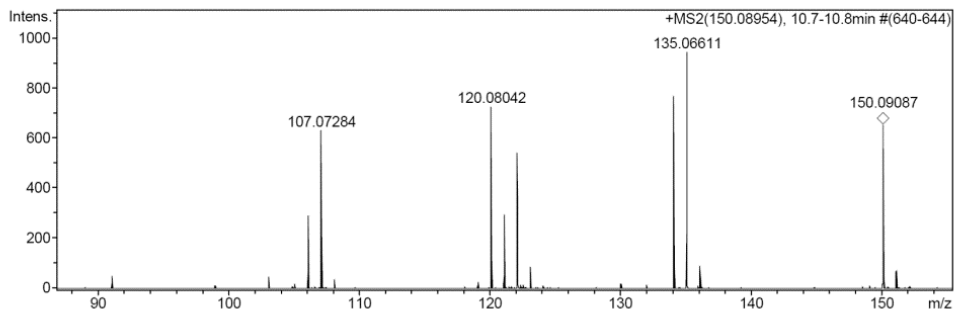
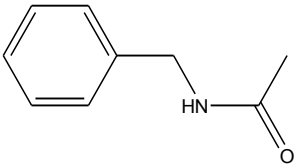
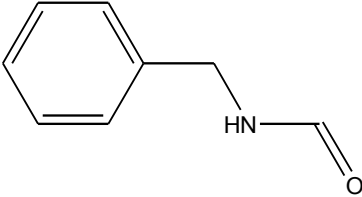
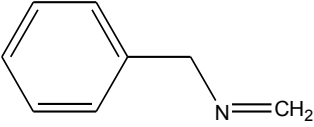
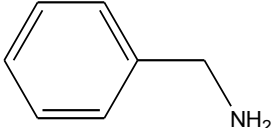


Tabla 4.2.5.1. Estructuras propuestas para los m/z hallados del patrón de fragmentación del ión principal m/z 150 de la NBAA.

| | |
|---|---|
| <p>$[C_9H_{11}NO + H]^+$ Exact Mass: 150.09134 Mol. Wt.: 150.19713 m/e: 150.09189 (100.0%), 151.09524 (10.0%) C, 71.97; H, 8.05; N, 9.33; O, 10.65</p> |  |
| <p>$[C_8H_8NO + H]^+$ Exact Mass: 135.06787 Mol. Wt.: 135.16261 m/e: 135.06841 (100.0%), 136.07177 (8.9%) C, 71.09; H, 6.71; N, 10.36; O, 11.84</p> | <p style="text-align: center;"><i>N</i>-Benzyl-acetamide</p>  |
| <p>$[C_8H_9N + H]^+$ Exact Mass: 120.08078 Mol. Wt.: 120.17115 m/e: 120.08132 (100.0%), 121.08468 (8.9%) C, 79.96; H, 8.39; N, 11.66</p> | <p style="text-align: center;"><i>N</i>-Benzyl-formamide</p>  |
| <p>$[C_7H_8N + H]^+$ Exact Mass: 107.07295 Mol. Wt.: 107.15251 m/e: 107.07350 (100.0%), 108.07685 (7.8%) C, 78.46; H, 8.47; N, 13.07</p> | <p style="text-align: center;"><i>N</i>-methylidene(phenyl)methanaminium</p>  <p style="text-align: center;">Benzyl-ammonium</p> |

Esta serie de iones y sus m/z son compatibles con el análisis de masas exactas de fórmula molecular C_8H_9NO , $C_8H_{10}N$ y C_7H_9N respectivamente. Estas estructuras corresponden a la *N*-bencil formamida, *N*-metilideno (fenil) metanamino y bencil amonio, todos estructuralmente relacionados con la NBAA. La asignación de estos fragmentos moleculares para el pico con m/z 150 se muestra en la **Tabla 4.2.5.1**.

4.2.5.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA NBAA:

Se obtuvieron 200 mg de N-BAA impura y luego del proceso de recristalización se obtuvieron 165 mg de N-BAA pura. La pureza del producto de síntesis fue del 82,5 %, sin embargo el rendimiento de la reacción fue cercano al 30%.

Se halló el rango del punto de fusión de una muestra sintetizada y recristalizada, siendo este de 58-60°C. Según datos bibliográficos, la NBAA tiene un punto de fusión entorno a los 60- 61°C. Este sólido sintetizado se reservó como droga patrón para futuras búsquedas en nuevas muestras. La **Figura 4.2.5.1.1** representa la reacción de síntesis.

Por otro lado, cromatográficamente se puede caracterizar a la NBAA como un compuesto que eluye después que su droga madre BZN, lo que según el método en fase reversa utilizado, respondería a un compuesto de características menos polares que las encontradas para BZN.

Figura 4.2.5.1.1.

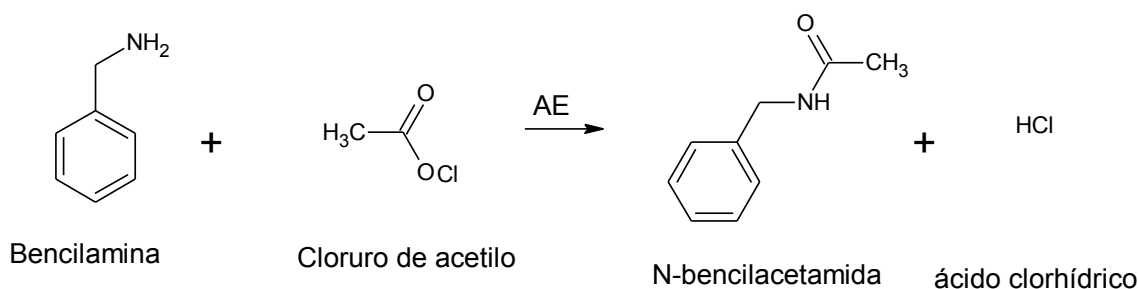


Tabla 4.2.5.1.1. Cuadro comparativo de características cromatográficas y espectrométricas entre BZN y NBAA

| | BZN | N-BAA |
|--|--|--|
| Tiempo retención HPLC-UV sistema seleccionado* | 5,8 minutos | 10,4 minutos |
| m/z por HPLC-MS | BZN(H) ⁺ 261,09739 | NBAA(H) ⁺ 150,09224 |
| +MS2 (m/z) | 214,09062 148,07561 118,06260 107,04884 91,05377 | 135,07008 122,09596 120,08125 107,07365 |

*Sistema HPLC/UV: Columna Lichrocart 125-4, Lichrospher 100 mm RP-8 (5 μm, partícula) Merck. FM: 75:25 (H₂O: AcN) Flujo: 0,4 mL/min. Longitud de onda (λ) 220 nm.

Sistema HPLC MS/MS: Columna Phenomenex Luna C18 (3μm partícula) (100 x 2 mm), FM: 70%H₂O (0,1 % ácido formico):30%AcN, Flujo 0,2 mL/min. Detector de arreglo de diodos. Ionización ESI en modo positivo.

Así mismo, se compararon los patrones de fragmentación halladas en nuestro estudio de MS/MS para la NBAA y BZN, con los encontrados mediante búsqueda

bibliográfica para la NBAA. Validando la identidad del compuesto estudiado ya que los patrones de fragmentación fueron similares. Se presenta un resumen de las características cromatográficas más relevantes halladas para la N-BAA y el BZN, **Tabla 4.2.5.1.1.**

4.3. DE LOS DOSAJES DE BZN Y DERIVADOS EN ORINA HUMANA

4.3.1. SOBRE EL DESARROLLO DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BZN EN ORINA HUMANA POR HPLC

De las técnicas evaluadas y los resultados obtenidos se resumen las mejores condiciones seleccionadas en la siguiente **Tabla 4.3.1.1.** El método seleccionado presentó una recuperación en promedio del 75%.

Tabla 4.3.1.1.

| | Condición seleccionada | Observaciones |
|----------------------------------|--|--|
| Solvente de extracción utilizado | DCM | Resultó ser el solvente más adecuado para la extracción de BZN en términos de recuperación y manejo analítico a pesar de ser más denso que el agua y por lo tanto se extrae de la fase inferior de la muestra. |
| Vol/ extracción (µL) | ½ del Volumen de muestra, para una muestra de 2500, 1250. | Volúmenes más chicos resultaban difíciles de extraer cuantitativamente mediante pipeta |
| Ciclos de extracción | 2 | Más ciclos de extracción no mejoraban significativamente el rendimiento y se generan mayor cantidad de residuos. |
| V total utilizado (µL) | 2500 | - |
| pH de la extracción | Cercano a la neutralidad 6,5-7,5 | Los extractos realizados en condiciones cercanas a la neutralidad fueron los que presentaron mayor recuperación. |
| Solvente de resuspensión | 1500 µL de FM: Agua: AcN (80:20) | Los extractos resuspendidos en la misma composición que la FM fueron los que presentaron la mejor resolución cromatográfica. |
| Factor de concentración | $F = 2500/1500 = 1,67$ veces más concentrado que en la muestra original. | |

4.3.2. VALIDACIÓN DE MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BZN EN ORINA HUMANA DE 24HS

Las curvas de calibración realizadas mediante la técnica seleccionada para la extracción y cuantificación de BZN en orina de 24 hs nos permitió obtener parámetros analíticos y estadísticos para la validación del método.

Criterios evaluados para la validación del método:

- ✓ Selectividad: ausencia de interferencia
- ✓ Sensibilidad: Límite de detección y cuantificación < 0.01 mg/mL (en función de datos bibliográficos de valores hallados en pacientes adultos: promedio de concentración para BZN en adultos: entorno la los 0.01 mg/mL).
- ✓ Exactitud: CV < 20% en cada punto del intervalo de trabajo.
- ✓ Precisión y reproducibilidad:

Curvas interdías: CV de la pendiente < 5% para cada recta.

Estabilidad de muestra QC: CV < 5 % luego de los distintos períodos de conservación en frizzer.

En las **Tabla 4.3.2.1; 4.3.2.2; 4.3.2.3; 4.3.2.4; 4.3.2.5** siguientes, se presentan los resultados obtenidos para los conjuntos de muestras utilizados para las 3 curvas de calibración realizadas en días distintos pero manteniendo sin cambios las condiciones experimentales. Ver condiciones de las curvas en **3.2.1.5. Validación del método** del capítulo anterior. Los gráficos de las respectivas curvas se presentan en **Gráficos 4.3.2.1; 4.3.2.2; 4.3.2.3.**

Tabla 4.3.2.1. Orina humana de 24hs adicionada con BNZ

| Día 1 | | Día 2 | | Día 3 | |
|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| x (µg/mL) | Y (área) | X (µg/mL) | Y (área) | X (µg/mL) | Y (área) |
| 5 | 7980 | 5 | 9661 | 5 | 12540 |
| 5 | 9328 | 5 | 10263 | 5 | 10770 |
| 5 | 8253 | 5 | 10446 | 5 | 10127 |
| 15 | 36426 | 15 | 38230 | 5 | 10126 |
| 15 | 35837 | 15 | 38698 | 15 | 38440 |
| 15 | 36334 | 15 | 38102 | 15 | 38917 |
| 30 | 64059 | 30 | 68259 | 30 | 68480 |
| 30 | 65342 | 30 | 67214 | 30 | 67549 |
| 30 | 63769 | 45 | 95259 | 45 | 96780 |
| 45 | 93193 | 45 | 93642 | 45 | 99723 |
| 45 | 89128 | - | - | - | - |

Tabla 4.3.2.2. Parámetros evaluados de curvas de calibración interdías

| $y = a + bx$ | a (S _a) | b (S _b) | r ² | CV pend % |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|----------------|-----------|
| Curva día 1 | 1640,73494 (1901,50064) | 2048,33715 (72,82193) | 0,9875 | 3,55 |
| Curva día 2 | 3090,4589 (1990,36198) | 2089,85434 (77,47474) | 0,98777 | 3,70 |
| Curva día 3 | 1739,90833 (1455,16924) | 2180,26458 (57,52061) | 0,99377 | 2,63 |

Gráfico 4.3.2.1. Curva Día 1

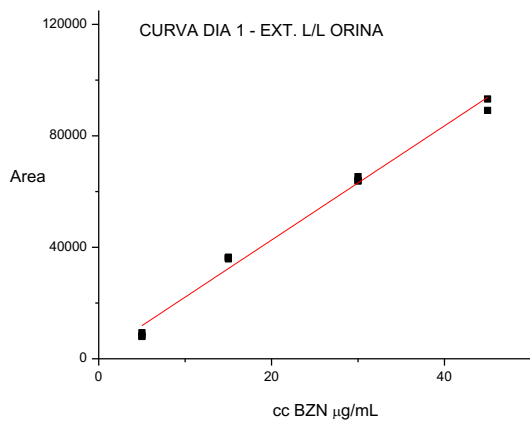


Gráfico 4.3.2.2. Curva Día 2

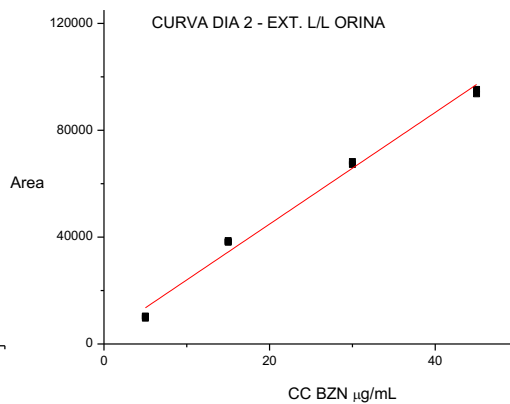


Gráfico 4.3.2.3. Curva Día 3

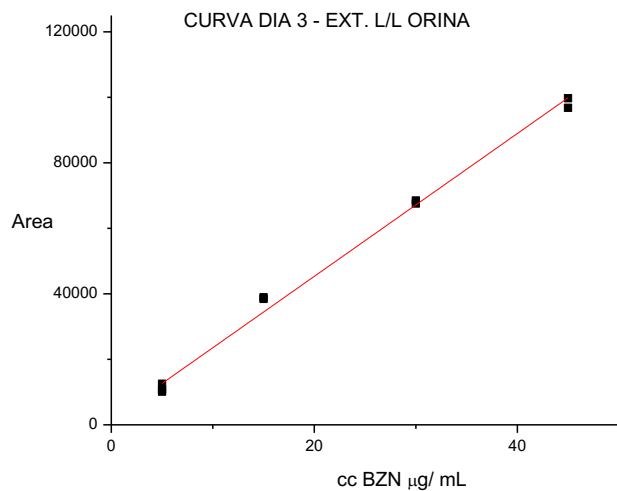


Tabla 4.3.2.3. Parámetros estadísticos para las curvas interdías

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Ymed | Ymed | Ymed | S | S | S | CV% | CV% | CV% | n | n | N |
| N₁ | 8520 | 10123 | 10891 | 713 | 411 | 1141 | 8,36 | 4,06 | 10,47 | 3 | 3 | 4 |
| N₂ | 36199 | 38343 | 38679 | 317 | 314 | 337 | 0,87 | 0,82 | 0,87 | 3 | 3 | 2 |
| N₃ | 64701 | 67737 | 68015 | 907 | 739 | 658 | 1,40 | 1,09 | 0,96 | 2 | 2 | 2 |
| N₄ | 91161 | 94451 | 98252 | 2874 | 809 | 2081 | 3,15 | 0,86 | 2,12 | 2 | 2 | 2 |

N_i = nivel de concentración; n = número de replicados por nivel

Tabla 4.3.2.4. Cifras de mérito para las curvas obtenidas

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|-----------------------------|---|--|--|
| LOD µg/mL | 3,06 | 3,14 | 2,20 |
| LOQ µg/mL | 8,35 | 8,57 | 6,01 |
| Exactitud (N ₃) | -3,17 | 1,37 | 1,79 |
| Precisión (N ₃) | 1,40 | 1,09 | 0,96 |
| Rango lineal µg/mL | (8,35;45,00) | (8,57;45,00) | (6,01;45,00) |
| ANOVA | $F = 791.18585$ $\text{Prob} > F = 4.41083E^{-10}$ | $F = 727.63207$ $\text{Prob} > F = 3.84126E^{-9}$ | $F = 1436.71743$ $\text{Prob} > F = 2.57662E^{-10}$ |

Para una muestra control de estabilidad (QC) se evaluaron las recuperaciones halladas luego de distintos tiempos de conservación en freezer a -20°C. **Tabla 4.3.2.5.**

Tabla 4.3.2.5. QC de BZN adicionado. Concentración final de 15 µg/mL

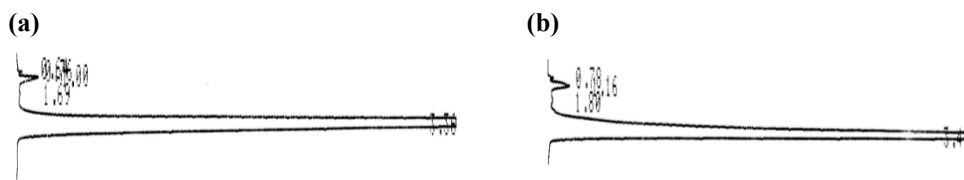
| R (%) |
|-------|
|-------|

| | |
|----------------|------|
| 15 días | 72,5 |
| 30 días | 69,5 |
| 60 días | 70,0 |
| CV% | 2,27 |

4.3.3. DOSAJES DE BZN EN ORINA DE 24HS DE MUESTRAS REALES

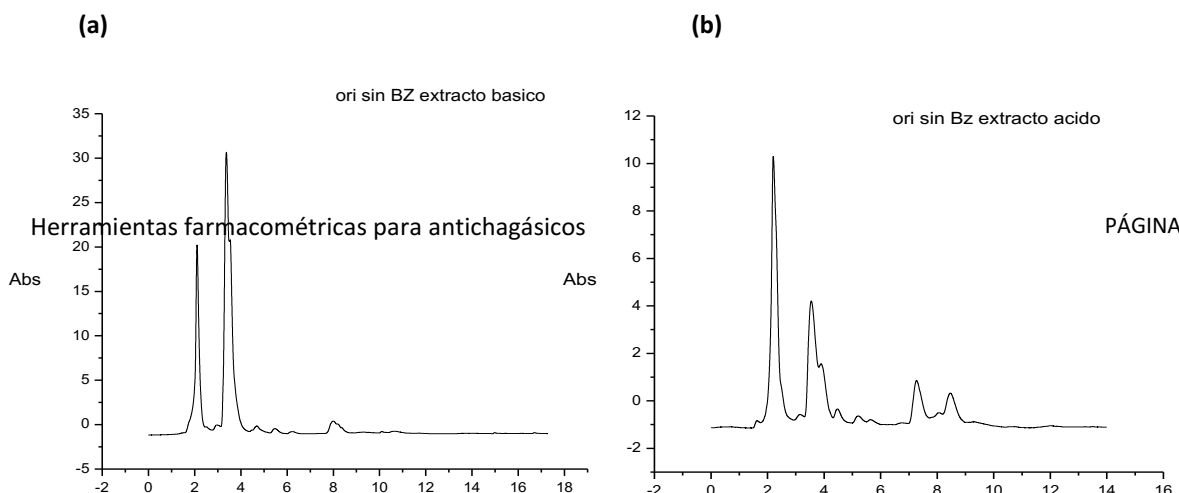
Las muestras de orina de 24hs analizadas mediante el método desarrollado presentado en esta tesis, mostraron una concentración de droga madre BZN de $9.7 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ y $25.2 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, paciente adulto y pediátrico respectivamente. Estos valores reflejan una excreción del orden del 3% y 7 % respectivamente de la dosis oral. Los cromatogramas de estas muestras se presentan en la **Figura 4.3.3.1**.

Figura 4.3.3.1. (a) Cromatograma UV del pico de BZN de extractos de orina humana de paciente pediátrico. **(b)** Cromatograma UV del pico de BZN de extractos de orina humana de voluntario adulto sano.

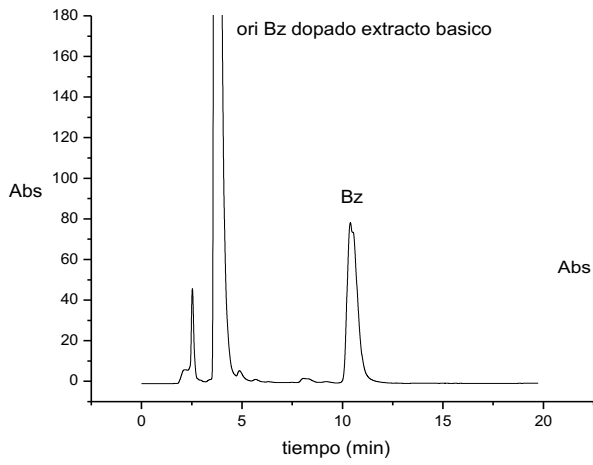


4.3.4. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS URINARIOS DEL BZN:

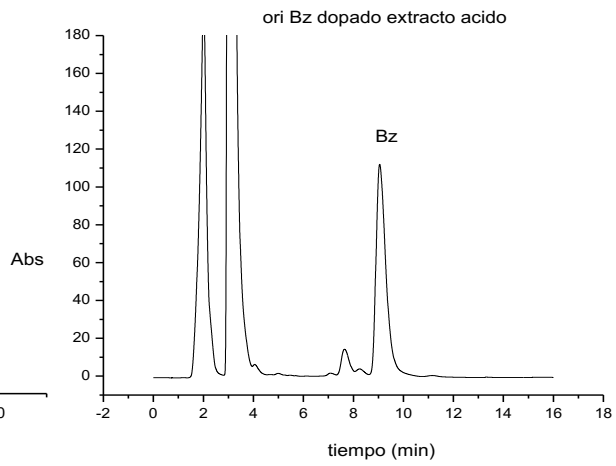
Los extractos de orina humana (pediátrica y de voluntario adulto) sometidos a tratamiento enzimático descritos en el Capítulo 3 (**3.2.2.3. Identificación de compuestos derivados del BZN en orina humana mediante reacción enzimática y espectrometría de masas**) fueron analizados mediante HPLC-UV y de los cromatogramas hallados se seleccionaron los picos a analizar mediante espectrometría de masas. Las **Figuras 4.3.4.1 (a) a (o)** muestran los cromatogramas de referencia hallados y los picos que se buscó identificar en las muestras analizadas.



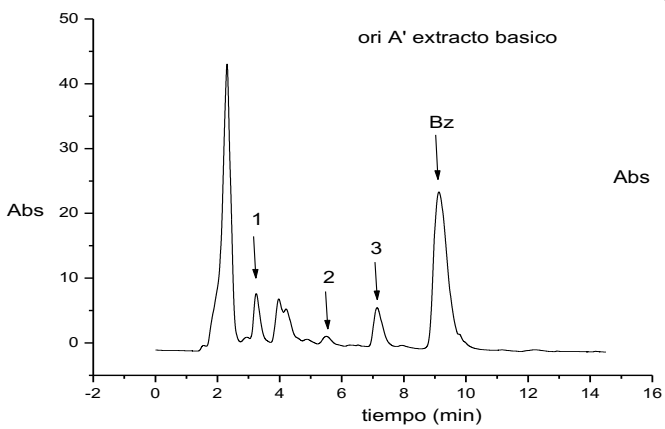
(c)



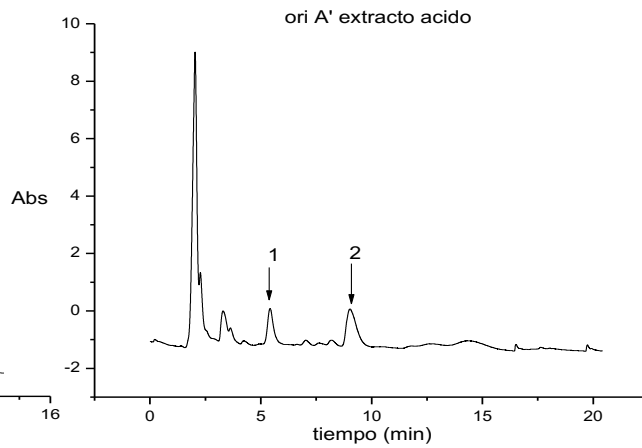
(d)



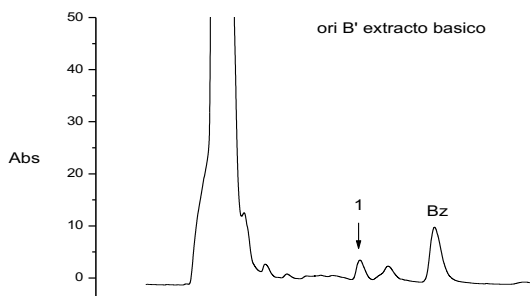
(e)



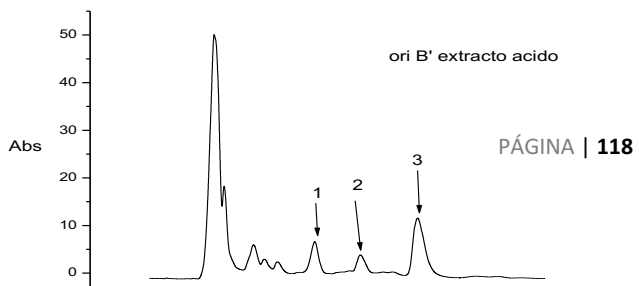
(f)

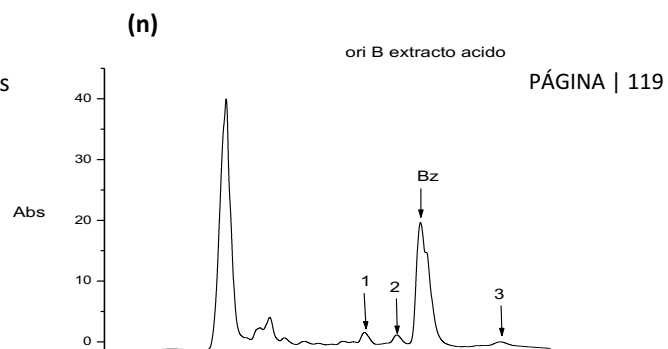
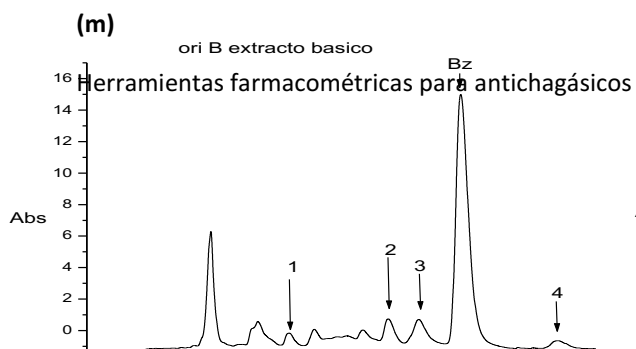
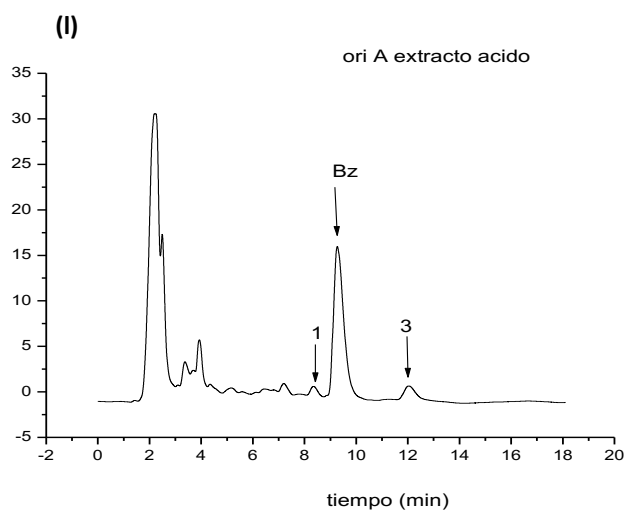
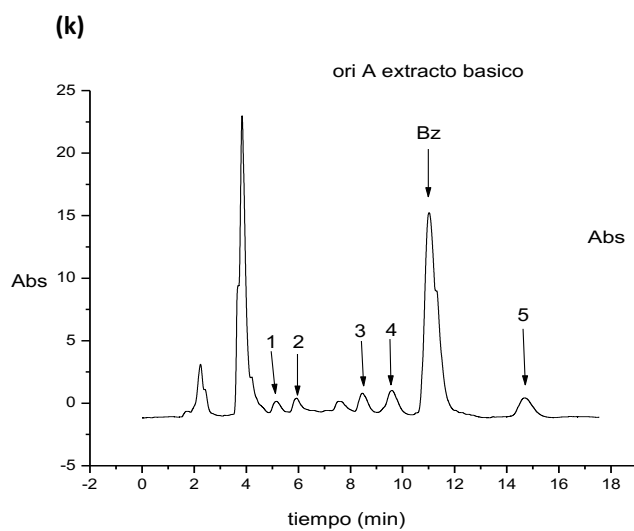
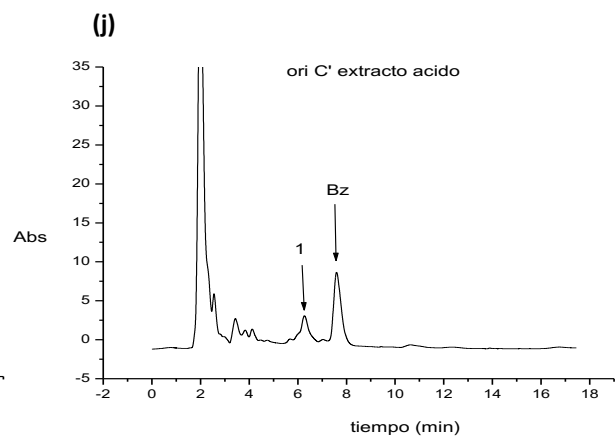
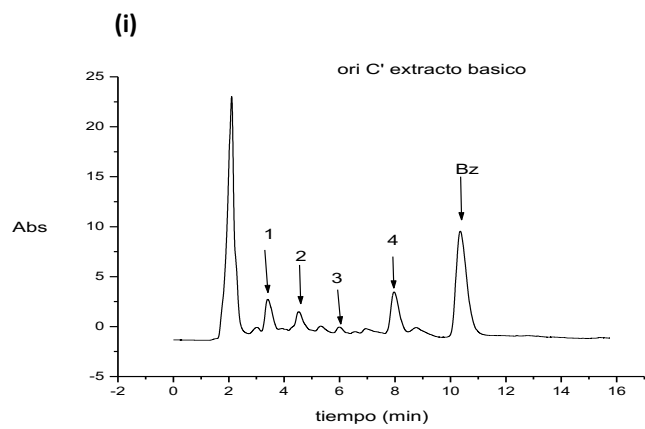


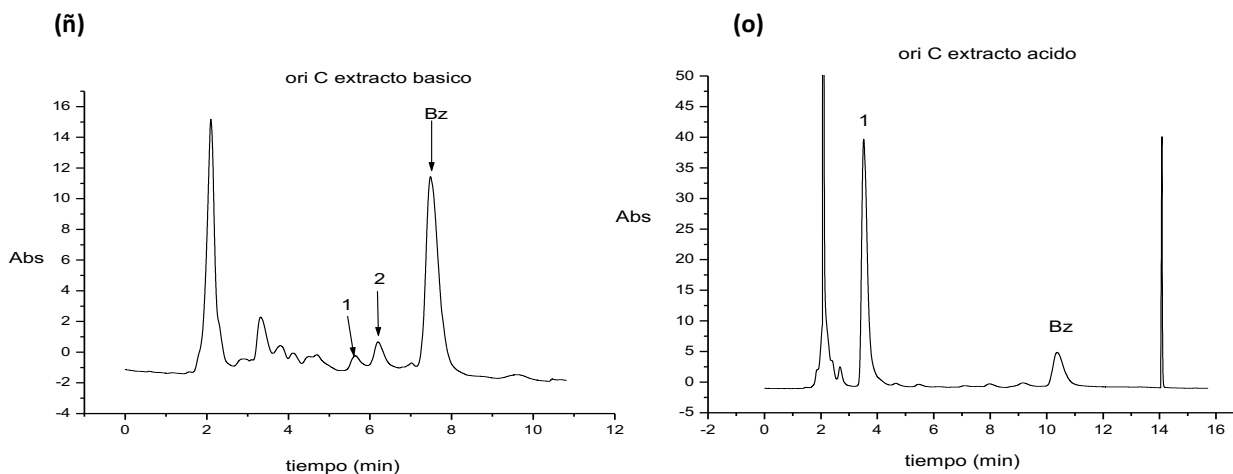
(g)



(h)







De los resultados de los estudios de MS/MS para estas muestras analizadas, se realizó una selección de compuestos para evaluar su identidad y posible procedencia respecto del BZN. Se presentan en las siguientes **Tablas 4.3.4.1; 4.3.4.2; 4.3.4.3; 4.3.4.4; 4.3.4.5; 4.3.4.6.**

Tabla 4.3.4.1. Ori A extracto ácido

| Tiempo pico | m/z | Posible FM | Nº de insaturación | +MS2 realizado | Observación |
|-------------|-----------|--|--------------------|----------------|---------------------|
| 10,7 | 230,12186 | C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O | 8 | si | Amino-BZN |
| 17,3 | 260,09714 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 9 | si | BNZ |
| | 283,08016 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ Na | 9 | no | BNZ Na ⁺ |

Tabla 4.3.4.2. Ori A extracto básico

| Tiempo pico | m/z | Posible FM | Nº de insaturación | +MS2 realizado | Observación |
|-------------|---------------|---|--------------------|----------------|-------------------|
| 7,8 | 200,10817 | C ₆ H ₁₂ N ₆ O ₂ | 4 | no | No deriva de BNZ |
| | | C ₂ H ₈ N ₁₂ | 5 | no | No deriva del BNZ |
| 8,6 | 191,07659 | C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ | 7 | si | No deriva del BNZ |
| 10,4 | 226,08739 | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₇ | 1 | no | No deriva del BNZ |
| 11,3 | 230,12186 | C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O | 8 | si | Amino-BZN |
| 11,9 | múltiples m/z | - | - | no | Pico impuro |
| 17,5 | 260,09714 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 9 | Si | BNZ |

| | | | | | |
|--|-----------|--|---|----|---------------------|
| | 283,08016 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ Na | 9 | no | BNZ Na ⁺ |
|--|-----------|--|---|----|---------------------|

Tabla 4.3.4.3. Ori B extracto ácido:

| Tiempo pico | m/z | Posible FM | N° de insaturación | +MS2 realizado | Observación |
|-------------|---------------|--|--------------------|----------------|---------------------|
| 10,3 | 230,12272 | C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O | 8 | no | Amino-BNZ |
| 11,1 | 246,11702 | C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ | 8 | si | N-hidroxi-amino-BNZ |
| 11,9 | múltiples m/z | - | - | no | Pico impuro |
| 17,5 | 283,08016 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ Na | 9 | no | BNZ Na ⁺ |
| | 260,09714 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 9 | si | BNZ |

Tabla 4.3.4.4. Ori B extracto básico:

| Tiempo pico | m/z | Posible FM | N° de insaturación | +MS2 realizado | Observación |
|-------------|---------------|--|--------------------|----------------|---------------------|
| 7,5 | 200,10796 | C ₆ H ₁₂ N ₆ O ₂ | 4 | no | No deriva de BNZ |
| 11,1 | 230,12245 | C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O | 8 | no | Amino-BNZ |
| 11,7 | múltiples m/z | - | - | no | Pico impuro |
| 17,5 | 283,08009 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ Na | 9 | no | BNZ Na ⁺ |
| | 260,09793 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 9 | si | BNZ |

Tabla 4.3.4.5. Ori C extracto ácido:

| Tiempo pico | m/z | Posible FM | N° de insat, | +MS2 realizado | Observación |
|-------------|---------------|--|--------------|----------------|---------------------|
| 7,3 | Múltiples m/z | - | - | no | Pico impuro |
| 17,3 | 283,07932 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ Na | 9 | no | BNZ Na ⁺ |
| | 260,09757 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 9 | si | BNZ |

Tabla 4.3.4.6. Ori C extracto básico:

| Tiempo pico | m/z | Posible FM | N° de insat, | +MS2 realizado | Observación |
|-------------|---------------|--|--------------|----------------|---------------------|
| 11,7 | múltiples m/z | - | - | no | Pico impuro |
| 17,3 | 283,07971 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ Na | 9 | no | BNZ Na ⁺ |
| | 260,09782 | C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃ | 9 | si | BNZ |

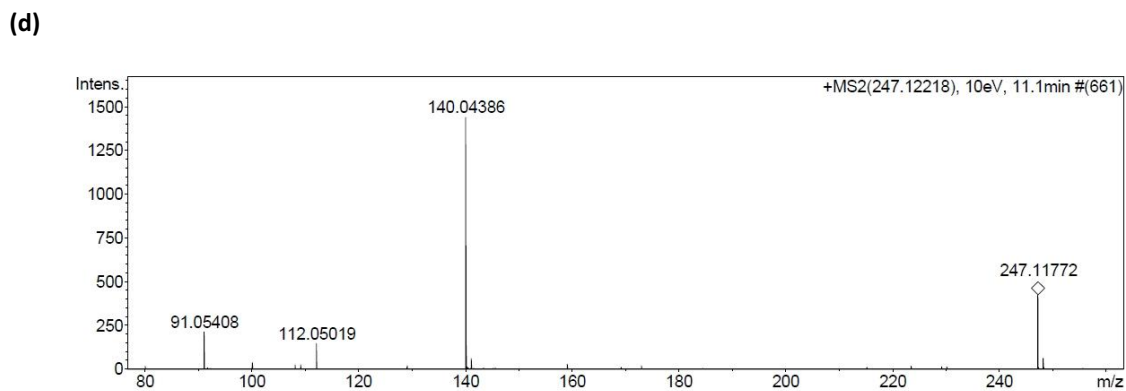
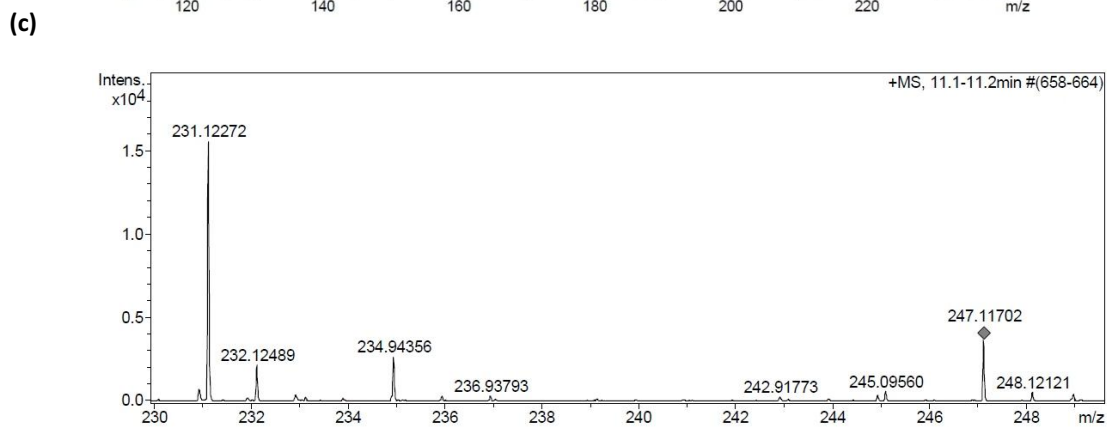
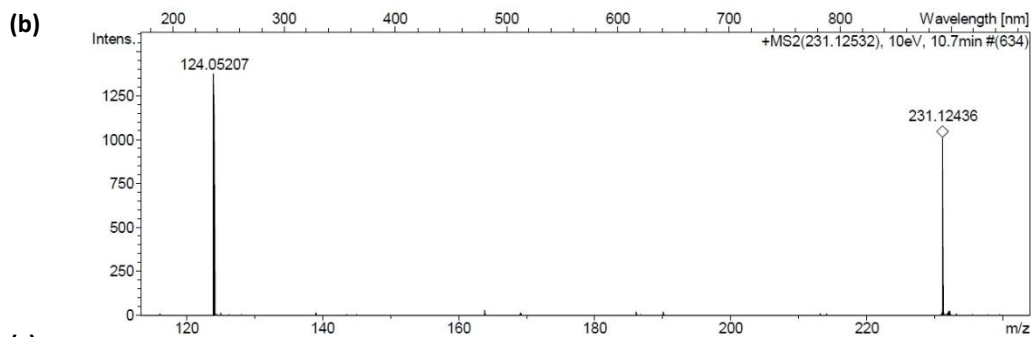
Se identificaron y hallaron las estructuras del amino-BZN el cual está planteado en la literatura existente como un posible metabolito. Este compuesto solo fue hallado en las orinas tratadas enzimáticamente (Ori A y B), estando ausente en el extracto sin tratar (Ori C). En el caso de las orinas de voluntario adulto, este compuesto no fue hallado en todos los extractos.

En todas las muestras analizadas se encontró el BZN, cuya relación de áreas con el resto de los picos analizados es ampliamente superior para el BZN. En todas las muestras se halló el BZNNa⁺. Únicamente en Ori B extracto ácido fue identificada la estructura del N-hidroxi-aminoBZN, el cual también podría ser un metabolito. Sin embargo, en las muestras de orina de voluntario adulto, este compuesto se identificó en todos los extractos analizados.

En las orinas sin tratamiento enzimático, no se halló ninguno de los dos compuestos “nuevos” identificados. A continuación se presentan los cromatogramas MS y +MS2, para los compuestos hallados. **Figura 4.3.4.2**

Figura 4.3.4.2. (a) Amino-BZN(H)⁺ con detección de masa (m/z 231,12245; T retención 10,7 minutos), barrido de 50 a 800 m/z **(b)** +MS2 para m/z 231,12532 y T retención de 10.7 minutos. **(c)** N-hidroxi-aminoBZN(H)⁺ con detección de masa (m/z 247,11702; T retención 11,1-11,2 min), barrido de 50 a 800 m/z. **(d)** +MS2 para m/z 247,12218 y T retención de 11,1 minutos.



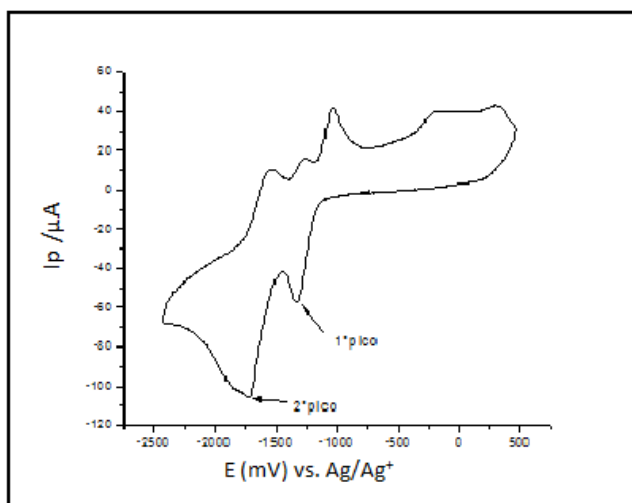


4.4. RESULTADOS PRELIMINARES DE LA SÍNTESIS ELECTROQUÍMICA DE AMINO-BZN (NH_2 -BZN)

Se realizaron voltamperogramas cíclicos para el BZN para determinar condiciones experimentales de la electrolisis a realizar. La **Figura 4.4.1** presenta un voltamperograma obtenido en DMSO y medio neutro donde se detectan dos procesos electroquímicos bien diferenciados, el primero a un potencial de 1,3V, el segundo a un potencial que ronda los 1,8V.

El análisis fue enfocado en el primer proceso, debido a que el segundo proceso se da en forma más compleja y escapa a los objetivos del presente trabajo. Allí, se observó un proceso de transferencia de electrones de tipo cuasi-reversible.

Figura 4.4.1. Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMSO en medio neutro. Electrolito soporte NaClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 200mV seg^{-1} .



Sin embargo, las evaluaciones cromatográficas de las soluciones pre y post electrolisis no presentaron diferencias significativas respecto de la aparición de un pico cuantitativo para el NH_2 -BZN, ni hubo una reducción cuantitativa del pico BZN (solución post electrolisis). La **Figura 4.4.2** corresponde a los cromatogramas de: **(a)** Solución pre electrolisis, **(b)** Solución post electrólisis.

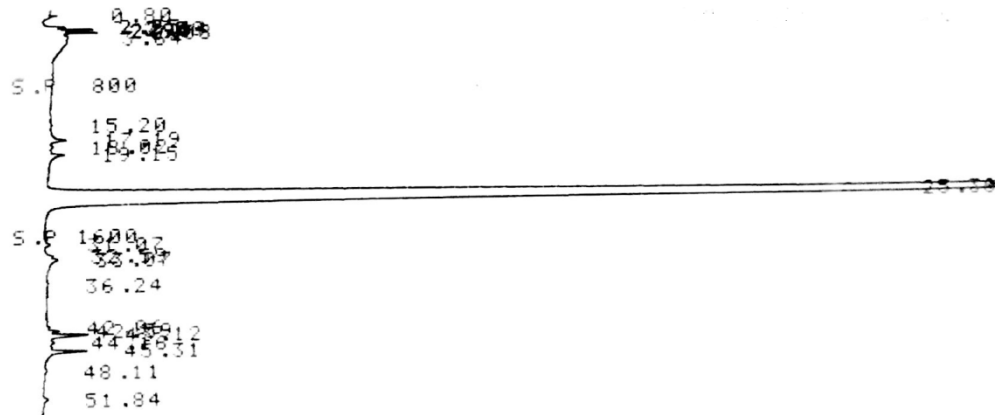
Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron:

- ✓ Columna DB5 (C-18 encapada), 250 x 4 mm, 5 μm : tamaño de partícula.
- ✓ Flujo 1mL/min,
- ✓ λ : 313nm

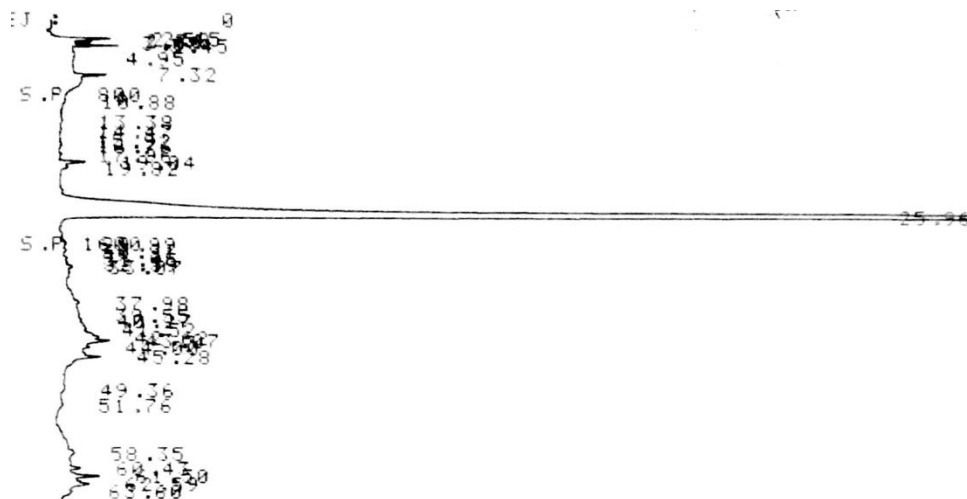
- ✓ Sistema en gradiente: Agua: AcN; los primeros 10 minutos la composición fue 100:0, luego se aumentó el contenido de AcN hasta llegar a 50:50 a los 50 minutos. Luego los últimos 10 minutos hasta completar la hora de corrida, se realizaron en una composición de 10:90.

Figura 4.4.2.

(a)



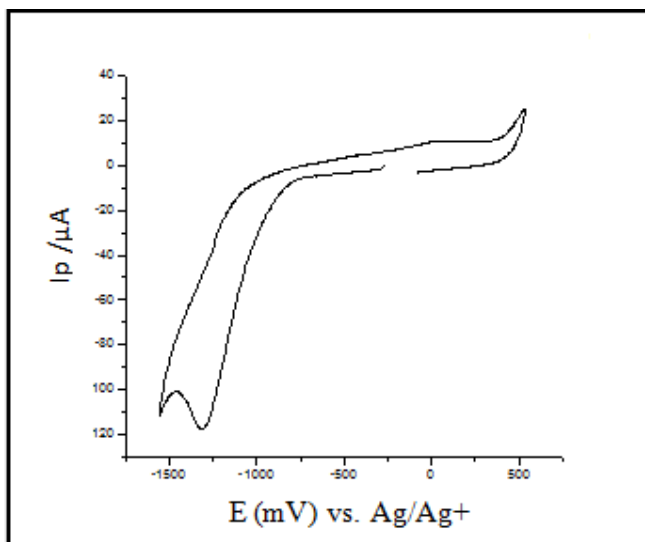
(b)



En una segunda tanda de ensayos, se evaluaron condiciones ácidas. Se realizó un voltamperograma en medio ácido con TFA de la solución electrolizada. Se generan corrientes mayores y a potenciales más bajos que modifican la forma de la curva, pero los

picos observados presentan los mismos voltajes que los encontrados en medio neutro (1,3V y 1,8V). Por lo que, el medio ácido no estaría favoreciendo la visualización de productos de la electrolisis reductiva del BZN, si hubiera. **Figura 4.4.3.**

Figura 4.4.3. Voltamperograma cíclico de BNZ (3,9mM) en DMSO con TFA (49,1mM) a una velocidad de barrido de 200mVseg-1. Electrolito soporte NaClO₄ 0,1M.

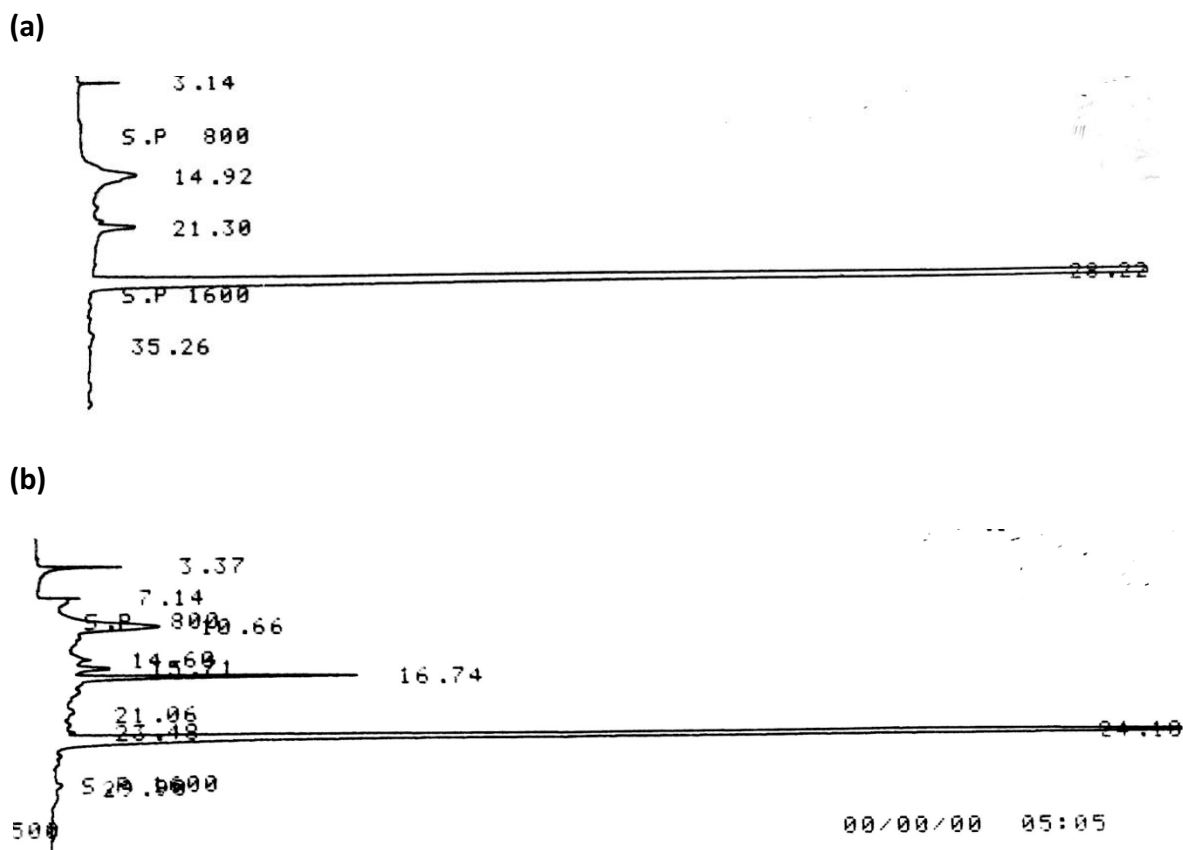


Se buscó cualitativamente la aparición del producto (NH₂-BZN) en la electrolisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) sembrando en placas las soluciones pre y post electrolisis y una solución patrón de BZN de concentraciones análogas a las trabajadas en la electrolisis. Se las corrió en los solventes: AE, AcN, MeOH. El revelado de estas placas se realizó mediante lámpara UV. No se observaron diferencias significativas entre las soluciones pre y post electrolisis.

Estas mismas soluciones fueron nuevamente evaluadas mediante HPLC pero usando un FM distinta: Buffer NH₄Ac/NH₃ (0,01M en NH₃ y 0,55M en NH₄Ac) pH: 7,4, mediante un gradiente de evolución igual al planteado para la FM anterior. Se evaluó la disminución del pH del Buffer en busca de mejores resoluciones cromatográficas y se llevó a pH: 6,5 mediante el agregado gota a gota y pHímetro, con solución de HAc 0,1M. Si bien se mejoró la resolución de los cromatogramas, no se encontraron nuevos indicios de la presencia de NH₂-BZN.

Finalmente, de la segunda electrolisis preparativa realizada en EtOH y medio neutro, se obtuvieron los cromatogramas HPLC-UV presentados en la **Figura 4.4.4.** se utilizaron las mismas condiciones de FM descritas en el segundo procedimiento consistente en un sistema en gradiente. **Figura 4.4.4.**

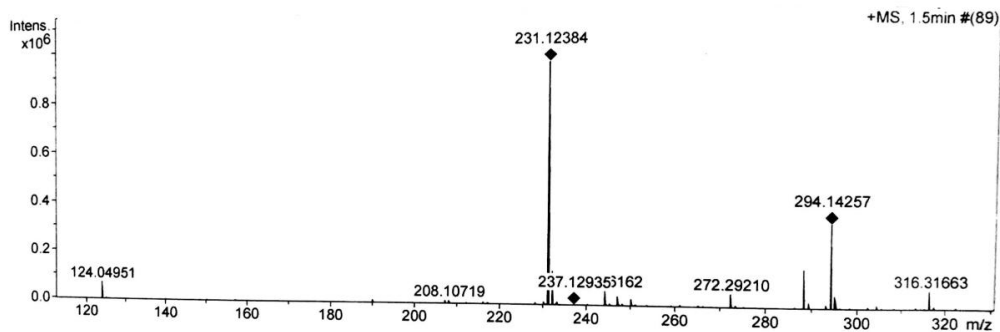
Figura 4.4.4. (a) Solución pre electrolisis; (b) Solución post electrolisis



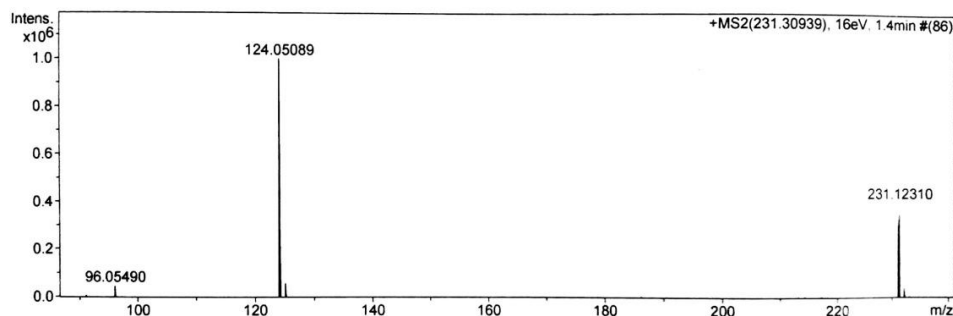
En este caso, el pico con tiempo de retención en 16,74 minutos, podría ser el producto buscado en la electrolisis del BZN.

Se evaluó la solución post electrolisis mediante HPLC/MS/MS, en busca de la identificación del $\text{NH}_2\text{-BZN}$. La **Figura 4.4.5** corresponde a los espectros de masa realizados a la solución post electrolisis. **(a)** A 1.50 minutos se encontró un m/z de 231 compatible con el $\text{NH}_2\text{-BZN}(\text{H})^+$; **(b)** el +MS2 de ese pico presentó un patrón de fragmentación similar al encontrado en la identificación del $\text{NH}_2\text{-BZN}$ como metabolito urinario.

Figura 4.4.5. (a)



(b)



4.5. DE LOS DOSAJES DE BZN EN LECHE MATERNA HUMANA.

4.5.1. ANÁLISIS DE LAS VARIANTES DE EXTRACCIÓN PARA BZN EN LECHE MATERNA

La siguiente **Tabla 4.5.1.1** resume todas las técnicas evaluadas para la extracción de BZN adicionado en leche materna, considerando un procedimiento desde 1 volumen de leche determinado. En todos los casos se utilizó como desnaturalizante TCA al 10% p/v, excepto para la técnica QuEChERS.

Los porcentajes de recuperación de cada variante, fueron el factor de decisión fundamental para elegir la alternativa que se sometería a un proceso de validación. En esta serie, las recuperaciones fueron, en orden creciente, menores al límite de detección para la extracción en fase sólida, menores al 40% para la extracción líquido / líquido, del orden del 60% para la técnica QuEChERS, menores al 70% para la extracción sólido / líquido y cercanas al 80% para la ultrafiltración. Como dato adicional, la extracción sólido / líquido presentó una pobre reproducibilidad de los resultados.

Tabla 4.5.1.1. Técnicas evaluadas para la extracción de BZN dopado en leche materna

| Técnica | Pretratamiento | Extracción / Purificación | Concentración / Purificación |
|---------|----------------|---------------------------|------------------------------|
|---------|----------------|---------------------------|------------------------------|

| | | | |
|--|--|---|---|
| Extracción Sol/Líquido | Vortear, sonicar | AcN 2 vol, centrifugo, desgrasado del sobrenadante con hexano | Vortex, centrifugación, separo sobrenadante y llevo a sequedad en rotavapor |
| Extracción Líquido/Líquido | sonicar | AcN 1 vol, AE 2 vol, vortex, centrifugo | Fase orgánica, rotavapor sequedad |
| Extracción en fase sólida (SPE) | Vortear, sonicar, NaOH hasta neutralidad | Vortex, centrifugo, sobrenadante para carga SPE C-18 | elución con AcN, sequedad en rotavapor |
| Técnica QuEChERS | 1 vol AcN, MgSO4 (ex), NaCl (ex) | Agitación, centrifuga, separo sobrenadante, MgSO4+silica | separo sobrenadante y llevo a sequedad en rotavapor |
| Extracción por Filtración | Vortear, NaOH hasta neutralidad | filtración membrana nylon 0,45um o 0,8 um | no presenta pasos de concentración |

4.5.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA SELECCIONADA PARA EXTRACCIÓN DE BZN EN LECHE MATERNA

De los ensayos de robustez realizados a la técnica de extracción de BZN en leche materna encontramos ausencia de correlación entre la medida del contenido lipídico/lipoprotéico y el grado de recuperación en la extracción del fármaco.

Las medidas de la fracción FLP arrojaron un valor promedio del 3,9% con una desviación estándar (s) de 1,3% y un rango de 1,9% - 8,7%. En las medidas del contenido lipídico de las leches maternas, se encontró un valor promedio para la fracción lipídica (FL) de 5,7% con una s de 1,8% y un rango de 1,8%-6,9%.

Tabla 4.5.2.1.

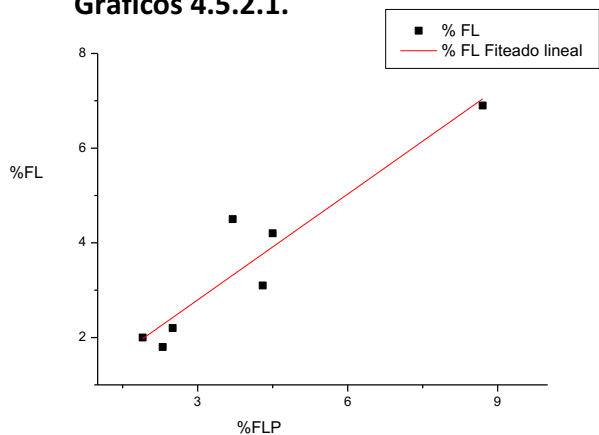
| Mta (valores promedios de duplicados) | %R | Cc BZN experimental (µg/ mL) | FL% | FLP% |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 77,4 | 5,8 | 4,2 | 4,5 |
| 2 | 75,8 | 5,7 | 2,1 | 2,4 |
| 3 | 66,9 | 4,3 | 6,8 | 8,7 |
| 4 | 73,7 | 5,5 | 2,0 | 1,9 |
| 5 | 74,0 | 4,1 | 1,8 | 2,3 |
| 6 | 81,3 | 6,1 | 3,1 | 4,3 |
| 7 | 67,2 | 5,1 | 4,0 | 3,7 |
| Media (Rango) | 73,7 (67,2-81,3) | 5,2 (4,1-6,1) | 5,7 (1,8 - 6,9) | 3,9 (1,9 - 8,7) |

El análisis de varianza sobre la correlación entre las medidas de la FLP y la FL arrojó un valor de F de 40,165, para una correlación lineal del 99,95% de "confianza o

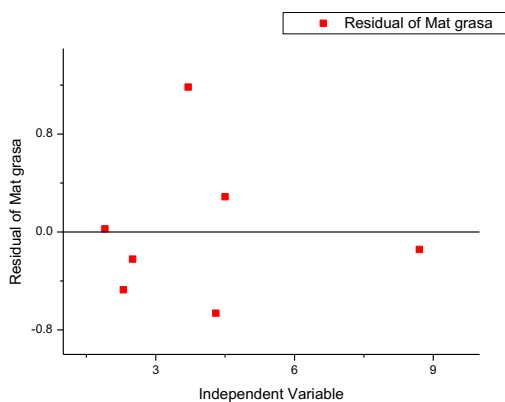
significancia". El porcentaje de recuperación promedio para estas muestras de leche dopadas fue del 74% con una s del 11%. **Tabla 4.5.2.1.**

Del análisis de varianza de la correlación entre FLP y FL con el porcentaje de recuperación hallado en las medidas encontramos un valor de F de 0,457 y 0,470 respectivamente, lo cual implica la ausencia de correlación entre la FLP y la FL con el porcentaje de recuperación del fármaco con un 99,95% de "confianza o significancia". **Gráficos 4.5.2.1; 4.5.2.2; 4.5.2.3; 4.5.2.4.**

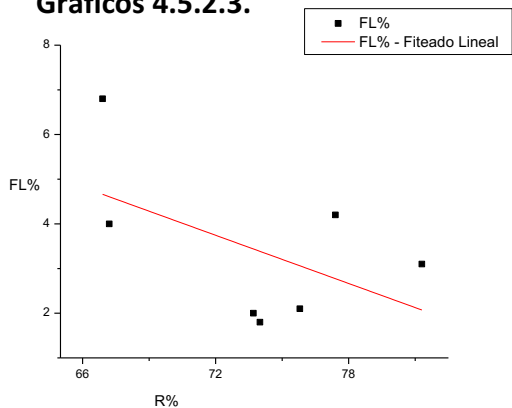
Gráficos 4.5.2.1.



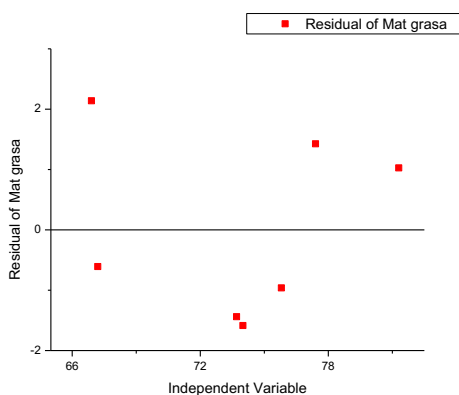
Gráficos 4.5.2.2.



Gráficos 4.5.2.3.



Gráficos 4.5.2.4.



4.5.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE BZN EN LECHE MATERNA

Las curvas de calibración realizadas mediante la técnica seleccionada para la extracción y cuantificación de BZN adicionado en leche materna permitieron obtener parámetros analíticos y estadísticos para la validación del método.

Criterios evaluados para la validación del método:

- ✓ Selectividad: ausencia de interferencia
- ✓ Sensibilidad: Límite de detección y cuantificación < 0.01 mg/mL (en función de datos bibliográficos de valores hallados en pacientes adultos: promedio de concentración para BZN en adultos: entorno a los 0.01 mg/mL).
- ✓ Exactitud: CV < 20% en cada punto del intervalo de trabajo.
- ✓ Precisión y reproducibilidad:

Curvas interdías: CV de la pendiente < 5% para cada recta.

Estabilidad de muestra QC: CV < 5 % luego de los distintos períodos de conservación en frizzer.

En las **Tablas 4.5.3.1 a 4.5.3.5** siguientes, se presentan los resultados obtenidos para los conjuntos de muestras utilizados para las 3 curvas de calibración realizadas en días distintos pero manteniendo las condiciones experimentales. Ver condiciones de las curvas en **3.2.1.8. Validación del método de extracción de BZN en leche materna** del capítulo anterior.

Tabla 4.5.3.1. BZN adicionado en leche materna

| Dia 1 | | Dia 2 | | Dia 3 | |
|-----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| x (µg/mL) | y(área) | x(µg/mL) | y(área) | x(µg/mL) | y(área) |
| 0,5 | 1402 | 0,5 | 1710 | 0,5 | 1157 |
| 0,5 | 1319 | 0,5 | 1430 | 0,5 | 1220 |
| 0,5 | 1936 | 0,5 | 1502 | 0,5 | 1379 |
| 1 | 2703 | 1 | 3444 | 1 | 3190 |
| 1 | 2876 | 1 | 2719 | 1 | 3347 |
| 1 | 3025 | 1 | 3142 | 1 | 2729 |
| 2,5 | 7556 | 2,5 | 7681 | 2,5 | 7513 |
| 2,5 | 7613 | 2,5 | 7853 | 2,5 | 7973 |
| 5 | 14433 | 5 | 14403 | 5 | 13723 |
| 5 | 14795 | 5 | 14016 | 5 | 13361 |
| 10 | 26124 | 10 | 31744 | 10 | 30785 |
| 10 | 30332 | 10 | 31918 | 10 | 31032 |
| 15 | 47078 | 15 | 46442 | 15 | 46833 |

| | | | | | |
|----|-------|----|-------|----|-------|
| 15 | 46768 | 15 | 47850 | 15 | 46698 |
|----|-------|----|-------|----|-------|

Tabla 4.5.3.2. Parámetros evaluados de curvas de calibración interdías

| $y = a + bx$ | a (S _a) | b (S _b) | r ² | CVpend% |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|----------------|---------|
| Curva día 1 | -321,74275 (503,39116) | 3057,0417 (70,37806) | 0,99315 | 2,3 |
| Curva día 2 | -254,31036 (256,55333) | 3157,04094 (35.86818) | 0,99832 | 1,1 |
| Curva día 3 | -434,84497 (281,3258) | 3122,70258 (39.33157) | 0,99794 | 1,3 |

Gráfico 4.5.3.1. Curva día 1

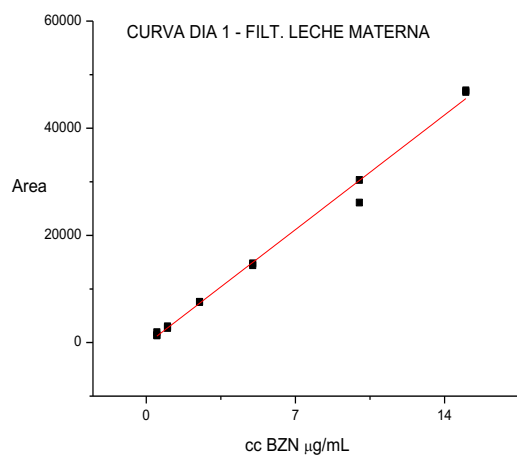


Gráfico 4.4.3.2. Curva día 2

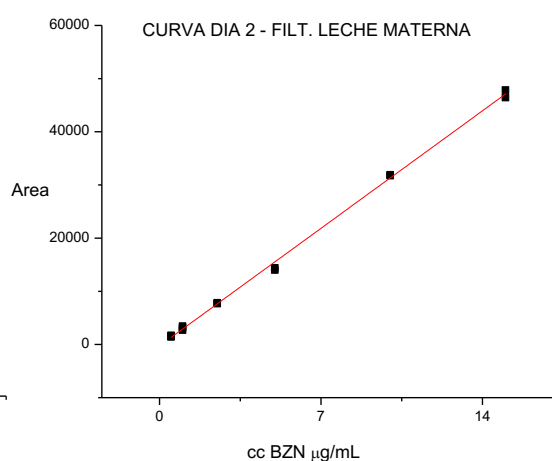


Gráfico 4.5.3.3. Curva día 3

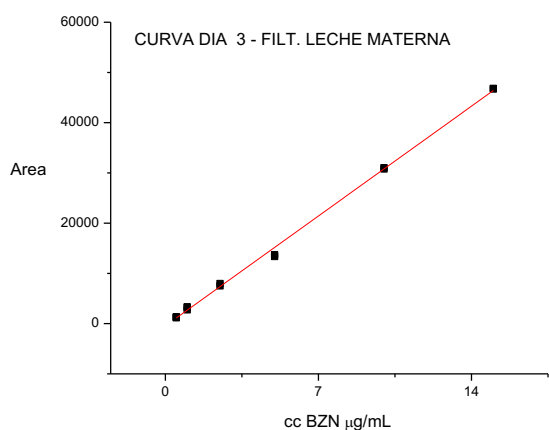


Tabla 4.5.3.3. Parámetros estadísticos para las curvas interdía

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | D 1 | D 2 | D 3 |
|----------------------|--------|-------|-------|---------|--------|--------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| | Ymed | Ymed | Ymed | S | S | S | CV% | CV% | CV% | n | n | n |
| N₁ | 1552 | 1547 | 1252 | 33,85 | 145,40 | 114,41 | 21,6 | 9,4 | 9,1 | 3 | 3 | 3 |
| N₂ | 2868 | 3102 | 3089 | 161,15 | 364,18 | 321,22 | 5,6 | 11,7 | 10,4 | 3 | 3 | 3 |
| N₃ | 7584,5 | 7767 | 7743 | 40,30 | 121,62 | 325,27 | 0,5 | 1,6 | 4,2 | 2 | 2 | 2 |
| N₄ | 14614 | 14210 | 13542 | 255,97 | 273,65 | 255,97 | 1,8 | 1,9 | 1,9 | 2 | 2 | 2 |
| N₅ | 28228 | 31831 | 30909 | 2975,50 | 123,04 | 174,65 | 10,5 | 0,4 | 0,6 | 2 | 2 | 2 |
| N₆ | 46923 | 47146 | 46766 | 219,20 | 995,60 | 95,46 | 0,5 | 2,1 | 0,2 | 2 | 2 | 2 |

N_i = nivel de concentración; n = número de replicados por nivel

Tabla 4.5.3.4. Cifras de mérito para las curvas obtenidas

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|-----------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| LOD µg/mL | 0,54 | 0,27 | 0,29 |
| LOQ µg/mL | 1,48 | 0,73 | 0,81 |
| Exactitud (N ₄) | 3,48 | 0,62 | -4,11 |
| Precisión (N ₄) | 1,8 | 1,9 | 1,9 |
| Rango lineal µg/mL | (1,48;15,00) | (0,73;15,00) | (0,81;15,00) |
| ANOVA | F = 1886,80996 Prob > F = 1.44329E ⁻¹⁴ | F = 7747,14565 Prob > F = 0 | F = 6303,45586 Prob > F = 0 |

Para una muestra control de estabilidad (QC) se evaluaron las recuperaciones halladas luego de distintos tiempos de conservación en frizzer a -20°C. **Tabla 4.5.3.5.**

Tabla 4.5.3.5. QC de BZN adicionado. Concentración final de 5 µg/mL

| | R (%) |
|---------|-------|
| 15 días | 73,8 |
| 30 días | 70,5 |
| 60 días | 73,0 |
| CV% | 2,4 |

4.6. ESTIMACIONES CLÍNICAS, FARMACOCINÉTICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS DOSAJES DE BZN EN LECHE MATERNA Y SU CORRELATO EN PLASMA

Un total de 12 mujeres y sus respectivos bebés fueron enrolados en el estudio. La edad y el peso promedio para las madres fue de 27 años (con rango entre 20 - 34 años) y 56 kg (con rango entre 45 -110 kg) respectivamente. La edad promedio para los lactantes fue de 5,2 meses (con rango de 20 días a 13 meses) y un peso promedio de 7,35 kg (con rango de 4,4 -10,2 kg). La dosis promedio materna de BZN fue de 5,65 mg/kg/ día (con rango de 3,6 – 6,6 mg/kg/día).

Las muestras de leche materna fueron tomadas en promedio 9 días (con rango de 6 – 34) de tratamiento por lo que podemos asumir que todas las pacientes se encontraban en un estado estacionario de la terapéutica.

La concentración plasmática de BZN promedio fue de 6,26 mg/L (6,26 µg /mL) (con rango de 0,3 -12,6 mg/L) y 3,8 mg/L (3,8 µg/mL) (rango de 0,3 – 5,9 mg/ L) en leche materna. La media del cociente entre la concentración de BZN en leche y en plasma fue de 0,52 (con rango de 0,3 -2,79). Se halló una correlación positiva entre plasma BZN y leche BZN, **Figura 4.6.1**.

Asumiendo una toma de leche diaria de 150 mL/kg de peso/día y multiplicando la concentración puntual en leche se obtiene la dosis de BZN absoluta del lactante en mg/kg/día. La estimación de la dosis de BZN promedio recibida por los bebés a través de la leche sería de 0,65 mg/kg/día, valor que representa un promedio de la dosis relativa del lactante (DRL) de 12,3% (con rango de 5,5 % – 17,0 %) de la dosis diaria materna corregida por peso. La **Tabla 4.6.1** presenta las concentraciones de BZN droga madre halladas en leche materna y en plasma de las pacientes participantes del protocolo de investigación.

El 45% de las madres tuvo ADRs, dos de ellas (18%) de carácter moderado debiendo discontinuar el tratamiento luego de 19 y 22 días. Una paciente tuvo ADRs de carácter severo luego de 26 días de tratamiento, por lo que también se suspendió tratamiento. Luego de la hospitalización la paciente se recuperó completamente y su hijo no presentó señales de ADRs en ningún momento. Estos fueron los únicos casos en los que la lactancia tuvo que ser discontinuada debido a la severidad de las reacciones maternas.

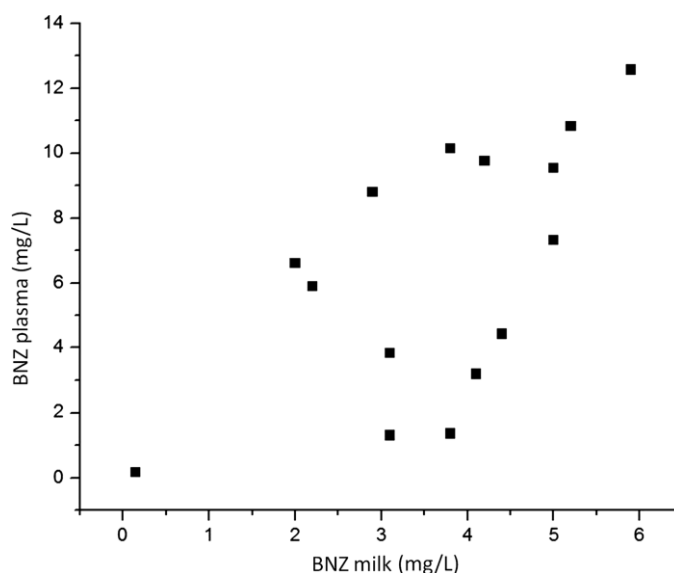
Tabla 4.6.1. Concentraciones individuales de BZN en plasma y leche materna

| Pac | Administración BNZ | | | Plasma | | Leche | | Riesgo exposición del lactante | | |
|-----|--------------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | BNZ ¹ | Dosis BNZ ² | Tiempo ³ | Tiempo ⁴ | BNZ ⁵ | Tiempo ⁴ | BNZ ⁵ | Dosis ⁶ | Proporción ⁷ | Dosis relativa ⁸ |
| P1 | 300 | 6,6 | 6 | ND | ND | 7 | 2,4 | 0,36 | ND | 5,5 |
| P2 | 300 | 5,9 | 9 | 12 | 4,43 | 9,5 | 4,4 | 0,66 | 0,99 | 11,2 |
| P3 | 400 | 5,7 | 7 | 11 | 10,13 | 10 | 3,8 | 0,57 | 0,38 | 10,0 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|--------------|---------|----|------|---------------|------|-------------|---------------|-----------|----------------|
| P4† | 400 | 6,5 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| P5† | 400 | 6,5 | 1 | 7,5 | 0,93 | ND | ND | ND | ND | ND |
| P6 | 300 | 5,6 | 9 | 12 | 3,19 | 18,5 | 4,1 | 0,62 | 1,29 | 11,0 |
| | | | 30 | 12,5 | 3,83 | 1 | 3,1 | 0,47 | 0,81 | 8,3 |
| P7 | 400 | 3,6 | 8 | 2,5 | 1,30 | 10,5 | 3,1 | 0,47 | 2,38 | 12,9 |
| | | | 34 | 62,5 | 0,30 | 59,5 | 0,3 | 0,05 | 1,00 | 1,3 |
| P8 | 300 | 5,6 | 7 | 13 | 7,32 | 1 | 5 | 0,75 | 0,68 | 13,4 |
| | | | 32 | 15 | 1,36 | 15 | 3,8 | 0,57 | 2,79 | 10,2 |
| P9 | 300 | 5,2 | 7 | 2,5 | 12,57 | 2 | 5,9 | 0,89 | 0,47 | 17 |
| | | | 32 | 13,5 | 6,61 | 13 | 2,0 | 0,29 | 0,30 | 5,6 |
| P10 | 400 | 5,9 | 9 | 14 | 9,53 | 2 | 5 | 0,75 | 0,52 | 12,7 |
| | | | 31 | 15 | 5,90 | 15 | 2,1 | 0,32 | 0,37 | 5,5 |
| P11 | 300 | 5,3 | 8 | 10,5 | 8,79 | 10,5 | 2,9 | 0,44 | 0,33 | 8,2 |
| | | | 30 | 9,5 | 9,75 | 9,5 | 4,2 | 0,63 | 0,43 | 11,9 |
| P12 | 300 | 5,4 | 8 | 11 | 10,82 | 11 | 5,2 | 0,78 | 0,48 | 14,5 |
| Pr | 300 | 5,7 | - | - | 6,26 | - | 3,8 | 0,65 | 0,52 | 12,3 |
| Rg | 300- 400- | 5,4-6,1 | - | - | 2,73- 9,59 | - | 2,8- 4,6 | 0,58- 0,75 | 0,47-1,29 | 11,0 - 13,3 |

¹ Dosis BZN materna (mg/día). ² Dosis BZN materna ajustada al peso mg/kg/día. ³ Tiempo de toma (días desde inicio del tratamiento). ⁴ Tiempo de toma de muestra en horas después de dosis. ⁵ Concentración plasmática o en leche, expresada en mg/L. ⁶ Dosis diaria del lactante en mg/kg. En duplicados de una misma muestra, se toma el valor superior, para no trabajar con valores promedios que pudieran subestimar los resultados. ⁷ Relación entre la concentración hallada en leche y la hallada en plasma. ⁸ Dosis relativa del lactante expresada como porcentaje ajustado por peso a dosis materna. Pac: Paciente. Pr: Promedio. Rg: Rango. † Estos pacientes abandonaron el estudio debido a la aparición de ADRs. ND: no determinados

Figura 4.6.1. Correlación entre ccBZN en plasma vs leche materna



4.7. DE LOS DOSAJES DE NFX EN PLASMA Y LECHE MATERNA HUMANA:

4.7.1. ANÁLISIS DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS PARA LA EXTRACCIÓN DE NFX EN PLASMA

Se evaluaron diferentes variantes de extracción, aplicadas sobre 1 mL de plasma heparinizado. Basados en la experiencia acumulada en el desarrollo de métodos para BNZ,

se definió un primer paso común con el agregado de 100 μL TCA 30 % p/v, seguido del vorteadado y el sonicado de la muestra por un minuto, respectivamente.

El factor de concentración para las técnicas evaluadas fue de 2, excepto para la técnica de filtración que no presentaba pasos de concentración, dado que en todas las variantes de extracción, se procedió a llevar a sequedad el sobrenadante mediante rotavapor para resuspender en 500 μL de AcN.

Todas las técnicas dan lugar a buenas resoluciones cromatográficas, excepto la filtración directa que ofrece pobre resolución de picos, seguramente por un conjunto de factores que incluyen la presencia de interferentes y un fuerte efecto matriz. En esta misma técnica, de filtración directa, el agregado de TCA genera una “crema” densa que dificulta el paso de filtración del sobrenadante mediante membrana en centrifuga. El procedimiento requirió tiempos largos de centrifugado (algunas horas), no apropiados para el manejo de varias muestras a la vez. Por esta razón, para esta última variante no fue posible desarrollar una curva de calibración, ni calcular los porcentajes de recuperación.

Los resultados de la variante 1 de extracción líquido / líquido, indican que deben evaluarse otros solventes de extracción debido a los bajos % R y a la emulsificación de la muestra.

Para la variante 2 de extracción líquido / líquido se propone al solvente utilizado (N-hexano) para una extracción lipídica en pos de disminuir la emulsificación de la muestra y debido a la pobre capacidad mostrada de extracción del fármaco. En el caso de la variante 3 no es posible evitar la emulsificación con la etapa del desgrasado y no se mejora significativamente el % de recuperación con el mismo, proponiéndose el agregado de sales que constituyen parte de las modificaciones de la variante 4. En esta última el agregado de la sal anhidra antes de la separación de fases disminuyó considerablemente el grado de emulsificación de la muestra. Por otro lado, la fracción neutra no tuvo % R cualitativamente mejores que la fracción ácida.

Los porcentajes de recuperación calculados, en orden creciente, fueron: < 30% para la variante 2, del 50% para la variante 1, del 52% para la variante 3 y del 55% para la variante 4.

La técnica que arrojó el mejor % R (extracción líquido/líquido variante 4) sin ser el valor hallado una diferencia cuantitativamente significativa respecto de otras variables, resultó ser la técnica que generaba mejores condiciones para la manipulación de la muestra. La emulsificación luego de la desnaturalización ácida de la muestra, generó condiciones muy engorrosas para la separación de fases mediante extracción líquido/líquido, el agregado de sales a la muestra mejoró cualitativamente la no-emulsificación de la misma.

Se agregó un ciclo de extracción sobre el precipitado obtenido luego de la desnaturalización. El solvente de esta extracción se recogió junto con el resto de las fracciones orgánicas. Este hecho mejoró el % R.

Se propuso una etapa de filtración del solvente de extracción recolectado de todos los ciclos de extracción, mediante filtro con membrana de 0,45 µm de tamaño de poro, para luego ser llevado a sequedad. Este paso resultó no solo mejorar la calidad de los extractos resuspendidos, sino que también, mejoró las recuperaciones halladas y la resolución cromatográfica. Se modificó el solvente de resuspensión de los extractos obtenido de AcN a MeOH, hecho que también mejoró el % R.

Con el fin de mejorar el factor de concentración, se ensayó una resuspensión del extracto seco en un volumen de 250 µL, lo que resultó en un factor de concentración 4 veces mayor que la muestra original. La **Tabla 4.7.1.2** resume el análisis de las etapas de la técnica. Se describen brevemente los pasos de la misma:

- ✓ A un volumen de plasma heparinizado de 1000 µL se le adiciona 100 µL de TCA al 30%, se vortea y se sonica por 7 minutos. Se centrifuga a máxima velocidad 10 min.
- ✓ Se separa fase líquida del precipitado y se adiciona un volumen de 500 µL de AE como solvente extracción, al precipitado y al sobrenadante, se vortea y luego se centrifuga.
- ✓ Si existe alto grado de emulsificación del plasma se puede agregar una punta de espátula de una sal anhidra (Na₂SO₄), se vortea y se vuelve a centrifugar 5 minutos a máxima velocidad.
- ✓ Se realizan 3 ciclos de extracción con AE recolectando en un único tubo las fracciones de los 3 ciclos.
- ✓ El solvente obtenido es filtrado con papel de filtro de 0,45 µm de poro, mediante sistema de jeringa y portafiltro.
- ✓ El ultrafiltrado obtenido se lleva a sequedad en rotavapor a 40°C para ser resuspendido en 250 µL de MeOH, se vortea, centrifuga e inyecta en HPLC-UV.

Tabla 4.7.1.2. Análisis de las etapas de la técnica propuesta

| Etapa | Vol mta (µL) | Vol. y solvente utilizado (µL) | Tiempo requerido(min) | Grado de dificultad |
|---------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Desnaturalización /centrifugado | 1000 | 100 TCA | 5 | Baja |
| Extracción | Fase precipitada | 500 AE (x1) | 10 min/extracción | Media |

| | | | | |
|----------------------|--------------|----------------|---------------------------------|-------|
| | Fase líquida | 500 AE (x3) | 10 min/extracción | Media |
| Filtración | ≤ 2000 | AE recolectado | 5 | Baja |
| Sequedad | ≤ 2000 | AE recolectado | 5 | Baja |
| % R final 70% | | | Tiempo total: 45 minutos aprox. | Media |

Las condiciones cromatográficas fueron, columna: C18- ODS (4.6 x 150 mm) 5 µm, detección a 395 nm, fase móvil 50:50 Metanol/agua, flujo 0,8 ml/min y tiempo de retención del NFX en torno a los 8 min.

4.7.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NFX EN PLASMA HEPARINIZADO

Las curvas de calibración realizadas mediante la técnica seleccionada para la extracción y cuantificación de NFX permitieron obtener parámetros analíticos y estadísticos para la validación del método.

Criterios evaluados para la validación del método:

- ✓ Selectividad: ausencia de interferencia
- ✓ Sensibilidad: Límite de detección y cuantificación < 0.01 mg/mL (en función de datos bibliográficos de valores hallados en pacientes adultos: promedio de concentración para BZN en adultos: entorno la los 0.01 mg/mL).
- ✓ Exactitud: CV < 20% en cada punto del intervalo de trabajo.
- ✓ Precisión y reproducibilidad:

Curvas interdías: CV de la pendiente < 5% para cada recta.

Estabilidad de muestra QC: CV < 5 % luego de los distintos períodos de conservación en frizzer.

En las **Tablas 4.7.2.1; 4.7.2.2; 4.7.2.3; 4.7.2.4; 4.7.2.5** siguientes, se presentan los resultados obtenidos para los conjuntos de muestras utilizados para las 3 curvas de calibración realizadas en días distintos pero manteniendo sin cambios las condiciones experimentales. Las **Gráficas 4.7.2.1; 4.7.2.2; 4.7.2.3** corresponden a las curvas de calibración de cada día. Ver condiciones de las curvas en **3.2.5.2. Validación del método de extracción de NFX en plasma heparinizado** del capítulo anterior.

Tabla 4.7.2.1. NFX adicionado en plasma heparinizado

| Día 1 | | Día 2 | | Día 3 | |
|-----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| x (µg/mL) | y(área) | x(µg/mL) | y(área) | x(µg/mL) | y(área) |

| | | | | | |
|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| 0,5 | 103,7 | 0,5 | 89,7 | 0,5 | 80,4 |
| 0,5 | 82,437 | 0,5 | 107,9 | 0,5 | 105,3 |
| 0,5 | 102,888 | 0,5 | 115,58 | 0,5 | 142,1 |
| 2,51 | 722,301 | 2,51 | 737,89 | 2,51 | 748 |
| 2,51 | 718,645 | 2,51 | 710,59 | 2,51 | 723,6 |
| 2,51 | 710,745 | 2,51 | 717,32 | 2,51 | 698,5 |
| 5,01 | 1071,28 | 5,01 | 1075,67 | 5,01 | 1072 |
| 5,01 | 1084,22 | 5,01 | 1100,65 | 5,01 | 1123,2 |
| 5,01 | 1100,34 | 5,01 | 1124,44 | 5,01 | 1193,25 |
| 12,05 | 3032,6 | 12,05 | 3010,38 | 12,05 | 3037,98 |
| 12,05 | 3223,97 | 12,05 | 3279,4 | 12,05 | 3124,76 |
| 12,05 | 3126,78 | 12,05 | 3089,38 | 12,05 | 3230,88 |

Tabla 4.7.2.2. Parámetros evaluados de curvas de calibración inter día

| $y = a + bx$ | a (S _a) | b (S _b) | r ² | CVpend% |
|--------------|----------------------|---------------------|----------------|---------|
| Curva día 1 | -44,92188 (53,73351) | 259,40821(8,08108) | 0,98943 | 3,11 |
| Curva día 2 | -34,5109(55,40994) | 258,64525(8,3332) | 0,9887 | 3,22 |
| Curva día 3 | -24,95332(48,87081) | 258,7512(7,34977) | 0,9912 | 2,84 |

Gráfico 4.7.2.1. Curva de calibración día 1

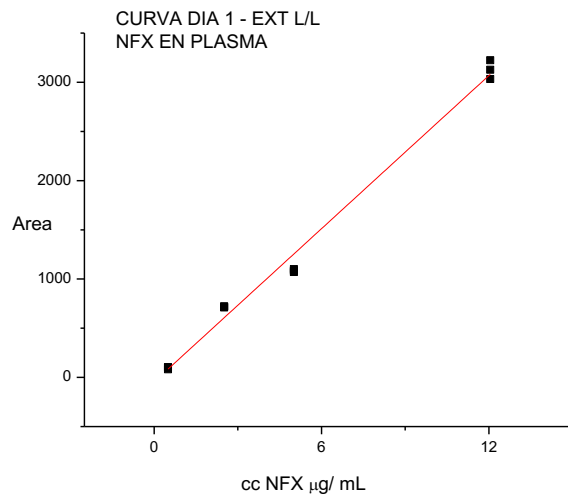


Gráfico 4.7.2.2. Curva de calibración día 2

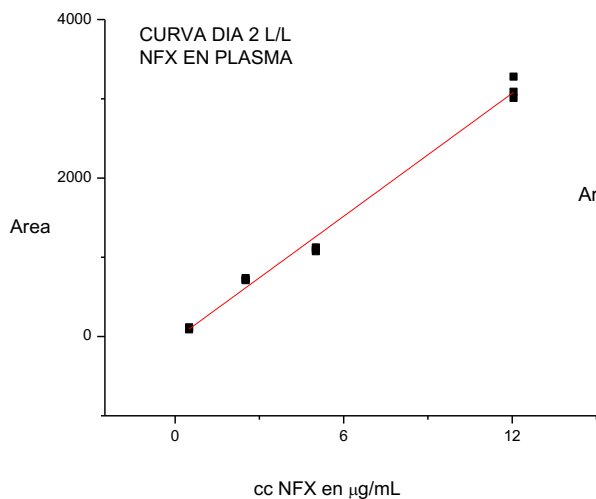


Gráfico 4.7.2.3. Curva de calibración día 3

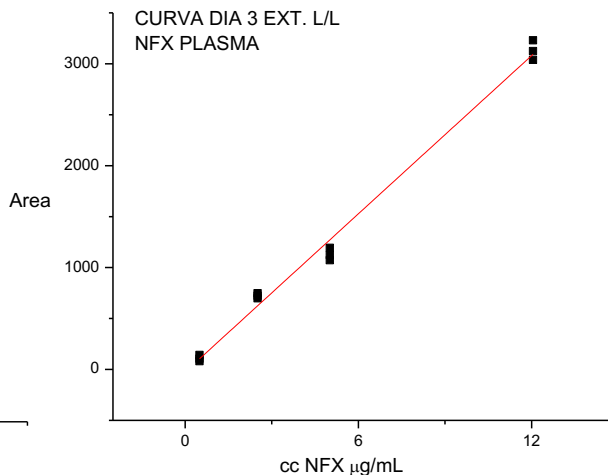


Tabla 4.7.2.3. Parámetros estadísticos para las curvas interdía

| | Día 1 | | | | Día 2 | | | | Día 3 | | | |
|----------------------|---------|-------|-------|---|---------|--------|-------|---|---------|-------|-------|---|
| | Ymed | S | CV% | n | Ymed | S | CV% | n | Ymed | S | CV% | N |
| N₁ | 96,34 | 12,33 | 12,80 | 3 | 104,39 | 13,29 | 12,73 | 3 | 109,27 | 31,83 | 29,13 | 3 |
| N₂ | 717,23 | 4,82 | 0,67 | 3 | 721,93 | 14,22 | 1,97 | 3 | 723,37 | 24,75 | 3,42 | 3 |
| N₃ | 1085,28 | 14,56 | 1,34 | 3 | 1110,25 | 24,39 | 2,22 | 3 | 1129,48 | 60,87 | 5,39 | 3 |
| N₄ | 3127,78 | 95,69 | 3,06 | 3 | 3126,39 | 138,27 | 4,42 | 3 | 3131,21 | 96,61 | 3,08 | 3 |

N_i = nivel de concentración; n = número de replicados por nivel

Tabla 4.7.2.4. Cifras de mérito para las curvas obtenidas

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| LOD µg/mL | 0,68 | 0,71 | 0,62 |
| LOQ µg/mL | 1,86 | 1,93 | 1,70 |
| Exactitud (N ₃) | -2,08 | 0,17 | 1,91 |
| Precisión (N ₃) | 1,34 | 2,22 | 5,39 |
| Rango lineal µg/mL | (1,86 ; 12,05) | (1,93 ; 12,05) | (1,70 ; 12,05) |

Para una muestra control de estabilidad (QC) se evaluaron las recuperaciones halladas luego de distintos tiempos de conservación en freezer a -20°C. **Tabla 4.7.2.5.**

Tabla 4.7.2.5. QC de NFX adicionado. Concentración final de 5 µg/mL

| | R (%) |
|---------|-------|
| 15 días | 71,2 |
| 30 días | 70,5 |
| 60 días | 69,8 |
| CV% | 0,99 |

4.7.3. DOSAJES DE MUESTRAS DE PLASMA NFX:

Con el método validado se pretrataron y analizaron mediante HPLC-UV las siguientes muestras de pacientes tratados con NFX. **Tabla 4.7.3.1.** Muchas muestras no presentaron picos compatibles con los tiempos de retención del NFX, lo que supone que la sensibilidad del método (LOD) en estas muestras no es suficiente para cuantificarlas. Sin embargo, la necesidad clínica de evaluar estas muestras está satisfecha desde el punto de vista analítico, ya que no se encontró ninguna de las muestras con concentraciones más altas de las plateadas por el rango lineal. Se presentan cromatogramas representativos de los dosajes de muestras reales y de puntos de la curva de calibración **Gráfico 4.7.3.1; 4.7.3.2; 4.7.3.3; 4.7.3.4.**

Tabla 4.7.3.1. Dosajes NFX en plasma

| Muestra | T.ret plasma (min) | Cc NFXplasma µg/mL | Observación |
|---------|--------------------|--------------------|-------------|
| P1 M1 | NO | < LOD | Observación |
| P2 M1 | 7,67 | 0,62 | Intrato |
| P3 M1 | 7,67 | 0,62 | Intrato 1 |
| P4 M1 | 7,70 | 1,1 | Intrato 1 |
| P4 M2 | NO | - | Intrato 1 |
| P5 M1 | 7,82 | 0,8 | Fintrato |
| P5 M2 | 7,67 | 0,7 | Intrato 1 |
| P6 M1 | 7,64 | 1,1 | Fintrato |
| P6 M2 | NO | < LOD | Intrato 1 |
| P7 M1 | NO | < LOD | Intrato 2 |
| P7 M2 | NO | < LOD | Intrato 1 |
| P8 M1 | NO | < LOD | Intrato 2 |
| P8 M2 | NO | < LOD | Intrato 1 |
| P9 M1 | NO | < LOD | Intrato 1 |
| P10 M1 | 7,55 | 0,9 | Intrato 1 |
| P10 M2 | NO | < LOD | Intrato 2 |

Pi = número de paciente. Mi= muestra puntual, algunas muestras fueron tomadas intratratamiento (Intrato), otras finalizado el tratamiento (Fintrato). NO: No se observan picos compatibles con NFX.

Gráfico 4.7.3.1.

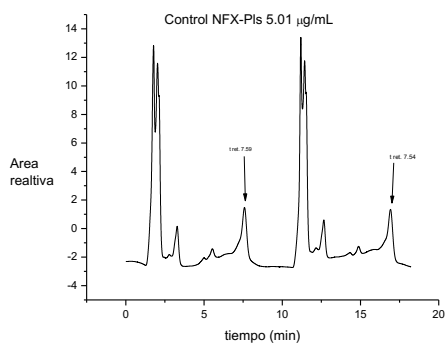


Gráfico 4.7.3.2.

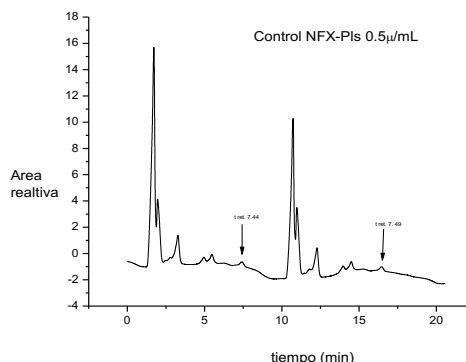


Gráfico 4.7.3.3.

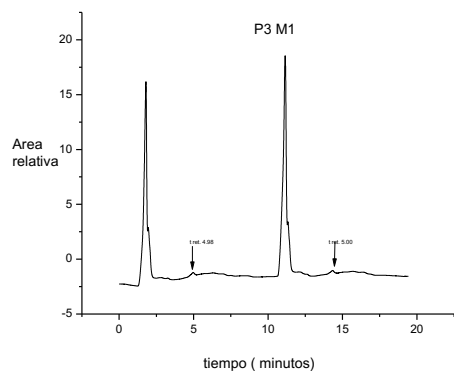
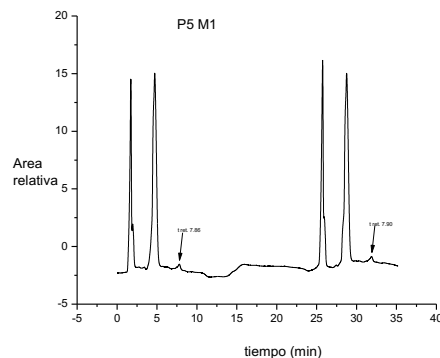


Gráfico 4.7.3.4.

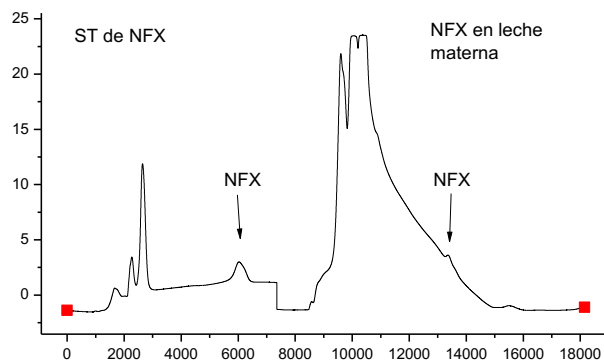


4.7.4. OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICA DE FILTRADO PARA LA EXTRACCIÓN DE NFX EN LECHE MATERNA

Se pretrataron muestras de leche materna mediante un método similar al explorado para BZN en esta misma matriz. En esta instancia no se trabajó con dos filtros de membrana de nitrocelulosa en serie sino con uno sólo de 0,45 µm de diámetro de poro. Se tomaron las condiciones cromatográficas seleccionadas para el método de extracción en plasma. Las primeras muestras pretratadas y analizadas mediante HPLC-UV arrojaron cromatogramas con perfiles muy mal resueltos para el pico de NFX. La fracción frente de corrida tardaba en salir hasta el tiempo de retención del pico NFX. No se obtenía una línea de base clara antes del comienzo del pico para NFX, lo que resultó una gran

dificultad para cuantificarlo. Además, los picos de NFX para los niveles de concentraciones bajas resultaron bastante chicos. **Figura 4.7.4.1.**

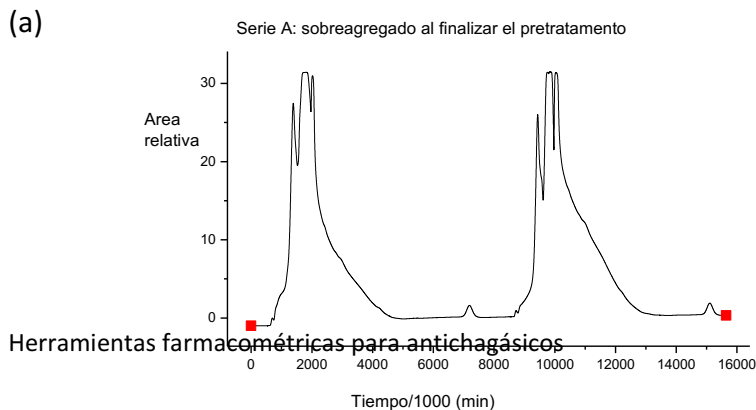
Figura 4.7.4.1. Cromatograma HPLC-UV. La primer parte del gráfico corresponde a una inyección de ST de NFX de igual concentración que la muestra pretratada de leche materna que corresponde a la segunda inyección (segunda parte del gráfico).



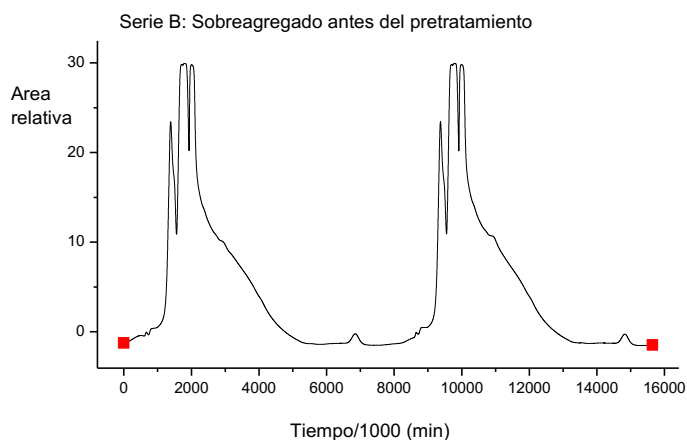
Se evaluó una estrategia de sobreagregado de ST a la muestra a procesar de modo obtener una buena relación entre el frente de corrida y la cuantificación del pico de NFX. En una primera instancia se fijó un volumen de muestra al que se le adhiere $\frac{1}{2}$ del volumen en ST de NFX.

El sobreagregado de ST antes o después del pretratamiento no es significativamente distinto en términos cualitativos. Sin embargo, al agregar la ST luego del pretratamiento de la leche, este sobreagregado no pasa por la etapa de extracción, por lo que el rendimiento es mayor al agregarlo al final del pretratamiento. Observar en la **Figura 4.7.4.2** que el pico de NFX es ligeramente mayor para la Serie A. Por lo que la estrategia del sobreagregado se realiza luego del pretratamiento de la muestra.

Figura 4.7.4.2. Cromatogramas de referencia para evaluar el sobreagregado de ST de NFX **(a)** al final del pretratamiento analítico, previo a la inyección cromatográfica **(Serie A)** **(b)** al inicio del pretratamiento analítico **(Serie B)**.



(b)



Finalmente, se proponen los pasos para la técnica seleccionada para la realización de la curva de calibración para la extracción de NFX en leche materna:

- ✓ Se tomó un volumen de 1000 μL de leche materna dopada con NFX y se colocó en tubo plástico de hemólisis
- ✓ Se agregó 100 μL de TCA al 30% p/v para desproteínizar la muestra. Se vorteoó por 30 segundos
- ✓ Se sonicó durante 10 minutos
- ✓ Se filtró mediante jeringa, portafiltro y filtro de 0,45 micrones de tamaño de poro en centrifuga
- ✓ Se recolectó el ultrafiltrado en eppendorff rotulado y se agregó 400 μL de una ST de NFX de 9,064 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se vorteoó 10 segundos
- ✓ se centrifugó 2 minutos y se analizó por HPLC-UV

Condiciones finales seleccionadas para el análisis por HPLC-UV para muestras de leche materna con NFX:

- ✓ Longitud de onda seleccionada: 395nm
- ✓ Proporción de solvente en la fase móvil: Metanol: Agua (45:55) %v/v
- ✓ Flujo: 0,6 mL/min
- ✓ Columna: C-18 select B de (250 x 4,6) mm de dimensiones internas y 5 micrones de diámetro de partícula.

4.7.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NFX EN LECHE MATERNA.

Las curvas de calibración realizadas mediante la técnica seleccionada para la extracción y cuantificación de NFX permitieron obtener parámetros analíticos y estadísticos para la validación del método.

Criterios evaluados para la validación del método:

- ✓ Selectividad: ausencia de interferencia
- ✓ Sensibilidad: Límite de detección y cuantificación < 0.01 mg/mL (en función de datos bibliográficos de valores hallados en pacientes adultos: promedio de concentración para BZN en adultos: entorno la los 0.01 mg/mL).
- ✓ Exactitud: CV < 20% en cada punto del intervalo de trabajo.
- ✓ Precisión y reproducibilidad:

Curvas interdías: CV de la pendiente < 5% para cada recta.

Estabilidad de muestra QC: CV < 5 % luego de los distintos períodos de conservación en frizzer.

En las **Tablas 4.7.5.1; 4.7.5.2; 4.7.5.3; 4.7.5.4; 4.7.5.5** siguientes, se presentan los resultados obtenidos para los conjuntos de muestras utilizados para las 3 curvas de calibración realizadas en días distintos pero manteniendo las condiciones experimentales. Las **Gráficas 4.7.5.1; 4.7.5.2; 4.7.5.3** corresponden a las curvas de calibración de cada día. Ver condiciones de las curvas en **3.2.5.4. Validación del método de extracción de NFX en leche materna** del capítulo anterior.

Tabla 4.7.5.1. NFX adicionado en leche materna

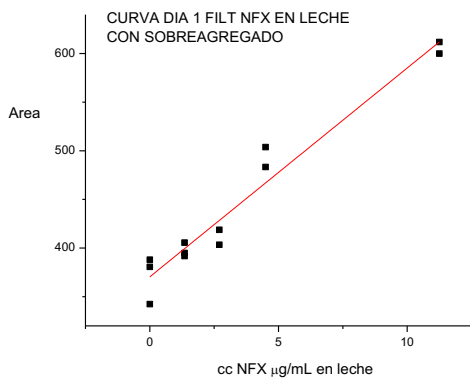
| Día 1 | | Día 2 | | Día 3 | |
|-----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| x (µg/mL) | y(área) | x(µg/mL) | y(área) | x(µg/mL) | y(área) |
| 0 | 388,05 | 0 | 349,8 | 0 | 379 |
| 0 | 380,64 | 0 | 379,7 | 0 | 380,2 |
| 0 | 342,36 | 0 | 335 | 0 | 360 |
| 1,35 | 394,89 | 1,35 | 415,76 | 1,35 | 390,9 |
| 1,35 | 405,55 | 1,35 | 401,8 | 1,35 | 386,67 |
| 1,35 | 391,73 | 1,35 | 390 | 1,35 | 394,8 |
| 2,7 | 418,73 | 2,7 | 452 | 2,7 | 420,8 |
| 2,7 | 403,39 | 2,7 | 438,19 | 2,7 | 410 |
| 4,5 | 503,75 | 4,5 | 476,25 | 4,5 | 506,9 |

| | | | | | |
|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 4,5 | 483,32 | 4,5 | 492,39 | 4,5 | 491,2 |
| 11,25 | 611,79 | 11,25 | 603,46 | 11,25 | 610,8 |
| 11,25 | 599,89 | 11,25 | 583,40 | 11,25 | 607,35 |

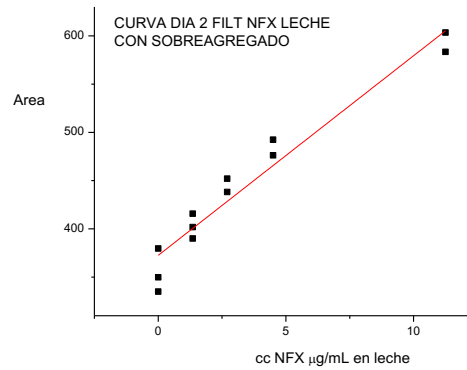
Tabla 4.7.5.2. Parámetros evaluados de curvas de calibración interdías

| $y = a + bx$ | a (S _a) | b (S _b) | r ² | CV pend% |
|--------------|---------------------|---------------------|----------------|----------|
| Curva día 1 | 370,41693(7,5534) | 21,46774(1,47739) | 0,95026 | 6,88 |
| Curva día 2 | 372,55483(8,02617) | 20,68645(1,56986) | 0,9401 | 7,59 |
| Curva día 3 | 370,2616(6,80384) | 21,86766(1,33078) | 0,96072 | 6,08 |

Gráficas 4.7.5.1



Gráficas 4.7.5.2



Gráficas 4.7.5.3.

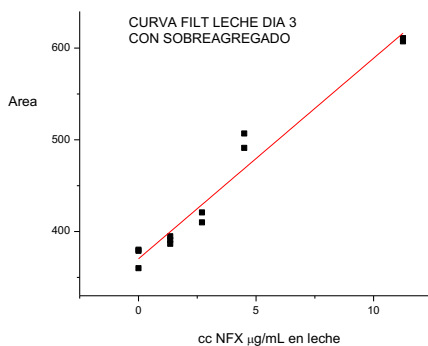


Tabla 4.7.5.3. Parámetros estadísticos para las curvas interdías

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | D 1 | D 2 | D 3 |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| | Ymed | Ymed | Ymed | S | S | S | CV% | CV% | CV% | n | n | n |
| N₁ | 370,35 | 354,83 | 373,07 | 24,52 | 22,77 | 11,33 | 6,62 | 6,42 | 3,04 | 3 | 3 | 3 |
| N₂ | 397,39 | 402,52 | 390,79 | 7,24 | 12,89 | 4,07 | 1,82 | 3,20 | 1,04 | 3 | 3 | 3 |
| N₃ | 411,06 | 445,09 | 415,4 | 10,85 | 9,76 | 7,64 | 2,64 | 2,19 | 1,84 | 2 | 2 | 2 |
| N₄ | 493,53 | 484,32 | 499,05 | 14,45 | 11,41 | 11,10 | 2,93 | 2,36 | 2,22 | 2 | 2 | 2 |
| N₅ | 605,84 | 593,43 | 609,07 | 8,41 | 14,18 | 2,44 | 1,39 | 2,39 | 0,40 | 2 | 2 | 2 |

N_i = nivel de concentración; n = número de replicados por nivel

Tabla 4.7.5.4. Cifras de mérito para las curvas obtenidas

| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| LOD µg/mL | 1,16 | 1,28 | 1,03 |
| LOQ µg/mL | 3,16 | 3,49 | 2,80 |
| Exactitud (N ₃) | -3,03 | 5,01 | -1,99 |
| Precisión (N ₃) | 2,64 | 2,19 | 1,84 |
| Rango lineal µg/mL | (3,16 ; 11,25) | (3,49 ; 11,25) | (2,80 ; 11,25) |

Para una muestra control de estabilidad (QC) se evaluaron las recuperaciones halladas luego de distintos tiempos de conservación en freezer a -20°C. **Tabla 4.7.5.5.**

Tabla 4.7.5.5. QC de NFX adicionado. Concentración final de 5 µg/mL

| | R (%) |
|----------------|-------|
| 15 días | 69,7 |
| 30 días | 68,3 |
| 60 días | 70,5 |
| CV% | 1,6 |

4.7.6. DOSAJES DE NFX EN MUESTRAS DE LECHE MATERNA:

Se dosaron 21 muestras de madres en período de lactancia bajo terapéutica con NFX y se obtuvieron los siguientes resultados. **Tabla 4.7.6.1.** Estos resultados y su relación

con los dosajes en plasma se discuten en el capítulo V: **Discusión: 5.2.1.2. Dosajes de NFX en leche materna.**

La **Figura 4.7.6.1** presenta los cromatogramas de referencia de **(a)** Una solución diluída de la ST de NFX utilizada para los sobreagregados en las muestras de leche. **(b)** Primer nivel de concentración para la curva de calibración, corresponde a la concentración determinada únicamente por el sobreagregado en el volumen final. **(c)** Muestra de leche materna de paciente bajo tratamiento, pretratada y analizada mediante HPLC-UV.

Figuras 4.7.6.1

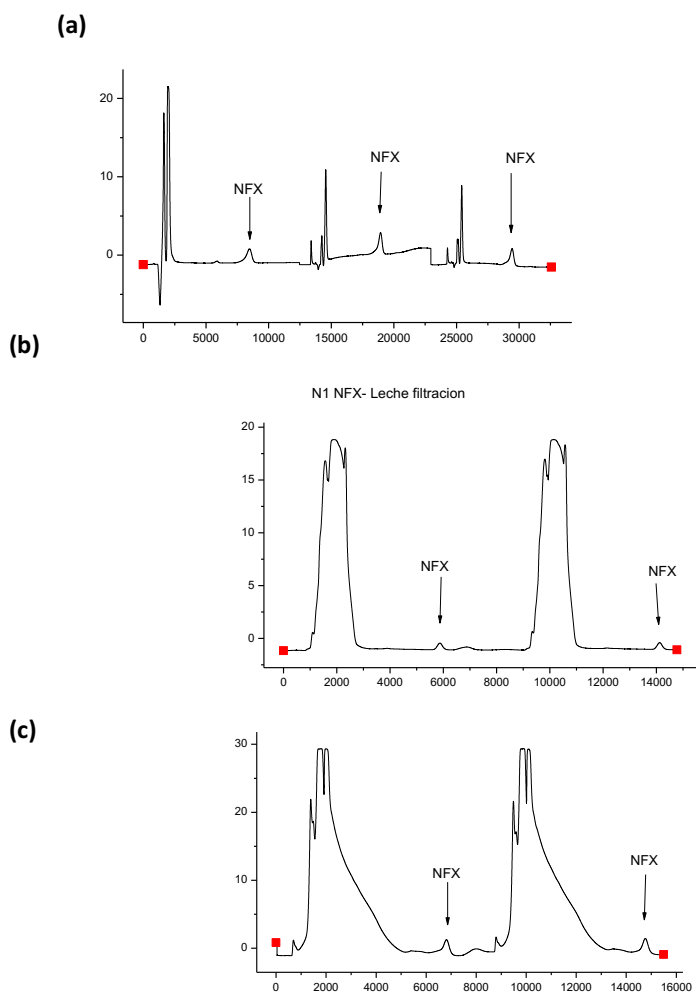


Tabla 4.7.6.1.

| Muestra | NFX ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|--------------------------|
| LAC 009 GLMA intratto | $9,5 \pm 0,5$ |
| LAC 010 M1 intratto | $6,2 \pm 0,3$ |
| LAC 011 intratto | $3,30 \pm 0,4$ |
| LAC 013 intratto | $4,6 \pm 0,2$ |
| LAC 013 fintto | < LOQ |
| LAC 014 fintratto | < LOQ |

| | |
|---------------------|-----------|
| LAC 015 pretratto | < LOD |
| LAC 015 M1 intratto | 3,2 ± 0,3 |
| LAC 015 M2 intratto | < LOQ |
| LAC 016 pretratto | < LOD |
| LAC 016 M1 intratto | < LOQ |
| LAC 016 M2 intratto | < LOQ |
| LAC 018 pretratto | < LOD |
| LAC 018 M1 | 3,4 ± 0,2 |
| LAC 018 M2 | < LOQ |
| LAC 019 pretratto | < LOD |
| LAC 019 M1 intratto | < LOQ |
| LAC 019 M2 intratto | < LOD |
| LAC 020 pretratto | < LOD |
| LAC 020 M1 intratto | 3,5 ± 0,3 |
| LAC 020 M2 intratto | 4,6 ± 0,2 |

Mi = número de muestra cuando para un paciente existieran más de una toma de muestra. **Pretratto**: muestra tomada antes del inicio del tratamiento farmacológico. **Intratto**: muestra tomada durante el tiempo del tratamiento farmacológico. **Fintratto**: muestra tomada luego de finalizar el tratamiento farmacológico.

DISCUSIÓN

5.1. BENZNIDAZOL

5.1.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS DESARROLLOS ANALÍTICOS EN LAS MATRICES BIOLÓGICAS ESTUDIADAS

5.1.1.1. PLASMA

El uso de la longitud de onda entre 313 nm y 324 nm está descrito en la literatura para la detección del BZN por HPLC-UV en muestras biológicas.^{86,87,104,105,106} En las experiencias propias, la detección a 313 nm ofreció la mejor sensibilidad sin un crecimiento significativo de ruido. El LOD y el LOQ del método propuesto están entre los más bajos reportados en la literatura y posiblemente esté dentro del límite técnico para un análisis mediante HPLC con detección UV.

¹⁰⁴ Workman P, White RAS, Walton MI, Owen LN, Twentyman PR. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br J Cancer* 1984;50:291–303

¹⁰⁵ Morilla MJ, Benavidez P, Lopez MO, Bakas L, Romero EL. Development and *in vitro* characterization of a benznidazole liposomal formulation. *Int J Pharm* 2002;249:89–99

¹⁰⁶ de Castro CR, Montalto de Mecca M, Fanelli SL, de Ferreyra EC, Díaz EG, Castro JA. Benznidazole-induced ultrastructural and biochemical alterations in rat esophagus. *Toxicology* 2003;191: 189–198.

Mención aparte merece la elección de la liofilización como método de pretratamiento de la muestra. En revisión por pares, este hecho fue observado, en el sentido que la liofilización es por lejos un método poco elegido para el análisis de especímenes obtenidos en estudios clínicos o en la implementación de metodologías para el seguimiento terapéutico. Sin embargo podemos afirmar que, en el contexto de trabajo utilizado, la liofilización ofreció ventajas no solamente para una eficaz extracción desde la matriz proteica, facilitando la desnaturalización de las proteínas y la desorción del BZN, sino también proveyó de un método inmejorable para el transporte y almacenamiento de las muestras, manteniendo la integridad de los analitos buscados.

En otro aspecto, existe un interés en la determinación del significado clínico de las concentraciones plasmáticas de BZN. Según nuestro conocimiento, hay dos escenarios distintos para analizar: las concentraciones plasmáticas en pacientes adultos y las concentraciones plasmáticas en pacientes pediátricos. Basados en los datos *in vitro* y en el estudio de la farmacocinética en humanos adultos, fue propuesto originalmente un rango terapéutico de entre 3 y 6 µg/mL para muestras de plasma adulto. Sin embargo, en este estudio fueron observados valores aún más bajos en pacientes pediátricos.

En este sentido, el LOQ promedio del método desarrollado para plasma fue de 0,49 µg/mL, parece ser apropiado tanto para un contexto pediátrico como para el adulto. En nuestros trabajos, los volúmenes de muestras obtenidos fueron del orden de los 2 mL de plasma. Es importante hacer notar que volúmenes menores de muestra disminuirían la sensibilidad, resultando en valores de LOQ más elevados. De todos modos, con la metodología propuesta, podríamos trabajar con volúmenes menores de plasma, siendo aún adecuado para el contexto pediátrico. Por otro lado, ha sido reportado que concentraciones plasmáticas más elevadas de BZN están asociados con mayor riesgo de toxicidad,^{107,108} pero los riesgos de toxicidad hallados en poblaciones pediátricas han sido bajos.⁵⁵ En síntesis, el rango lineal del método propuesto para muestras de plasma es adecuado para la evaluación de pacientes en ambos contextos clínicos.

5.1.1.1.1. DE LOS DOSAJES DE BZN EN EL CONTEXTO DEL ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL (POPPK)

Las concentraciones plasmáticas de BZN en niños fueron marcadamente más bajas que las reportadas en estudios para adultos tratados a dosis comparables. Posiblemente

¹⁰⁷ Castro JA, Montalto de Mecca M, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Tox* 2006;25:471–479

¹⁰⁸ Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:157–63

esto puede estar debido a un mayor CL/F en niños. Estas bajas concentraciones plasmáticas halladas, sin embargo, fueron asociadas con una alta respuesta terapéutica dentro de la cohorte estudiada. Integrando estos resultados con reportes previos que indicaron la menor frecuencia de eventos adversos en niños, se puede sugerir una correlación positiva entre concentraciones de la droga y la incidencia de eventos adversos. Esta correlación entre la frecuencia de aparición de ADRs con la edad planteada en la bibliografía existente^{55,109,110} fue también sugerido en este estudio, con solo 1 de 4 pacientes con ADRs por debajo de los 7 años. Estos resultados sugieren que podrían estar justificados los estudios clínicos en adultos, que verifiquen la efectividad tripanocida de la droga con dosis más bajas.⁸⁸

El modelo de PK poblacional mostró un CL/F corregido por peso con buena correlación para las edades, donde los pacientes niños más jóvenes presentaron un CL/F significativamente más alto que niños mayores y adultos. Esto resultaría en vidas medias más cortas, es decir, una eliminación más rápida y una menor acumulación en los niños más pequeños comparados con los mayores y adultos. Esto, en el contexto terapéutico donde los pacientes fueron tratados con dosis ajustadas al peso, es decir, entre 5-8 mg/kg/día de BZN.

La dependencia de CL/F con la edad puede ser explicada mediante varias razones. En particular, es bien sabido que CL/F corregido por peso en niños entre 2 y 6 años es significativamente más alto que en niños mayores y adultos para muchas drogas, depuradas mediante riñón e hígado.¹⁰⁸

Desafortunadamente al día de hoy no está disponible la ruta metabólica específica involucrada en la eliminación del BZN, lo que dificulta aún más el nivel de especulación en torno a los factores que pueden influir potencialmente en su eliminación, tales como interacciones con otros medicamentos o alimentos. Es posible que la variabilidad respecto de CL/F dependiente de la edad sea una función del aumento de la biodisponibilidad (F) entre edades, más que una tasa de depuración mayor a edades tempranas. Estas hipótesis no pueden ser corroboradas al momento debido a la inexistencia de una formulación intravenosa de BZN.

¹⁰⁹ Sosa Estani S., Segura E L., Ruiz A M., Velazquez E., Porcel B M., et al. (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 59: 526–529

¹¹⁰ de Andrade A L., Zicker F., de Oliveira R M., Almeida Silva S., Luquetti A., et al. (1996) Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348: 1407–1413

A pesar de estas bajas concentraciones, el tratamiento en niños fue efectivo y bien tolerado, con una alta tasa de respuesta (evaluada mediante la negativización de la qPCR al final del tratamiento). En base a los resultados hallados, es esperable que niños mayores de 7 años, incluyendo adolescentes se comporten más similarmente a adultos que a los niños más pequeños desde el punto de vista farmacocinético y farmacodinámico de la droga. En este contexto sería concebible reducciones de las dosis de BZN en adultos de modo de obtener exposiciones sistémicas similares a las encontradas en niños pequeños. Sin embargo, hay que tener en cuenta las limitaciones que se plantean a la hora de interpretar los resultados. El estudio presentado enmarcado en esta tesis estuvo restringido a un rango de edades de entre 2 a 12 años, siendo imprudente realizar extrapolaciones a pacientes más pequeños.

5.1.1.2. ORINA

Con el propósito de determinar las relevancias clínicas del rango de concentraciones de BZN en muestras de orina se evaluaron estudios previos sobre la excreción urinaria de BZN.⁸⁵ En estos estudios se indica que una proporción minoritaria de la droga madre es excretada en la orina después de 4 días de una dosis oral. Dichos hallazgos no han sido confirmados por otros autores. Las muestras de orina de 24 horas analizadas mediante el método desarrollado presentado en esta tesis, mostraron una concentración de droga madre BZN de 19,87 µg/mL y 25,2 µg/mL paciente adulto y pediátrico respectivamente. Estos valores reflejan una excreción del orden del 3% y 7 % respectivamente de la dosis oral, que sin embargo resultó ser menor a lo previsto por los reportes previos.

Si bien estas muestras fueron cuantificadas, los resultados no pueden pensarse más allá de un contexto puntual, que brinda información valiosa ya que fué la primera vez que se realizó un dosaje de BZN en una muestra de orina de paciente pediátrico bajo tratamiento antichagásico. Además, porque el estudio de esta muestra mediante técnicas cromatográficas asociadas a espectrometría de masas, permitieron postular los primeros metabolitos para el BZN en dicho contexto.

5.1.1.3. LECHE MATERNA

La leche es una matriz compleja desde el punto de vista analítico. La fracción proteica de la leche contiene numerosas proteínas hidrofílicas que son difíciles de separar por precipitación. A su vez, los glóbulos lipídicos que componen la leche pueden contener moléculas lipofílicas, determinando recuperaciones más bajas en los procedimientos de

extracción. Estos hechos, pueden complicar significativamente el análisis. Por otro lado, si los lípidos no son removidos de la muestra, también podrían contribuir al deterioro de las columnas cromatográficas utilizadas en los análisis.¹¹¹

Por otro lado, como ya lo hemos planteado al introducir esta matriz, la leche materna humana puede variar significativamente su composición y concentración en un individuo y entre individuos durante cortos períodos de tiempo debido a múltiples razones que determinan una gran variabilidad inter e intra individuo por muestra.^{112,113,114}

¿Cómo sería la forma de evaluar la versatilidad y eficacia del método teniendo en cuenta que la matriz biológica en estudio presenta una gran variabilidad intra e inter individuo respecto a la composición de macro y micronutrientes?

En busca de respuestas se evaluó la robustez del método desarrollado mediante estudios de recuperación del fármaco en función de porcentajes de materia grasa presentes en las distintas leches. Se midió el contenido de materia grasa para cada muestra mediante dos técnicas distintas y se realizaron extracciones de BZN de concentración conocida para esas mismas leches. Se pudo indicar que si bien las variaciones en el contenido graso de las leches fueron de valores de entre el 2 y el 9%, este dato no incide en el grado de recuperación y extracción del fármaco que se mantuvo relativamente constante, dado que no encontramos correlaciones estadísticas significativas entre los contenidos de lípidos o lipoproteínas y el porcentaje de recuperación, sugiriendo que el método es suficientemente robusto.

Sin embargo, la fase lipídica y lipoproteica podrían ser removidas mediante únicamente una filtración en tándem, aunque la droga a extraer podría estar fuertemente unida a estas fases. Estas interacciones pueden ser parcialmente destruidas mediante sonicado previo al filtrado, sin embargo un paso de desnaturalización de proteínas propone la mejor alternativa para combinar con el sonicado y la filtración.

¹¹¹ Kmetec V, Roskar R. HPLC determination of tramadol in human breastmilk. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;32:1061–1066

¹¹² Bjørhovde A, Grønhaug Halvorsen T, Einar Rasmussen K, et al. Liquidphase microextraction of drugs from human breast milk. *Anal Chim Acta.* 2003;491:155–161

¹¹³ Shi Y-d, Sun G-q, Zhang Z-g, et al. The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food Chem.* 2011;127:1193–1198

¹¹⁴ Rossi DT, Scott Wright D. Analytical considerations for trace determinations of drugs in breast milk. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15:495–504

A pesar de tener porcentajes de recuperación en torno al 75%, que podría considerarse como relativamente bajo, es un valor que ha demostrado ser reproducible y la respuesta analítica en el rango lineal es muy buena para los propósitos clínicos. A su vez, con el fin de hallar el método más adecuado al contexto clínico y analítico con el que se contaba, varias técnicas conocidas de pretratamiento tales como extracción líquido / líquido, SPE, QuEChERS, fueron evaluadas. En todas se obtuvieron recuperaciones menores que las encontradas en la técnica de filtración y la mayoría de ellas requería de volúmenes mayores de muestra, o utilizaban más cantidad de pasos y reactivos, en algunos casos requerían la utilización de solventes orgánicos.

En el método propuesto y validado el primer filtro de 0,80 μm , retiene partículas más grandes y previene que el segundo filtro de 0,45 μm se sature. En síntesis, el procedimiento propuesto en el método de filtración en tandem resultó novedoso, ecológico, analíticamente aceptable y clínicamente aplicable.

5.1.1.3.1. SOBRE LOS DOSAJES DE BZN EN LECHE MATERNA

La presencia de *T. cruzi* en leche materna fue demostrado en muy pocas ocasiones y casi exclusivamente en madres que tenían pezones sangrantes durante la etapa de infección aguda. Aunque el riesgo de exposición al parásito mediante la leche materna no ha sido claramente establecido, no es esperable que sea significativo y no se considera la Enfermedad de Chagas en la madre razón suficiente como para evitar la lactancia materna.^{115,116,117}

Sin embargo, situaciones especiales tales como la lactancia materna durante la fase aguda de la enfermedad, una reactivación de la enfermedad o la existencia de pezones sangrantes, deberían ser evaluados con especial atención.

Muchas veces en contextos vulnerables, el contacto entre las mujeres jóvenes y el sistema de salud, por fuera del embarazo y el puerperio resulta esporádico. Además, en poblaciones con alto número de embarazos por individuo, existe un tiempo relativamente corto disponible para tratamiento, por fuera del embarazo y lactancia. Esta situación fuerza al médico clínico a elegir entre tratar a la madre o sostener la lactancia materna, a

¹¹⁵ Bittencourt AL, Sadigursky M, Da Silva AA, et al. Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83:37-9

¹¹⁶ Campos R, Pinto PL, Moreira AA, et al. Experimental study on the transmission of Chagas' disease by milk. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1988;43:146-7

¹¹⁷ Ferreira CS, Martinho PC, Amato N, et al. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001;43:161-2

pesar de las recomendaciones existentes respecto de mantener exclusivamente a lactancia materna por al menos los primeros seis meses de vida.¹¹⁸

Asimismo, la elección entre tratamiento y lactancia materna no está exenta de riesgos. Por un lado, está la posibilidad de tratamiento de la madre y la prevención en posibles futuros embarazos de infecciones congénitas, así como también la prevención de complicaciones cardíacas a largo plazo, si se elige el tratamiento por sobre la lactancia. Por el otro, ésta elección plantea la necesidad de exposición al bebé a aguas no seguras (para la preparación de leches de fórmula) con riesgos asociados a infecciones y enfermedades de otro tipo. Sumado, están los recursos económicos asociados a la compra de dichas leches de fórmula.

En el marco de los desarrollos de esta tesis se realizó el primer estudio prospectivo para evaluar la transferencia del BZN a la leche materna en mujeres con Enfermedad de Chagas. Los resultados muestran, asumiendo una ingesta diaria de 150 mL/kg/día, que los lactantes estarían exponiéndose a una dosis relativa del infante (RID) del 12 % de la dosis materna corregida por peso. Este RID es cercano a los valores de corte del 10% propuestos en guías para la evaluación de riesgo a drogas durante lactancia materna.^{119,120,121}

A su vez, dada la seguridad del BZN en infantes ampliamente demostrada y los resultados de las concentraciones de BZN halladas en leche no sería de esperar la aparición de eventos adversos en el lactante. Esto es así, debido a que no existen riesgos significativos de ADRs en exposiciones que son entre 5-10 veces más bajas que las propuestas para la terapéutica. En este sentido, no se observaron ADRs en ninguno de los lactantes participantes del estudio, ni ningún cambio en el comportamiento, progresión del peso, u otro efecto potencialmente atribuible al BZN, confirmando la seguridad durante la lactancia.

¹¹⁸ Eidelman AI, Schanler RJ. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012;129:e827–41.

¹¹⁹ Ito S. Drug therapy for breast-feeding women. *N Engl J Med* 2000;343:118–26

¹²⁰ McNamara PJ, Abbassi M. Neonatal exposure to drugs in breast milk. *Pharm Res* 2004;21:555–66

¹²¹ Rowe H, Baker T, Hale TW. Maternal medication, drug use, and breastfeeding. *Pediatr Clin North Am* 2013;60:275–94

La incidencia total de ADRs en las mujeres adultas de la cohorte evaluada fue del 45%, valor que está en concordancia con las tasas previamente descriptas para la terapéutica en adultos.^{109,108,122}

La transferencia de drogas en la leche maternas es función de su peso molecular (PM) y de los niveles plasmáticos maternos.^{119,123} La molécula de BZN es pequeña (PM: 260) con una alta biodisponibilidad oral y una moderada unión a proteínas (50%).¹⁰⁴ Por otro lado, los resultados hallados muestran una clara evidencia de que las concentraciones en leche están en función de las concentraciones en plasma. Estos resultados, son concordantes con la regla general que afirma que, bajo protocolos de farmacoterapéutica, las concentraciones en leche humana para la mayoría de las drogas son usualmente bajas y rara vez dará lugar a niveles que podrían producir una respuesta farmacológica en el lactante.^{119,124}

Una limitación posible para este estudio podría ser el pequeño número de pacientes enrolados, hecho que hace muy improbable la observación de eventos adversos poco comunes en los lactantes. Sin embargo, en las últimas décadas un número relativamente grande de pacientes pediátricos enfermos de Chagas en varios centros de América Latina, incluyendo neonatos e infantes, han sido tratados con BZN a dosis terapéuticas aproximadamente 8-10 veces más altas que la exposición esperada para la leche materna basada en nuestros resultados, y no se han encontrado problemas significativos en el desarrollo de las terapéuticas u otros eventos adversos no conocidos al momento.¹²⁴ Por lo tanto, no existirían razones para creer que exposiciones a concentraciones significativamente más bajas pudieran llevar a la aparición de eventos adversos no observados a dosis terapéuticas.

En definitiva, considerando las concentraciones de BZN droga madre halladas en las leches maternas y en plasma pareado de las pacientes, es razonable afirmar que el pasaje de BZN a leche materna no sería significativo y que por lo tanto no habría contraindicaciones para el niño para la prescripción de la terapéutica a las madres que amamantan.

5.1.2. CONSIDERACIONES SOBRE LA BÚSQUEDA DE METABOLITOS DEL BZN

¹²² Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102(Suppl 1):95–7

¹²³ McNamara PJ, Abbassi M. Neonatal exposure to drugs in breast milk. *Pharm Res* 2004;21:555–66

¹²⁴ Sachs HC. The transfer of drugs and therapeutics into human breast milk: an update on selected topics. *Pediatrics* 2013;132:e796–809

De los estudios por espectrometría de masas en tándem realizados en muestras de plasma de pacientes pediátricos, dos especies pudieron ser detectadas e identificadas: BZN y NBAA. Los espectros de masas presentaron un ión molecular principal $[M+H^+]$ en un m/z de 261 y otro en 283, correspondiente al ión $[M+Na^+]$. Ambos coincidían completamente con la estructura del BZN. Otro pico identificado con ion principal $[M+H^+]$ de m/z de 150 presentó un patrón de fragmentación compatible con los iones descriptos. La formación de la NBAA se propone como producto de clivaje en el grupo alquilo del BZN. A pesar de no contar con registros propios (anteriores a esta tesis) de LC/MS/MS para NBAA, perfiles análogos a los encontrados en estos estudios fueron descriptos previamente usando MS.⁹²

¿La NBAA identificada podría ser un producto de clivaje *in situ* de la droga madre durante su almacenamiento o pretratamiento?

Con propósitos cuantitativos, la integridad de la droga madre en la muestra debe ser asegurada usando un pretratamiento que no produzca la descomposición de la misma. Este hecho fue evaluado mediante el análisis de muestras blanco dopadas con BZN, donde luego del pretratamiento no se observaron picos cromatográficos en el entorno del BZN similares a los hallados en las muestras de paciente bajo terapéutica donde se identificó por MS la estructura de NBAA. Tampoco se registró la aparición de nuevos picos o perfiles cromatográficos modificados respecto de una muestra analizada a tiempo “cero” y la misma muestra luego de distintos períodos de almacenamiento.

A su vez, el BZN es conocido como un compuesto de gran estabilidad, por lo que sería muy improbable que la NBAA identificada pueda ser producto de un clivaje de la muestra *in situ*, luego de recolectada. Esto además significa, que la detección de este compuesto no sería un artefacto en la medida.

De la información disponible en la literatura, son escasos los estudios en seres humanos y la mayoría obsoletos y aunque es altamente probable que el metabolismo hepático del BZN dependa de la familia de enzimas del complejo citocromo P₄₅₀, existen diferencias debido a un polimorfismo poblacional cuyos efectos aparentes no están del todo claros al día de hoy.¹⁰⁷

En concordancia con los hallazgos presentados en esta tesis, existen primeros trabajos que describen que análogamente con otros nitroimidazoles, el clivaje del anillo de BZN debería ocurrir durante la metabolización hepática.¹⁰⁴ Asimismo, en un trabajo reciente, un producto de la deleción del grupo nitroimidazol (α -aminoBAA) fue hallado

como resultado de la metabolización reductiva del BZN llevado adelante por las nitroreductasas de tipo I del tripanosoma.⁹⁵ Aunque no es esperable encontrar durante el tratamiento antichagásico concentraciones detectables en plasma de metabolitos parasitarios, la presencia de esta especie como un producto metabólico en otro contexto muestra una estabilidad biológica de la estructura del grupo bencilo.

Estos resultados, en concordancia con la información disponible, indican que es altamente probable que la NBAA derive de una serie de reacciones metabólicas del BZN y que sea un producto estable.

En conclusión, existe una evidencia fuerte de que la NBAA sea un metabolito plasmático del BZN en pacientes pediátricos tratados con BZN y es la primera evidencia experimental hallada en seres humanos. Es notable que esta información relevante surja de nuestros estudios, realizados más de 40 años después de su aprobación para su uso en humanos. Este hecho, es representativo de drogas usadas en las llamadas enfermedades olvidadas, como lo es la Enfermedad de Chagas.

Otras publicaciones indican como productos de reducción del BZN a los compuestos 2-hidroxi-imidazol y 2-amino-imidazol.^{104,125} Estos dos compuestos serían generados por el metabolismo anaeróbico del BZN en tejidos de mamíferos¹²⁶ y detectados como productos de su reducción química.¹²⁷ Aunque en el transcurso de este trabajo estos compuestos no fueron detectados en los estudios desarrollados en plasma humano, si lo fueron en el caso del análisis de metabolitos en orina humana.

Si bien poblacionalmente estos hallazgos en orina pediátrica y de voluntario adulto, no han sido confirmados al momento, es sumamente llamativo el hecho de haber identificado los compuestos N-hidroxi-amino BZN y amino-BZN tanto en una muestra pediátrica de paciente en tratamiento, como en una de voluntario adulto sano. Cabe recordar que el voluntario adulto sano recibió una monodosis de BZN lo que podría indicar que estos compuestos serían productos de eliminación del metabolismo general del BZN (metabolismo en etapas tempranas del tratamiento).

¹²⁵ Schwartz DE, Hofheinz W (1982) Metabolism of nitroimidazoles. In: Breccia et al. (eds) Nitroimidazoles. Chemistry, pharmacology and clinical application. Nato Advanced Study Institute Series, Series A: Life Sci, vol 42. p 189

¹²⁶ Walton MI, Workman P (1987) Nitroimidazole bioreductive metabolism. Quantitation and characterization of mouse tissue benzimidazole nitroreductases in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 36:887–896

¹²⁷ Panicucci R, McClelland RA (1989) 4,5-Dihydro-4,5-dihydroxyimidazoles as products of the reduction of 2-nitroimidazol. HPLC assay and demonstration of equilibrium transfer of glyoxal to guanine. *Can J Chem* 67:2128–2135

En un modelo murino, una nitroreducción enzimática de tipo II es propuesta para el BZN mediante una serie de reacciones secuenciales con un potencial redox muy bajo, que resulta en el amino derivado (amino-BZN).⁸⁶ También, es propuesto mediante otro camino de nitroreducción de tipo I, en el que el producto final sería en este caso un nitrilo altamente tóxico para las células del parásito y del hospedador. La especificidad de esta reacción estaría dada por la expresión exclusivamente de las nitroreductasas de tipo I del parásito.⁹⁵

En otro trabajo reciente sobre metabolómica de *T. cruzi* con BZN, una serie de compuestos compatibles con metabolitos son identificados y también el amino derivado y el hidroxilamin derivado del BZN han sido propuestos.¹²⁸ Nuevamente, se considera poco probable la detección de metabolitos parasitarios en concentraciones cuantificables para los métodos usados en matrices humanas, pero bien podrían ser producto del metabolismo en humanos.

Finalmente, nuestros ensayos enfocados en la posibilidad de síntesis del compuesto reducido (amino-BZN) mediante técnicas electroquímicas, resultó ser un sistema con una complejidad mayor a la teóricamente estimada. El rendimiento de la electrólisis con el fin de síntesis preparativa del compuesto como droga patrón fue bajo y el proceso sugiere una sucesión de pasos no muy bien definidos de especies sucesivamente reducidas. Este fenómeno observado *in vitro*, es compatible con las evidencias que surgen de nuestros estudios y son reportadas por otros autores, en el sentido que la reducción del grupo nitro *in vitro*, ocurriría en una serie de etapas, donde tanto la reversibilidad de las reacciones como la complejidad en términos de diversidad de productos son factores importantes a tener en cuenta.

La identificación del amino-BZN mediante cromatografía asociada a una detección mediante espectrometría de masas en las soluciones electrolizadas, permitieron demostrar de todos modos, que la reducción es factible desde el punto de vista químico y termodinámico.

5.1.3. SOBRE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS Y SU APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE FÁRMACOS

¹²⁸ Trochine A.,Creek D.J. Benzimidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics.Plos 2014

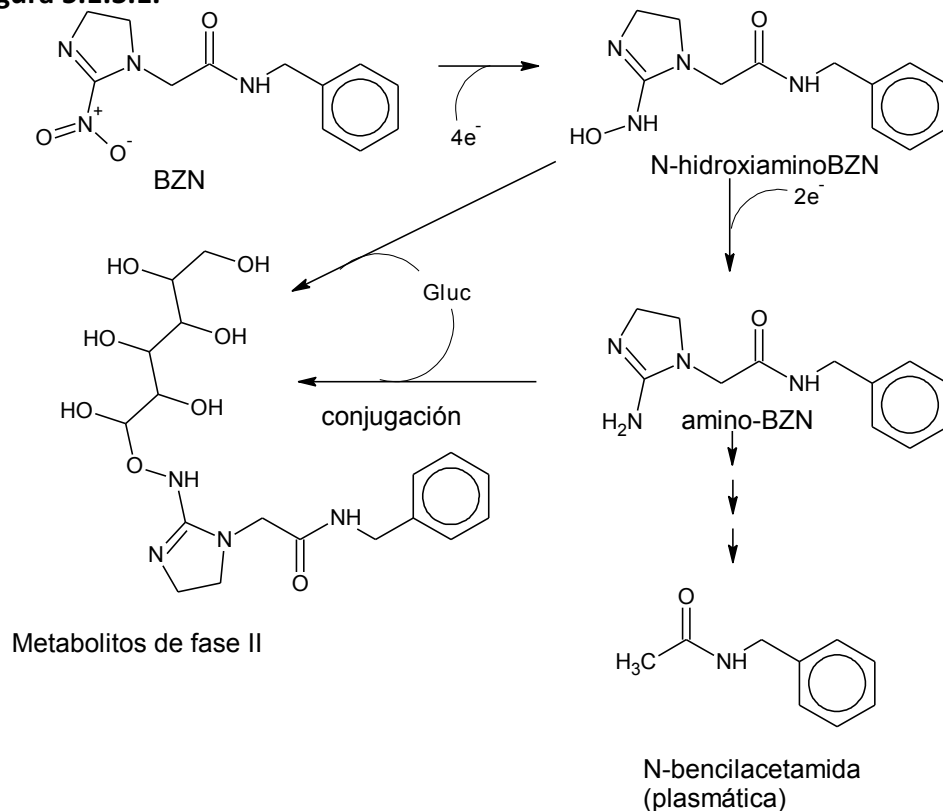
El metabolismo de xenobióticos comúnmente procede a través de una secuencia de pasos. Una estrategia habitual del organismo es la de mejorar la solubilidad en agua de compuestos lipofílicos mediante la unión de estructuras hidrofílicas como el ácido glucurónico, el glutatión o el sulfato.

Este paso de conjugación requiere la presencia de un grupo funcional adecuado en la molécula que generalmente es introducido o desprotegido a través de uno o más pasos. En el modelo clásico del metabolismo de xenobióticos, esta funcionalización se adjudica a lo que se denomina fase I, mientras que la conjugación se asocia a la denominada fase II. Dependiendo de la naturaleza del grupo funcional introducido, estos grupos pueden ser clasificados por ser electrofílicos o nucleofílicos. Fracciones nucleofílicas importantes son los grupos alcohólicos o fenólicos, las funciones amino y sulfhidrilo o los grupos carboxílicos.

Dependiendo de su reactividad química individual, los electrofílicos pueden significar un potencial efecto citotóxico y/o mutagénico dependiendo de su habilidad para reaccionar con compuestos ricos en electrones, en particular con proteínas, ARN y ADN. En contraste, los metabolitos nucleofílicos usualmente no atacan macromoléculas endógenas mediante interacción covalente y por consiguiente son en general menos peligrosos. Sin embargo, son por lo general los determinantes de la actividad biológica de un compuesto determinado. Los efectos tóxicos agudos dados por un xenobiótico y/o sus metabolitos pueden depender de la existencia de un grupo nucleófilo en sus respectivas moléculas.

Las reacciones de conjugación usualmente determinan ya sea el potencial de un electrofílo para reaccionar con proteínas y ADN o la habilidad de un nucleófilo para interaccionar con un receptor biológico dado. Al mismo tiempo, en la mayoría de las veces, estas reacciones incrementan fuertemente la solubilidad del compuesto en agua. Esta es la explicación de por qué las reacciones de conjugación pueden ser consideradas como uno de los más importantes pasos de detoxificación en el metabolismo de xenobóticos.

Figura 5.1.3.1.



Ensayos con las enzimas β -glucuronidasa y aril-sulfatasa, podrían darnos información inicial respecto de la presencia de metabolitos de fase II del BZN en muestras de orina humanas. Ambas enzimas convierten metabolitos de fase II (xenobióticos conjugados con ácido glucurónico o sulfatos) nuevamente en sus respectivos metabolitos de fase I. En este sentido, la identificación de ambos compuestos únicamente en aquellos extractos que fueron tratados con alguna de estas dos enzimas, nos plantea la posibilidad de proponer que el N-hidroxi-amino BNZ y el aminoBNZ podrían ser eliminados en la orina de manera glucuronizada. En busca de corroborar estas afirmaciones, se pueden plantear estudios a futuro con el fin de buscar y/o detectar estos compuestos glucuronizados en muestras de orina de 24 hs.

En la **Figura 5.1.3.1** se propone un flujo de reacciones desde el BNZ hasta la formación de estos compuestos presentados de manera esquemática. El BZN se reduce a N-hidroxi-aminoBNZ para luego reducirse aún más formando el amino-BNZ, que luego mediante una ruta de clivaje podría formar el metabolito NBAA hallado en plasma.

También, se presentan caminos alternativos que proponen la glucuronización para su eliminación urinaria.

5.1.4. CONSIDERACIONES FARMACOLÓGICAS Y TOXICOLÓGICAS

Las hipótesis actuales que intentan explicar la toxicidad de nitro compuestos en parásitos (actividad tripanocida) y en mamíferos (ADRs), plantean que se requiere de una reducción enzimática del grupo nitro y de la generación de intermediarios reactivos. Los compuestos nitro heterocíclicos generalmente atúan como pro-drogas y deben someterse a activación para mediar sus efectos citotóxicos.¹⁰⁷

Así mismo, ha sido sugerido que las concentraciones plasmáticas de BZN no parecen estar relacionadas con ADRs serias en pacientes adultos chagásicos.¹²⁹ Este hecho, sugiere fuertemente el rol asociado de los metabolitos circulantes del BNZ en la toxicidad a dosis terapéuticas. Sería posible asignar un rol significativo a la NBAA circulante en rango de concentraciones similares al BZN respecto de la actividad tripanomicida y/o a los efectos tóxicos en mamíferos comúnmente observados en pacientes pediátricos bajo tratamiento con BNZ. Existen registros antiguos sobre la toxicidad de la NBAA en ratones, que indicarían efectos de comportamiento narcótico en animales a dosis cercanas a LD50 en torno a los 550 mg/kg.¹³⁰

En el proceso de identificar algún metabolito del BZN, se seleccionaron las muestras de plasma en estado estacionario para estudios de MS/MS ya que éstas mostraron un complejo perfil cromatográfico HPLC-UV contrastante y cualitativamente diferente respecto de las muestras de plasma al comienzo del tratamiento.

Por otro lado, observaciones en un sentido cuantitativo de los perfiles cromatográficos hallados para los distintos extractos de orina, muestran una clara predominancia en la eliminación del BNZ como droga madre comparado con el resto de los picos analizados entre ellos, aquellos que resultaron ser derivados estructuralmente del BNZ. Estos resultados de ser confirmados, podrían sugerir la necesidad de ajuste de las dosis de BNZ plateadas en la terapéutica. Si tomamos las hipótesis de que el mecanismo tripanomicida viene dado luego de la transformación de dicho compuesto en su metabolito derivado activo, la fracción de droga sin modificar que es eliminada en la orina,

¹²⁹ Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J (2013) Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 57:390–395

¹³⁰ Arousseau M (1960) Etude comparative de quelques proprietes pharmacodynamiques et physicochimiques de deux derive's thiopheniques le phenylacetamide et le phenylurethane du glicol et de leurs isosteres benzeniques. *Arch Int Pharmacodyn* 127:220–247.

no estaría jugando un rol importante en los mecanismos farmacológicos y si podría ser un factor toxicológico que predisponga el desencadenamiento de eventos adversos (ADRs).

5.2. NFX

5.2.1. CONSIDERACIONES CLÍNICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS DESARROLLOS ANALÍTICOS EN LAS MATRICES BIOLÓGICAS ESTUDIADAS

5.2.1.1. PLASMA

Los desarrollos en esta matriz, si bien desde el punto de vista analítico podrían ser optimizados, a los fines clínicos y farmacológicos resultaron eficientes y reproducibles. Como ha sido presentado en el **Capítulo III**, contemporáneamente con la realización de esta tesis se desarrolló un método novedosos y analíticamente más sensible para la cuantificación de NFX,¹⁰¹ pero su aplicación no era posible desde el punto de vista clínico y del laboratorio analítico. En este método se requiere el uso de volúmenes de 5 mL, en tanto que los volúmenes de muestra recolectados de pacientes estuvieron entorno a 1 mL. Como pretratamiento, presenta una etapa de extracción mediante líquidos iónicos, que si bien genera buenos resultados en cuanto a su grado de recuperación, éstos compuestos no son de uso habitual en el laboratorio. Se requiere de conocimientos específicos para su síntesis y la opción de comprarlos convierte la técnica en muy costosa, siendo inadecuada en este sentido, la incorporación de esta técnica para empleo en el monitoreo terapéutico de fármacos. Estas fueron algunas de las razones por las cuales se avanzó en el desarrollo de un nuevo de método.

Los ensayos se centraron por un lado en el uso de no más de 1 mL de muestra y se evaluaron distintas etapas de concentración en la extracción. La técnica finalmente propuesta propone un factor de concentración 4 veces superior a la concentración en la muestra original. Sin embargo, los resultados de los dosajes de muestras de pacientes bajo tratamiento con NFX, mostraron que un número importante de pacientes presentaban concentraciones por debajo del LOD. En los estudios de farmacocinética, es un criterio comunmente aceptado que los valores que se encuentren por debajo del LOQ, pero por encima del LOD, sean considerados en la práctica con un valor igual al promedio entre los dos límites, de manera que no se pierden como dato en el cálculo de los parámetros farmacocinéticos. En este caso, para el conjunto de valores hallados en pacientes, una proporción significativa de los resultados pueden incorporarse entonces en las consideraciones farmacométricas.

Esto, si bien nos plantea la necesidad analítica de ampliación del rango lineal a concentraciones más bajas de la droga, desde el punto de vista clínico nos provee de un resultado suficiente. Por un lado, los resultados nos permiten plantear que en promedio las concentraciones halladas no presentarían un riesgo clínico de sobredosificación y por el otro, no se hallaron interferencias cromatográficas que pudieran corresponder a metabolitos del NFX.

5.2.1.2. DOSAJES DE NFX EN LECHE MATERNA

En el caso de los desarrollos para la leche materna con NFX, la discusión respecto de la complejidad de la matriz y la necesidad clínica de evaluar el riesgo de exposición al lactante de altas concentraciones del fármaco, es la misma que la presentada para el BZN. En la evolución del desarrollo de la técnica se probaron distintas etapas y metodologías que si bien lograron superar dificultades cromatográficas respecto de la resolución del pico para NFX, la cuantificación del mismo presentó inconvenientes. Tomando como punto de partida la metodología propuesta para la extracción de BZN en leche materna, se trabajó en la búsqueda de una variante adecuada para las necesidades analíticas del NFX en dicha matriz.

La técnica finalmente propuesta planteó una etapa de sobreagregado basal (constante) del analito para todos los niveles de concentración, con el fin de aumentar la sensibilidad del método y generar una dilución de la matriz original que ocasionaba complicaciones en la resolución cromatográfica del pico para NFX. En el mismo sentido que lo discutido para los desarrollos de NFX en plasma, la necesidad de resolver o aportar resultados para una problemática clínica específica, propuso un compromiso entre la búsqueda de un método analíticamente aceptable y clínicamente aplicable.

Los resultados hallados para las muestras de leche materna de madres bajo terapéutica con NFX, muestran que el rango lineal plateado es aceptable en términos de la evaluación del riesgo de exposición al lactante de altas concentraciones de NFX a través de la leche. Si bien el método desde el punto de vista analítico podría ser optimizado con el fin de obtener un rango lineal que aumente la sensibilidad, las bajas concentraciones halladas están en consonancia con los resultados hallados en plasma, despejando incertidumbres clínicas respecto de las concentraciones generadas por las dosis en uso.

A partir de estos desarrollos y los resultados encontrados en los dosajes de NFX realizados, proponemos la necesidad de confirmar mediante modelos farmacocinéticos los parámetros teóricos que han sido a modo exploratorio evaluados experimentalmente

en esta tesis.¹³¹ Resumiendo, por un lado creemos que los resultados plateados pueden aportar herramientas en las evaluaciones de riesgo / beneficio y por el otro entendemos que la cantidad de muestras experimentalmente evaluada no es concluyente desde el punto de vista farmacocinético poblacional.

Por último, una gran cantidad de información ha sido recolectada en la última década como sustento respecto de la efectividad y seguridad del NFX en el tratamiento de la tripanosomiasis Africana (Enfermedad del Sueño), en este sentido, se espera que nuestros hallazgos también sean aplicables para esta enfermedad igualmente devastadora.¹³²

5.3 SÍNTESIS DE LAS HERRAMIENTAS FARMACOMÉTRICAS DESARROLLADAS

En síntesis, las cifras de mérito para los métodos desarrollados en BZN y NFX, los resultados analizados de muestras bajo tratamiento y los criterios clínicos que debíamos abordar desde el laboratorio analítico, arrojaron resultados más que aceptables. **Tabla 5.3.1 y 5.3.2.**

Tabla 5.3.1. Parámetros analizados en los métodos desarrollados para BZN

| Rango de Valores | Plasma | Orina | Leche |
|---------------------------------|---|------------------------------------|--------------------------|
| Exactitud % | (-0,88 ; 1,27) | (-3,17 ; 1,79) | (-4,11 ; 3,48) |
| Precisión % | (3,51 ; 5,70) | (0,96 ; 1,40) | (1,8 ; 1,9) |
| LOD | (0,16 – 0,20) µg/mL | (2,20 – 3,06) µg/mL | (0,27 – 0,54) µg/mL |
| LOQ | (0,45 ; 0,56) µg/mL | (6,01 ; 8,57) µg/mL | (0,73 ; 1,48) µg/mL |
| Rango Lineal | (LOQ ; 18,10) µg/mL | (LOQ ; 45,00) µg/mL | (LOQ ; 15,0) µg/mL |
| Selectividad | Sin interferencias por metabolitos | | |
| Tiempo de preanálisis | 20 minutos | 15 minutos | 30 minutos |
| Tiempo de análisis instrumental | 9 minutos | 7 minutos | 7 minutos |
| Eco-compatibilidad | Sin solventes clorados ni cancerígenos. | Uso mínimo de solventes orgánicos. | Sin solventes orgánicos. |

¹³¹ Garcia-Bournissen F. et al. Is use of nifurtimox for the treatment of Chagas disease compatible with breast feeding? A population pharmacokinetics analysis. *Arch Dis Child* 2010;95:224–228

¹³² Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, et al. Nifurtimox-efl ornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 2009;374:56–64

Tabla 5.3.1. Parámetros analizados de los métodos desarrollados para NFX

| Rango de Valores | Plasma | Leche |
|---------------------------------|---|--------------------------|
| Exactitud % | (-2,08 ; 1,91) | (-3,02 ; 5,01) |
| Precisión % | (1,34 ; 5,39) | (1,84 ; 2,64) |
| LOD | (0,62 ; 0,71) µg/mL | (1,03; 1,28) µg/mL |
| LOQ | (1,70 ; 1,93) µg/mL | (2,80 ; 3,49) µg/mL |
| Rango Lineal | (LOQ ; 12,05) µg/mL | (LOQ ; 11,25) µg/mL |
| Selectividad | Sin interferencias por metabolitos | |
| Tiempo de preanálisis | 35 minutos | 30 minutos |
| Tiempo de análisis instrumental | 10 minutos | 7 minutos |
| Eco-compatibilidad | Sin solventes clorados ni cancerígenos. | Sin solventes orgánicos. |

5.4. APORTES PARA LAS TERAPÉUTICAS VIGENTES EN PEDIATRÍA

En esta sección se evalúa el desempeño de las técnicas desarrolladas en su aporte a la resolución de las vacancias existentes para el desarrollo de estudios en pediatría. Se proponen consideraciones clínicas que se desprenden de los estudios abordados y su posible aplicación en la modificación de las terapéuticas vigentes.

Los tres problemas básicos asociados a las actuales terapéuticas con los fármacos antichagásicos en uso, se pueden resumir en:

- ✓ la búsqueda de procedimientos con mayores tasas de curación
- ✓ el abordaje del paciente en la etapa crónica de la enfermedad
- ✓ el control y manejo del paciente para una menor incidencia de efectos adversos

En un estudio con BZN presentado por nuestro grupo,¹³³ se describió una tasa de curación elevada en pacientes pediátricos, con una incidencia de eventos adversos relativamente baja, a diferencia de lo reportado en adultos. Un hallazgo interesante fue que la incidencia de eventos adversos se incrementa significativamente a partir de los 7 años de edad, acercándose rápidamente a lo reportado en adultos. En concordancia, también se han encontrado concentraciones plasmáticas de BNZ significativamente menores en los pacientes pediátricos, comparadas con los mayores de esta edad y los adultos. De esto se induce que la eliminación de BNZ sería significativamente mayor en niños menores de 7 años. Los resultados aportados en esta tesis corroborarían en este caso también las hipótesis existentes.

Asimismo, insistimos, los resultados presentados permitirían confirmar modelos teóricos, que sugieren que es altamente improbable que el pasaje a la leche materna de

¹³³ Altchek J. et al. Effectiveness of benznidazole in the treatment of pediatric chagas disease inspite of lower plasma concentrations than adults. A population pharmacokinetics study. 30th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Greece, May 2012

los antichagásicos sea significativo, por lo que no es esperable la aparición de eventos adversos en los bebés amamantados. Sumado a lo expuesto, los innegables beneficios de la leche materna hacen que la alternativa de suspender la lactancia durante el tratamiento del Chagas no sea una opción aceptable en la mayoría de los casos.

En el mismo sentido de aportar información que posibilite mejoras en la terapéutica, es que consideramos estas temáticas de suma importancia para las políticas de salud pública en general y para implementar programas nacionales de monitoreo terapéutico de fármacos en particular. Es necesario contar con personal técnico-profesional entrenado y capacitado para el dosaje de fármacos en matrices biológicas de interés clínico y de manera particular en el área pediátrica mediante técnicas por HPLC. Consideramos como estratégico la formación e investigación por parte de profesionales que se desenvuelven en áreas de la salud pública. Actualmente se insumen muchos recursos públicos en la adquisición de “kits” inmunofarmacométricos que si bien son de aplicación directa, su uso está limitado a lo estrictamente establecido por el fabricante.

Agravando esta situación, no existen “kits” inmunofarmacométricos aplicables a la terapéutica de enfermedades olvidadas. Las técnicas por HPLC son superiores por ser versátiles y aplicables a la gran mayoría de fármacos y drogas de interés en salud pública. Y aunque el recurso humano asociado al dosaje por HPLC requiere de un entrenamiento algo más complejo, sin duda aporta de manera más completa en la problemática farmacométrica presente en la atención primaria e intrahospitalaria. El desarrollo de técnicas de laboratorio que permitan el dosaje de fármacos en matrices no tradicionales como las analizadas y desarrolladas aquí, permiten dotar de herramientas necesarias para el monitoreo terapéutico de estas drogas, generar marcadores farmacométricos tempranos de eventos adversos a la terapéutica, como así también son la base analítica necesaria para estudios clínicos.

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Se desarrollaron métodos HPLC-UV para la cuantificación de BNZ y NFX con parámetros analíticos satisfactorios para los criterios clínicos propuestos en las matrices biológicas plasma, orina y leche materna. El pretratamiento de laboratorio de muestras involucran pasos simples y suficientemente rápidos. Estas metodologías resultaron ser adecuadas para el análisis de muestras en dichas matrices biológicas aplicadas a estudios clínicos pediátricos.^{134,135}
- ✓ Los estudios de POPPK realizados en el contexto de esta tesis son concluyentes respecto de las concentraciones de BZN observadas. Estas concentraciones en la población pediátrica fueron marcadamente más bajas que las reportadas en adultos (tratados con dosis comparables en mg/kg de peso por dosis). Sin embargo, a pesar de estas concentraciones bajas, el tratamiento fue efectivo y bien tolerado, con escasa presencia de ADRs, una diferencia importante respecto de su correlato en adultos. Los resultados presentados, de ser confirmados podrían sugerir modificaciones en las dosis de adultos, hecho que podría ser muy beneficioso desde el punto de vista de la terapéutica.¹³⁶
- ✓ Entendemos de suma importancia para las políticas de salud pública en general y respecto de la implementación de programas nacionales de monitoreo terapéutico de fármacos en particular, el hecho de poder contar con personal técnico-profesional entrenado y capacitado para el dosaje de fármacos en matrices biológicas de interés clínico y de manera particular en el área pediátrica mediante técnicas por HPLC. En este sentido, consideramos como estratégico la formación e investigación por parte de profesionales que se desenvuelven en áreas de la salud pública.
- ✓ Los niños con Enfermedad de Chagas han sido dejados de lado en el desarrollo de medicamentos apropiados para esta parasitosis, y consecuentemente despojados injustamente de su derecho a medicamentos seguros y apropiados para la edad. Por lo tanto no tienen acceso a opciones terapéuticas correctamente evaluadas para una enfermedad que de otra manera, es perfectamente curable si se trata en la infancia. Esta población pediátrica, en general de bajos recursos, se encuentra entonces doblemente relegada. Primero por carecer de recursos o información

¹³⁴ Marson ME, Padró JM, Altchek J, García-Bournissen F, Reta M, Mastrantonio G. A simple and efficient HPLC method for benznidazole in human breast milk. *Therapeutic Drug Monitoring*. (2013) 35: 522-526.

¹³⁵ Marson ME, Dana DD, Altchek J, García-Bournissen F, Mastrantonio G. Development of UV/HPLC methods for quantitative analysis of benznidazole in human plasma and urine for application in pediatric clinical studies. *J Clin Lab Anal* 27:384–390; 2013.

¹³⁶ Altchek J, Moscatelli G, Mastrantonio G, et al. Pediatric clinical pharmacology population pharmacokinetics study of benznidazole in children with Chagas disease. *Basic Clin Pharmacol Tox* 2010;107(Suppl. 1):162–692

para prevenir la enfermedad y segundo, por no disponer de medicamentos que hayan sido correctamente evaluados para su uso sobre todo en niños.

- ✓ La evaluación de la transferencia de los medicamentos antichagásicos a la leche materna es un paso indispensable para permitir la generalización del tratamiento del Chagas a las mujeres jóvenes lactantes que podrían no presentarse a la consulta médica en otro momento. La continuación de la lactancia, podría justificarse por la seguridad de dichos fármacos en la infancia, incluyendo el período neonatal, como ha sido demostrado por estudios de nuestro grupo^{55,137,138} y otros.¹³⁹
- ✓ Como parte de las conclusiones de este trabajo, proponemos que no se discontinúe el tratamiento farmacológico de la Enfermedad de Chagas con BZN y NFX en madres que amamantan. Sumado a esto, también en función de los resultados, planteamos que no existirían evidencias de eventos de concentración del fármaco por parte de la glándula mamaria. Sin embargo, estas conclusiones son en cierto punto preliminares y requieren de estudios de mayor profundidad.¹³¹
- ✓ Derivado de lo anterior, el BNZ era considerado hasta hace poco tiempo un medicamento de riesgo leve o poco probable. En enero de 2014 se modificó a riesgo bajo y las conclusiones que surgen de este trabajo fueron parte relevante de las evidencias que generaron dicha modificación.¹⁴⁰ Así mismo, las evidencias aquí presentadas fueron tomadas en otros países de nuestro continente, con el propósito indicar la lactancia materna durante el tratamiento antichagásico de la madre.^{141,142}

6.2. HIPÓTESIS DERIVADAS DE LOS ESTUDIOS

- ✓ Se han identificado por primera vez en muestras reales de pacientes bajo terapéutica 3 metabolitos del BZN, dos de ellos propuestos como producto del metabolismo y eliminados mediante el sistema urinario (amino-BZN y N-hidoxi amino-BZN). El tercer metabolito hallado sería un metabolito plasmático producto

¹³⁷ Freilij, H. & Altchek, J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.* 21, 551-555 (1995)

¹³⁸ García-Bournissen F, Moroni S, Marson ME. et al. Limited infant exposure to benznidazole through breast milk during maternal treatment for Chagas disease. *Arch Dis Child* (2014);0:1–5.

¹³⁹ de Andrade, A.L. et al. Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348, 1407-1413 (1996)

¹⁴⁰ Rossato N. Drogas y Lactancia. Un conflicto frecuente. *Arch Argent Pediatr* 2015; 113(1): 4-5

¹⁴¹ En base a los resultados presentados en este trabajo, Médicos Sin Fronteras en Paraguay, comenzó el tratamiento con BNZ en mujeres en periodo de lactancia. No han sido reportados ADRs en niños, derivados de esta práctica.

¹⁴² Vela Baherna L.E. et al. Tratamiento posparto en una paciente con Enfermedad de Chagas sin interrupción de la lactancia. *Ginecol Obstet Mex* 2015; 83:487-493

del clivaje de BNZ o de algún otro metabolito precursor, identificado como (N-bencilacetamida).¹⁴³ La posibilidad de contar con droga patrón sintetizada de este último con un grado de pureza adecuado, permite proponer la utilización del mismo en estudios comparativos de muestras donde se busque éste u otros metabolitos.

- ✓ Las reacciones de N-glucuronización son un ejemplo de reacciones de fase II en las que el objetivo que se persigue es el aumento de la poliaridad de las moléculas intervinientes con el fin de facilitar su eliminación por vía urinaria. Presentamos evidencia fuerte que propone que los metabolitos urinarios identificados pudieran ser eliminados en la orina como N-glucurónidos.
- ✓ Observaciones en un sentido cuantitativo de los perfiles cromatográficos hallados para los distintos extractos de orina, muestran una clara predominancia en la eliminación del BNZ como droga madre comparado con el resto de los picos analizados que resultaron ser derivados de BNZ. Podríamos proponer la consideración de estudios a dosis terapéuticas menores, además de corroborar la diferencia existente entre el metabolismo aumentado de esta droga en niños comparado con adultos a dosis análogas/kg de peso.

6.3. APORTE PARA EL ABORDAJE RACIONAL DE LA TERAPÉUTICA DEL CHAGAS PEDIÁTRICO.

- ✓ El acceso a BNZ ha sido errático durante años y sólo recientemente la industria farmacéutica en conjunto con el estado nacional se ha comprometido a producir y distribuir estos medicamentos en forma constante o a transferir la tecnología para la producción de la droga a una tercera parte interesada en fabricarla (LAFEPE, Pernambuco, Brasil y Laboratorios Elea, Argentina, en el caso de BNZ). Sin embargo, todavía existen obstáculos significativos para que estas promesas permitan la disponibilidad universal, predecible y confiable de estos fármacos. Parte de esta dificultad deriva del escaso conocimiento farmacológico que hay respecto de estas drogas, que aporta en el escenario de descompromiso por parte de las empresas farmacéuticas.
- ✓ Como consecuencia del déficit de información descripto, la OMS ha declarado el estudio de la farmacocinética del BNZ en niños como una prioridad de investigación.¹⁴⁴ Sin embargo, muy pocos estudios han sido llevados adelante en respuesta a esta prioridad, debido en gran medida a las numerosas dificultades inherentes a la investigación en niños, incluyendo la ausencia casi absoluta de subsidios para estudios farmacológicos en Chagas pediátrico.
- ✓ Por su naturaleza, las conclusiones parciales y finales de los estudios enmarcados en esta tesis, podrían implicar la rápida generación de propuestas para el

¹⁴³ M.E.Marson, G.Moscatelli, S.Moroni, J.Altchek, F.García-Bournissen, G.E.Mastrantonio. Identification of N-benzylacetamide as a major component of human plasmatic metabolic profiling of benznidazole. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* (2014); doi 10.1007/s13318-014-0195-8.

¹⁴⁴ WHO Report of the Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2005. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Geneva (2002).

mejoramiento de los protocolos de tratamiento de Chagas pediátrico. En este sentido, el Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños “Ricardo Gutiérrez”, es un centro de referencia (Resolución 1514/2001 Min. de Salud, GCBA) con vasta experiencia en el estudio y tratamiento de la Enfermedad de Chagas pediátrico de reconocimiento mundial. La colaboración estrecha con la componente del laboratorio bioanalítico, aportada por este trabajo, propicia la generación de resultados de gran interés para la práctica clínica.

7. ANEXOS

7.1. COMPUESTOS, REACTIVOS Y SUS ABREVIATURAS O FORMULA MOLECULAR

Para el desarrollo de los trabajos experimentales se utilizaron drogas sólidas, solventes orgánicos e inorgánicos y consumibles analíticos a saber:

DROGAS Y REACTIVOS:

- ✓ benznidazol (BZN), como principio activo de Radanil® (Hoffman la Roche)
- ✓ nifurtimox (NFX), como principio activo de Lampit® (Laboratorios Bayer)
- ✓ acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) p.a.
- ✓ ácido metafosfórico (HPO_3) p.a.
- ✓ ácido tricloro acético (TCA, $\text{C}_2\text{H}_1\text{O}_2\text{Cl}_3$) p.a.
- ✓ ácido trifluoro acético (TFA, $\text{C}_2\text{H}_1\text{O}_2\text{F}_3$) p.a.
- ✓ bencilamina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$) p.a.
- ✓ cloruro de acetilo (CH_3COOCl) p.a.
- ✓ cloruro de sodio (NaCl) p.a.
- ✓ fosfato de sodio (Na_3PO_4) p.a.
- ✓ glicina (Gly, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$) p.a.
- ✓ hidróxido de sodio (NaOH) p.a.
- ✓ octanosulfonato de sodio ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaO}_3\text{S}$) p.a.
- ✓ perclorato de litio (LiClO_4) p.a.
- ✓ perclorato de sodio (NaClO_4) p.a.
- ✓ perclorato tetraetilamonio (TEAP, $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{ClO}_4$) p.a.
- ✓ sílica gel
- ✓ sulfato de magnesio (MgSO_4) p.a.
- ✓ sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) p.a.
- ✓ nitrógeno (N_2)
- ✓ aire

SOLVENTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS:

- ✓ acetato de etilo (AE) p.a.
- ✓ acetonitrilo (AcN) calidad HPLC
- ✓ ácido clorhídrico (HCl) p.a.
- ✓ ácido fórmico (CHOOH) p.a.
- ✓ ácido fosfórico (H_3PO_4) p.a.
- ✓ cloroformo (CHCl_3) p.a.
- ✓ diclorometano (DCM) p.a.
- ✓ dimetilformamida (DMF) p.a.
- ✓ dimetilsulfoxido (DMSO) p.a.
- ✓ etanol (EtOH) p.a.
- ✓ éter de petróleo (EP) p.a.
- ✓ isoamilcarbinol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$) p.a.

- ✓ metanol (MeOH) calidad HPLC
- ✓ N-hexano p.a.

CONSUMIBLES

- ✓ columnas de extracción en fase sólida con relleno: C-18 estándar y C-18 encapadas. Sorbent type EEEEC18, octadecilsilano, encapadas. Tamaño relleno: 100 mg, 1 mL.
- ✓ tiras reactivas de pH
- ✓ enzimas: β -glucuronidasa recombinante proveniente de *Escherichia coli* BL21 y arilsulfatasa (con actividad β -glucuronidasa) proveniente de *Helix Pomatia* tipo HP-2
- ✓ placas para cromatografía líquida en capa fina (TLC)

INSTRUMENTAL

Los análisis de cromatografía líquida de alta performance fueron desarrollados mediante un HPLC Merck-Hitachi LC-6200A y Merck-Hitachi UV/Vis L-4250 detector (Japan). La integración de áreas de los picos se analizaron en una primera instancia mediante un Merck-Hitachi D-2500 Chromato-Integrator y luego se trabajó con un adquirente de datos electrónico WinPCChrom 30_XYReal, mediante CPU.

Los estudios de espectrometría de masas mediante (HPLC-MS/MS) se realizaron en cromatógrafo líquido Agilent 1200 RRLC con detector DAD en serie con un Bruker micrOTOF-QII con fuente de ionización electrospray (ESI), espectrómetro de alta resolución. Se trabajó en modo positivo. Para MS se utilizó gas seco a una temperatura de 200°C con un flujo de 7.0 l /min, con un nebulizador de gas a una presión de 3.5 Bar y un voltaje capilar de 150.0 V en modo full-scan en un rango de m/z de 50 a 800.

Los ensayos de síntesis electroquímica se realizaron en caja seca: DRI-Train HE-193-1, Vacuum /Atmosphere Corporation. Potenciostato: LYP M2, Generador de onda triangular: LYP, Adquirente digital WinPCChrom.

En el pretratamiento analítico de muestras para la extracción de los fármacos llevado a cabo en el laboratorio se utilizaron los siguientes instrumentos:

- ✓ rotavapor (Heidolph Laborata 4003 control)
- ✓ pHímetro
- ✓ centrifuga y microcentrifuga
- ✓ pipetas automáticas
- ✓ espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 11/Bio, UV/Vis Spectrometer)
- ✓ lámpara UV
- ✓ platinas
- ✓ baño calefactor

- ✓ sonicador
- ✓ vortex

7.2. TRATAMIENTO DE DATOS

Los cálculos estadísticos para establecer la validez de los parámetros obtenidos en los métodos desarrollado así como para establecer si la diferencia entre valores medios de varias muestras es significativa se llevaron a cabo por medio del test de análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software OriginPro8 para la realización de cálculos y gráficos. El análisis de la varianza parte de los conceptos de regresión lineal. Un análisis de la varianza permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren. El análisis de la varianza permite superar las limitaciones de hacer contrastes bilaterales por parejas que son un mal método para determinar si un conjunto de variables con $n > 2$ difieren entre sí.

Precisión, Exactitud y recta de calibración:

El término *precisión* describe la repetibilidad de resultados obtenidos en forma idéntica. Puede definirse como la concordancia entre los valores numéricos de dos o más mediciones que se obtuvieron en forma idéntica. La varianza, desviación estándar y desviación estándar relativa son estimaciones simples de la precisión de un análisis.

El término *exactitud* indica la proximidad de una medida a su valor aceptado como "verdadero", μ_0 . Vale aclarar la distinción fundamental entre precisión y exactitud: exactitud supone una comparación con un valor verdadero o aceptado como tal, mientras que la precisión indica la concordancia entre las medidas realizadas de la misma forma.

La exactitud se expresa en términos de error. El error absoluto, ϵ , de una medida es la diferencia entre el valor informado, x , y el valor verdadero μ_0 :

$$\epsilon = x - \mu_0$$

En el caso del error, el signo asociado con el error es tan importante como el valor. El error relativo y error relativo porcentual expresan una medida de exactitud más útil que el error absoluto. Se definen como

$$\epsilon\% = (x - \mu_0) / \mu_0 \times 100$$

En los cálculos de exactitud de las curvas de calibrado, se tomó como valor verdadero (μ_0) al promedio de las áreas obtenidas para un nivel de concentración en un

punto medio de la curva (es decir, el valor verdadero estaría determinado por los puntos que forman la recta de calibración).

La precisión se informó en base al coeficiente de variación % (CV%) de triplicados en un mismo nivel medio de concentración de la curva. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$CV = \frac{S_x}{\bar{X}} \cdot 100 \qquad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}} \qquad \bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Los parámetros encontrados de las curvas de calibrado analizados fueron los siguientes:

Para una recta de calibración $y = a + bx$; donde x = concentración del fármaco e y = área bajo la curva del pico cuantificado. La pendiente y ordenada al origen se calculan mediante las siguientes formulas:

$$b = \frac{\sum_i^n \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Los errores de estos parámetros se calculan a partir de la varianza de regresión, que estima los errores aleatorios en la dirección y .

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Y con la varianza de la regresión se estiman las desviaciones para la pendiente y la ordenada al origen:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i^n x_i^2}{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

S_a =desviación estándar de la ordenada al origen

S_b =desviación estándar de la pendiente

CVpendiente%= $S_b/b \times 100$

Para el cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método, se utiliza la definición según IUPAC tal que:

$$\text{LOD} = 3.3 S_a/b$$

$$\text{LOQ} = 9 S_a/b$$

En la evaluación de la recuperación de los métodos estudiados se trabajó con el concepto de porcentaje de recuperación (R%) de una muestra (matriz biológica) con una concentración final fija respecto de una solución patrón de igual concentración x 100. La relación se plantea en función de las áreas obtenidas instrumentalmente.

$$\mathbf{R \%} = \text{Área de cc fija en matriz biológica} / \text{Área de cc fija de patrón acuoso} \times 100$$

En los casos donde se evalúa la estabilidad en el tiempo de una muestra control de calidad (QC) analizada instrumentalmente, se define en este caso el R % como la cc hallada mediante la curva de calibrado respecto de la cc teórica en la muestra QC x 100.

$$\mathbf{R \%} = \text{cc mediante curva de calibrado} / \text{cc teórica de QC} \times 100$$

7.3. PROTOCOLOS, CONSENTIMIENTO INFORMADO Y AVALES

Los protocolos utilizados para los estudios clínicos en pacientes pediátricos y en madres que amamantan, los modelos de consentimientos informados para ambos estudios y los respectivos avales del Comité de Ética del HNRG se adjuntan en hoja aparte, a continuación.

Índice alfabético

14- α -metilesterol, **21**
2-nitroimidazol, **44**
6-hidroxidopamina, **34**
7,8-dihidroxiclorpromazina, **34**

A

α -tocoferol, **22, 34**
ácido ascórbico, **22, 33, 34**
ácidos nucleicos, **21, 33, 40, 45**
alanina, **21**
aldehído oxidasa, **37**
alopurinol, **31, 39**
alteraciones cardíacas, **3**
Amastigote, **11**
amfotericina B, **23**
aminopterina, **23**
años de vida ajustados por discapacidad, **3**
armadillo, **17**
arsenobenzoles, **23**
ascorbato reductasa, **22**

B

β -caroteno, **22, 34**
Banco Mundial, **3**
Bayer, **5, 6, 24**
benznidazol
 BNZ, **4, 30**
biotransformación reductiva
 metabolismo reductivo, **35**
Bolivia, **6, 17**
Brasil, **5, 6, 16, 17, 18**
butilhidroxianisol, **22**
butilhidroxitolueno, **22**

C

catalasa, **34, 39, 43**
catalasas, **12, 22, 39**
Cecilio Romaña, **7**

Ch

Chagas congénito, **25, 27, 28**
Chile, **16**

C

ciclo evolutivo, **10**

cinetoplasto, **9, 10, 11, 12**
cisteína, **32**
citocromo b5, **37**
citocromo P₄₅₀, **21, 35, 36, 37, 42**
citocromo P₄₅₀ reductasa, **35, 36, 37, 42**
cloruro de mercurio, **23**
compuestos arsenicales, **23, 24**
control prenatal, **25**
control sintomático, **25**
creatinina, **25**

D

defensas celulares, **34**
dehidroascorbato reductasa, **22**
detoxificación, **40**
dinitrobenceno, **38**

E

Elea, **5, 6**
electrocardiograma
 ECG, **25**
electroquímica, **2, 44, 45, 46, 47**
electrosíntesis, **47**
ELISA, **20**
Enfermedad de Chagas congénita, **16**
Epimastigote, **11**
ergosterol, **21, 22, 32**
eritrosedimentación, **25**
esfingomielina, **21**
espectroscopía de resonancia de spin electrónico
 ESR, **35**
Estados Unidos, **3**
estrés oxidativo, **1, 22, 32, 34**
eventos adversos, **29, 30, 48**

F

FAD, **38, 39**
farmacocinética, **29, 48**
farmacoterapéutica, **48**
fase aguda, **4, 8, 19, 20, 25, 28**
fenantridinas, **23**
ferredoxina, **38**
fibrosis, **33**
flavoenzimas, **35**
flavoproteínas, **37, 43**
fluconazol, **31, 32**
formas metacíclicas, **12**
fosfatidilcolina, **21**
fosfolípidos, **21, 41**

fructosa, **21**
fucsina, **23**

G

glioxal, **44**
glucosa, **21**
glutatión peroxidasa, **22**

H

Hemoaglutinación indirecta, **20**
hepatograma, **25**
hidroxilación, **38**
hidroxilamina, **36, 44**
hipoxantina, **31, 32**
hipoxantina-guaninafosforibosiltransferasa, **31**

I

inmunocomprometidos, **27**
Inmunoglobulinas G, **20**
itraconazol, **31, 32**

J

Japón, **15**

K

ketoconazol, **31, 32**

L

LAFEPE, **5, 6**
Lampit, **24**
Leishmania, **9, 21**
Listas Nacionales de Medicamentos Esenciales, **5**

M

menadiona, **38**
metabolismo oxidativo, **33**
metabolitos electrofílicos, **22**
metalflavoproteínas, **38**
metirapone, **42**
Miguel E. Jörg, **7**
miltefosina, **21**
mitocondrión, **11**

Herramientas farmacométricas para antichagásicos

molibdeno, **38**
monóxido de carbono, **37**
Musca domestica, **18**

N

NADH, **37**
NADPH, **35, 36, 37, 40, 42**
necrosis tisular, **33**
nifurtimox
 NFX, **4, 30, 42, 44**
nitrilo, **44**
nitrofuranos, **23, 24**
nitrofurazona, **23**
nitrorreductasas, **35**

O

Organización Mundial de la Salud, **4, 17, 23**
Organización Panamericana de la Salud, **4, 17**
Oswaldo Cruz, **7, 13, 15, 16, 17, 18, 23, 30, 31**
oxígeno singulete, **43**

P

PCR, **20, 27**
peroxisoma, **12**
p-hidroximercuribenzoato, **42**
pirazolpirimidinas, **21**
polisacáridos, **21, 40**
Programas de Control Vectorial, **5**
purina, **21**

Q

quinoleína, **23**
quinonas, **33, 38**

R

Radanil, **24**
radical hidronitróxido, **36**
radicales libres, **33, 34, 36, 41**
radiosensibilizadores, **44, 45**
Roche, **6, 24**

S

sales de oro, **23**

Salvador Mazza, **7**
selenio, **39**
semiquinona, **34**
Signo de Romaña, **7**
stilomicina, **23**

superóxido dismutasa, **22, 34**

T

Tierra del Fuego, **3, 15**
transmisión por trasplante, **16**
transmisión vectorial, **4, 8, 16**
trasplante cardíaco, **31**
tratamiento antiparasitario, **25**
triazoles, **21**
tripanosomiasis humana, **3**
tripanotona, **22**
Tripomastigote, **11**

U

urea, **25**

V

Venezuela, **16, 17, 18**
VIH, **28**
violeta de genciana, **16, 23**
vitamina C, **39**

X

xantino-deshidrogenasa, **38**
xantino-oxidasa, **38**
xantino-oxidorreductasa, **37**

Y

yoduro de sodio, **23**



HOSPITAL GENERAL DE NIÑOS

Dr. RICARDO GUTIERREZ FUNDADO EN 1875.

ASOCIADO A LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
COMITÉ DE DOCENCIA E INVESTIGACION

Buenos Aires, 2 de Mayo de 2011

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
Servicio de Parasitología
Jefe del servicio de Parasitología
Dr Jaime Altchek

S/D

De mi consideración:

En referencia al protocolo de investigación "**Estudio de transferencia de medicamentos antichagásicos a la leche materna**", el cual se ha presentado a este Comité, los mismos han sido evaluados y aprobados por el Comité de Docencia e Investigación para ser llevado a cabo en el Hospital bajo su supervisión. Se extiende la presente aprobación. El mismo cumple con las condiciones técnicas y éticas requeridas y se enmarca dentro de las normas de Buenas Prácticas Clínicas (GCPs).

Sin otro particular quedo a su disposición y la saludo atentamente

Dra. Christian Elias Costa
Secretaria Científica
Comité de Docencia e Investigación

HOSPITAL DE NIÑOS "RICARDO GUTIÉRREZ"
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Gallo 1330 Ciudad Autónoma de Buenos Aires- Argentina
Tel. directo 4962- 2946
www.guti.gov.ar/bioetica - comite.bioetica.guti@gmail.com

Buenos Aires, 22 de junio de 2011

Resolución del Comité de Ética en Investigación, sobre: proyecto nuevo; información y consentimiento informado y/o aviso de reclutamiento.

Título Protocolo: *"Estudio de transferencia de medicamentos antichagásicos a la leche materna"*

Investigador Principal: Dr. Jaime Altcheh
Servicio de Parasitología y Chagas
Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", CABA

Documentos revisados:

- Protocolo de Investigación Versión 1.1 – 02/06/2011
- Consentimiento Informado Versión 1.1 – 02/06/2011

.....


Estimado Dr. Jaime Altcheh
Servicio de Parasitología y Chagas
Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"
S/D

De nuestra consideración,

Luego de haber revisado los documentos arriba mencionados, el Comité de Ética en Investigación se dirige a ud a fin de informarle que el Comité ha decidido por unanimidad, en la reunión del día de la fecha, aprobar la documentación consignada , ya que no presenta reparos éticos y cumple con las normas nacionales e internacionales que rigen la investigación con seres humanos.

Saludamos a ud atte,

COMITÉ de ÉTICA
en INVESTIGACIÓN
HOSPITAL de NIÑOS
"RICARDO GUTIÉRREZ"


Dra. PATRICIA CARDOSO
PEDIATRA - TOXICÓLOGA
M.N. 73.247

**HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO GUTIERREZ
COMITE DE BIOETICA**

Gallo 1330
Buenos Aires- Argentina

Tel. directo 4962- 2946
Conmutador: 4962-9212/9239 int.282/258



Buenos Aires, 14 de septiembre de 2006

Dr. Jaime Altcheh
Servicio de Parasitología y Chagas,
Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez
S / D

De nuestra consideración,

Nos dirigimos a Ud , en referencia al protocolo de investigación “Estudio de la farmacocinética poblacional de benznidazol en niños con enfermedad de chagas”, para informarle que en el día de la fecha el Comité de Bioética ha aprobado para su realización en este Hospital:

- El protocolo “Estudio de farmacocinética poblacional de benznidazol en niños con enfermedad de chagas” (versión 2.0)
- Consentimiento (versión 2.0)
- Asentimiento (versión 2.0)

Saludamos a ud. atte.,

Dra. MARIA MADEL GARRA
FARMACÉUTICA
M.N. 10518

DR. MIGUEL DEL VALLE
M.N. 44672

COMITE de BIOETICA
HOSPITAL de NIÑOS
RICARDO GUTIERREZ

**HOSPITAL DE NIÑOS RICARDO GUTIERREZ
COMITE DE BIOETICA**

Gallo 1330
Buenos Aires- Argentina

Tel. directo 4962- 2946
Conmutador: 4962-9212/9239 int.282/258



Buenos Aires, 14 de septiembre de 2006

Dr. Jaime Altcheh
Servicio de Parasitología y Chagas,
Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez
S / D

De nuestra consideración,

Nos dirigimos a Ud , en referencia al protocolo de investigación “Estudio de la farmacocinética poblacional de benznidazol en niños con enfermedad de chagas”, para informarle que en el día de la fecha el Comité de Bioética ha aprobado para su realización en este Hospital:

- El protocolo “Estudio de farmacocinética poblacional de benznidazol en niños con enfermedad de chagas” (versión 2.0)
- Consentimiento (versión 2.0)
- Asentimiento (versión 2.0)

Saludamos a ud. atte.,

Dra. MARIA MABEL GARRA
FARMACEUTICA
M.N. 10618

DR. MIGUEL DEL VALLE
M.N. 10618

COMITE de BIOETICA
HOSPITAL de NIÑOS
RICARDO GUTIERREZ

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Version 1.0 – 27/04/2011

HOJA DE INFORMACION PARA LAS PACIENTES

Título del estudio

ESTUDIO DE TRANSFERENCIA DE MEDICAMENTOS ANTICHAGASICOS A LA LECHE MATERNA

Investigadores

Dr Jaime Altcheh,

Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Introducción

El presente formulario de consentimiento describe un estudio en mujeres lactantes con enfermedad de Chagas, que reciban el tratamiento para la enfermedad con los medicamentos nifurtimox o benznidazol (las drogas aprobadas por el Ministerio de Salud para el tratamiento de la enfermedad); así como los riesgos y beneficios de participar en el mismo. Es necesario que Ud. lea este formulario de consentimiento detenidamente y efectúe todas las preguntas que quiera a la persona que se lo presente, antes de decidir su participación.

Objetivo

El servicio de Parasitología y Chagas del Hospital de Niños de la Ciudad de Buenos Aires está llevando a cabo un estudio para medir el pasaje de los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (benznidazol y nifurtimox) desde la sangre a la leche materna. Este estudio intenta confirmar que es poca la cantidad de medicamento que pasa a la leche materna, por lo que no representaría un riesgo para los bebés amamantados.

Aproximadamente 16 mujeres que estén amamantando participarán en este estudio.

Características del tratamiento ó la intervención

Cada una de las mujeres que participen en el estudio recibirá el tratamiento adecuado para la enfermedad de Chagas (benznidazol o nifurtimox) por un total de 30 días, junto con todos los controles médicos y de laboratorio necesarios, según el tratamiento habitual de la enfermedad.

Al momento del control del día 7 de tratamiento, se pedirá una muestra de leche, junto con una muestra de sangre. Las muestras de sangre se obtendrán junto con extracciones programadas para el seguimiento de la enfermedad, de forma de reducir las molestias. En ambas muestras se medirá el medicamento (benznidazol o nifurtimox, según el tratamiento que reciba cada paciente). También se solicitarán muestras extra de leche que se podrán obtener en el domicilio según su conveniencia y que se podrán acercar al hospital durante las consultas habituales de seguimiento. Las muestras de leche se colocarán en un frasco que le daremos y deben ser guardadas en el congelador.

La medicación será entregada en forma gratuita y deberá ser tomada en la cantidad indicada por el médico, con las comidas, durante los 30 días que durará el tratamiento.

Si se presentara algún problema de salud deberá concurrir al hospital para ser atendida. El doctor decidirá si presenta algún problema relacionado con la medicación y si puede continuar con el tratamiento.

Procedimientos

Muestras para medir el medicamento (benznidazol o nifurtimox): Al momento del control del día 7 y 30 de tratamiento, se le pedirá una muestra de leche (aproximadamente 10 ml), junto con una muestra de sangre de 5 ml (equivalente a una cuchara de postre). Para reducir las molestias, la muestra de sangre se obtendrá junto con extracciones habituales que se realizan a los pacientes que reciben tratamiento para Chagas. No realizaremos extracciones de sangre extra para este estudio.

También se solicitarán muestras extra de leche que Ud. juntará en su casa. Le daremos un frasco estéril donde colocara la leche y luego la guardará en el

congelador. También le daremos una heladerita con conservantes de frío para traer las muestras de leche al hospital cuando tenga que concurrir a la consulta.

Seguimiento clínico de la enfermedad de Chagas: El esquema de tratamiento y seguimiento de la enfermedad se llevará a cabo según el esquema habitual de tratamiento. Se indicará uno de los dos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (benznidazol o nifurtimox), que se deberá tomar durante 30 días según la indicación del médico. Se realizará un examen físico al ingreso al estudio que incluirá peso y talla, valoración cardiológica (electrocardiograma), estudios de laboratorio general (hemograma, hepatograma, creatinina, test de embarazo en mujeres en edad fértil), entre otros. Durante el seguimiento se realizará control a los 7 y 30 días del tratamiento (hemograma, hepatograma, y estudios de Chagas). En cada extracción de sangre se tomarán 5 ml de una vena del brazo (equivalente a 1 cuchara del tamaño de las de postre). La sangre será almacenada y guardada en forma codificada manteniendo el anonimato y podría ser utilizada para futuros estudios relacionados exclusivamente con los objetivos de este ensayo y que puedan aclarar la evolución de la enfermedad de Chagas. Debido a que el benznidazol y el nifurtimox no pueden usarse en los primeros meses de embarazo, solicitaremos un test de embarazo, y le solicitaremos que utilice métodos anticonceptivos durante el tratamiento para poder ingresar al estudio. Se realizará también seguimiento del bebé amamantado, incluyendo evaluación clínica completa, para confirmar la seguridad de la lactancia durante el tratamiento de la madre con medicamentos para el Chagas. El pasaje de los medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas a la leche materna no ha sido confirmado hasta el momento, pero existe la posibilidad de que el bebé amamantado por una madre en tratamiento se vea expuesto a pequeñas cantidades de estos medicamentos a través de la leche. El riesgo de aparición de eventos adversos en estos bebés es muy pequeño, pero no se puede descartar completamente. Los eventos adversos asociados al uso de estos medicamentos en bebés con enfermedad de Chagas (que reciben cantidades muy superiores de estos medicamentos, comparado con lo que su

bebé podría recibir a través de la leche), son en leves y poco frecuentes, principalmente reacciones cutáneas alérgicas.

Riesgos de Participación / Efectos Colaterales

Las extracciones de sangre ocasionalmente pueden producir un hematoma o generar un leve malestar. La cantidad de sangre que se extrae no suele causar anemia ni problemas en las defensas. El tratamiento de la enfermedad de Chagas puede producir en algunas veces: vómitos, diarrea, cefaleas o reacciones cutáneas alérgicas etc.

Beneficios/compensaciones por su participación

La participación en este estudio no implicará costo alguno para usted. Se le pagarán los gastos ocasionados por viajes que tenga que hacer a este Hospital como consecuencia del estudio.

El Sistema de Salud de la Ciudad de Buenos Aires le ofrecerá asistencia médica ante cualquier emergencia médica que pudiera sufrir como consecuencia directa de su participación en este estudio. No deberá abonar ninguna suma de dinero por dicha asistencia. Recibirá atención especializada sin tiempos de espera. La participación en el estudio ayudará a clarificar un problema de salud aún no resuelto.

Alternativas de Participación

La participación o no en el estudio no modificarán la atención por los médicos de este servicio.

Confidencialidad de los datos

Los datos de su historia clínica, formularios de registro y consentimiento debidamente firmado por Ud. serán confidencialmente conservados y solo podrán ser revisados por las autoridades de la Administración de Medicamentos y Alimentos de Argentina (ANMAT) y/o el Comité de Docencia e Investigación o el Comité de Ética en Investigación del Hospital de Niños.

Asimismo, estos organismos podrán inspeccionar esos mismos registros y copiar información que incluya datos que estén directamente relacionados con el presente estudio.

Se mantendrá la confidencialidad de esta información. Los resultados de la presente investigación se podrán presentar en reuniones o en publicaciones; no obstante esto, su identidad no será revelada.

El derecho a retirarse

Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. puede decidir no participar o retirarse cuando Ud. lo considere, sin perder la posibilidad de recibir la atención médica adecuada. A su vez Ud. puede ser retirado del estudio por decisión de su doctor.

Nuevos Hallazgos

Se le informará todo nuevo hallazgo que pueda afectar la decisión de continuar con su participación en el estudio.

Personas con las que puede contactarse

Para obtener mayor información sobre esta investigación o en caso de que quiera realizar consultas sobre derechos, riesgos y beneficios durante la investigación, podrá contactarse con el sector Parasitología- Chagas TE: 4963 4122 hablar con los médicos del Servicio o el Comité de ética en investigación del TE 4962 2946 Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez sito en la calle Gallo 1330, Ciudad de Buenos Aires.

Título del estudio

ESTUDIO DE TRANSFERENCIA DE MEDICAMENTOS ANTICHAGASICOS A LA LECHE MATERNA

Consentimiento Informado

Yo he leído o se me ha leído el propósito, procedimiento, riesgos y beneficios en este estudio donde se medirá la cantidad de medicamento que pasa a la leche durante el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se me ha dado la oportunidad de preguntar y he recibido las respuestas adecuadas. Yo sé que puedo decidir no participar y esto no significará penalidad ni modificación en la atención. Si decido participar puedo retirarme cuando lo considere conveniente sin perder la oportunidad de recibir atención adecuada.

Yo libremente acepto participar en este estudio. Luego de firmar recibiré una copia del formulario.

¿Usted está de acuerdo con que la sangre sea guardada en el laboratorio de Parasitología y Chagas y podrá ser utilizada para estudios posteriores sólo relacionados con la enfermedad de Chagas?

SI _____ NO _____

Nombre del paciente:

DNI:

Firma: Fecha / /

Nombre del Medico que obtiene el consentimiento:.....

Firma..... Fecha / /

Nombre del testigo:.....

DNI.....

Firma..... Fecha / /

1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Servicio Parasitología y Chagas. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LOS PADRES DE LOS NIÑOS QUE PARTICIPEN DEL PROYECTO

Estudio de la toxicocinética y la farmacocinética poblacional pediátrica de fármacos antichagásicos y sus metabolitos.

Fecha.....

Investigador responsable: Dr Jaime Altcheh

Servicio de Parasitología y Chagas, Hospital de Niños R. Gutiérrez

Nosotros somos médicos que atendemos pacientes y trabajamos en el estudio y tratamiento de la enfermedad de Chagas tanto en niños.

Objetivo: Estudiar como circula en la sangre la medicación en los niños que la reciben para tratar la enfermedad de Chagas.

Procedimientos: Como usted sabe su hijo/a ha sido diagnosticado con enfermedad de Chagas la cual ha podido ser adquirida por la picadura de la vinchuca, durante el embarazo o por una transfusión de sangre. Esta infección se produce por un parásito que vive en la sangre llamado *Trypanosoma cruzi*.

Usted está aquí para iniciar ó ya esta recibiendo el tratamiento habitual de su hijo/a con un medicamento llamado benznidazol/nifurtimox. Este tratamiento durará 2 meses y casi seguramente su niño se curará. Este medicamento se entrega en forma gratuita y está aprobado por el Ministerio de Salud Pública y se utiliza desde el año 1973. Es importante que usted sepa que este medicamento es bien tolerado a la dosis con la cual vamos a tratar a su hijo/a. Sin embargo, algunas veces, puede producir náuseas, dolor de cabeza, mareos, cansancio y trastornos digestivos que pueden aparecer al comienzo del tratamiento. En el curso de la primera o segunda semana del tratamiento pueden aparecer reacciones en la piel como pueden ser enrojecimiento, picazón, ronchas. A partir de los 30 días, pueden manifestarse dolores o molestias en brazos y piernas. Si estas molestias fueran intensas y se acompañan de fiebre y manchas, debe venir inmediatamente al hospital. El doctor decidirá si el niño puede continuar o suspender el tratamiento.

La medicación para el tratamiento de su hijo/a será entregada en forma gratuita como parte de la atención habitual del paciente con enfermedad de Chagas.

Para saber si está curado, se realizarán controles médicos y exámenes de sangre durante y luego de terminado el tratamiento. Se dice que su hijo/a está curado

cuando los estudios de sangre (anticuerpos) son negativos; esto suele observarse luego de varios años.

La Organización Mundial de la Salud considera importante conocer como circula la medicación (benznidazol/nifurtimox) en los niños. Lo que se sabe hasta hoy fue realizado solamente en adultos. Es importante conocer lo que pasa en los niños porque hay diferencias con los adultos. Los niños por ejemplo comen cosas diferentes, la acidez del estomago puede variar, tienen mayor cantidad de agua en el cuerpo y/o pueden procesar en el hígado mas rápido ó mas lento el medicamento. Realmente no se sabe que cantidad del medicamento que su hijo/a que llega a la sangre del que su hijo/a . Por lo tanto, nosotros estamos invitando a todos los niños con enfermedad de Chagas para que nos permitan utilizar su sangre en un estudio donde se verifiquen la cantidad de medicamento, en diferentes momentos del día, luego de haber tomado el medicamento.

Saber que pasa en los niños posiblemente servirá para conocer mejor como tratar a los chicos con Chagas y quizás darles la cantidad necesaria (menor, igual ó mayor que la actual) de benznidazol/nifurtimox que necesitan para curarse.

La decisión de que su hijo/a participe o no en este estudio de ningún modo afectará la calidad y el cuidado que le daremos a su hijo/a durante el tratamiento. La participación en este estudio, que incorporara 50 niños en 2 años agregará 2 ó 3 visitas, donde realizaremos una extracción de sangre de 3 mililitros (una cuchara pequeña) de sangre. En cada extracción colocaremos una pomada con anestésico para disminuir el dolor. Si las extracciones son en el mismo día colocaremos un pequeño catéter para no tener que pincharlo nuevamente.

Para su información los controles médicos y los estudios de laboratorio (Extracción de sangre) se realizan habitualmente con todos nuestros pacientes es el siguiente:

- a) durante el tratamiento que dura 2 meses: visitas a los 7, a los 30 y a los 60 días.
- b) después de finalizado el tratamiento: cada 3 meses el primer año y luego cada 6 meses.

Durante este estudio, se dividirán los pacientes en 3 grupos

- a) al inicio del tratamiento:12 pacientes
- b) durante el tratamiento:26 pacientes
- c) al finalizar el tratamiento: 12 pacientes

Charlaremos sobre los tiempos de las extracciones y trataremos de acomodar alguna dentro de los controles habituales para la enfermedad de Chagas.

Con esta sangre extra nosotros haremos un estudio para medir la cantidad del medicamento (benznidazol/nifurtimox) con un equipo adecuado para esto.

Riesgo y molestias: Las extracciones de sangre ocasionalmente pueden producir un hematoma o generar un leve malestar. La cantidad de sangre que se extrae no suele causar anemia ni problemas en las defensas de su hijo/a. Para evitar dolor colocaremos una pomada anestésica previamente.

Ante cualquier inconveniente que surja en el marco de este estudio será atendido en el Hospital de Niños R. Gutiérrez.

Beneficios: Su hijo no obtendrá ningún beneficio extra por la participación en este estudio. Pero ayudará a mejorar el tratamiento de los niños con enfermedad de Chagas. Este trabajo podría no beneficiar a la sociedad inmediatamente, pero las generaciones futuras posiblemente se beneficiarán.

Incentivos: No recibirán pagos por participar en este estudio. En el caso que sea necesario ustedes recibirán el reembolso del costo de traslado al hospital para cada visita y se le cubrirán los gastos de alimentación si debe permanecer varias horas en el hospital.

Confidencialidad: La identidad de su hijo/a será reservada como confidencial, como así los resultados de los estudios realizados mediante la identificación por un código de números y letras. Sin embargo estos datos podrán ser revisados y controlados por personal del Comité de investigación y/o de Ética del Hospital de Niños R. Gutiérrez para el control de los mismos. Los resultados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas preservando su identidad.

Derecho a no participar o a retirarse: Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. puede decidir que su hijo/a no participe o retirarlo cuando Ud. lo considere, sin perder la posibilidad de que el niño reciba el tratamiento y el seguimiento adecuado para la enfermedad de Chagas. A su vez el niño puede ser retirado del estudio por decisión de su doctor.

Personas con las que puede contactarse: Si Ud. tiene alguna pregunta referente a este estudio puede comunicarse con:

- Dr. Jaime Altcheh al Servicio de Parasitología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires. TE. 4964 3093.

CONSENTIMIENTO

Estudio de la toxicocinética y la farmacocinética poblacional pediátrica de fármacos antichagásicos y sus metabolitos.

Nombre y Apellido del paciente.....F.nac
No de identificación:.....
Lugar del Estudio:.....

Mi hijo/a ha sido invitado a participar en este estudio. El propósito de este estudio es medir la cantidad de medicamento(benznidazol/nifurtimox) que circula en la sangre de los niños que reciben tratamiento. Los procedimientos no serán diferentes a los que habitualmente recibe un niño con enfermedad de Chagas con la excepción que se extraerá una mayor cantidad de sangre en 2 ó 3 extracciones extras. De por sí el estudio no genera riesgos adicionales al tratamiento y el seguimiento normal. Entiendo que no hay un beneficio directo para mi hijo/a, sin embargo su participación podría ayudar a resolver un problema de salud. No recibiré pagos por participar en este estudio. En el caso que sea necesario se me reembolsará el costo de traslado al hospital y de alimentación para cada visita.

Yo he leído ó se me ha leído toda la información que se menciona anteriormente. Se me ha dado la oportunidad de preguntar y he recibido las respuestas adecuadas. Yo sé que mi hijo/a puede no participar y esto no significará penalidad ni modificación en la atención que recibirá. Si decido que mi hijo/a participe puedo retirarlo cuando lo considere conveniente sin perder la oportunidad de que reciba el tratamiento adecuado. Yo libremente acepto que el niño/a participe en este estudio. Luego de firmar recibiré una copia del formulario.

Nombre y firma del tutor: _____

Fecha: ____/____/____(dd/mm/aaaa)

Testigo: _____

Fecha: ____/____/____(dd/mm/aaaa)

Investigador:.....Firma:

Fecha: ____/____/____(dd/mm/aaaa)

2 ASENTIMIENTO

ASENTIMIENTO PARA NIÑOS QUE PARTICIPEN EN EL PROYECTO

Estudio de la toxicocinética y la farmacocinética poblacional pediátrica de fármacos antichagásicos y sus metabolitos.

Fecha / /

Nombre y Apellido:

.....Edad:

FN: / /

Luego de haberte explicado a vos y a tus padres porqué se produce la enfermedad de Chagas y cuáles son los riesgos por tenerla, queremos proponerte lo siguiente:

Para curarte el Chagas te indicaremos un tratamiento con pastillas. Este tratamiento es el que le indicamos a todos los niños.

Los médicos que tratamos a los niños con infección por Chagas del Hospital, te estamos invitando a participar en este estudio que nos ayudará a saber como circula el medicamento en tu sangre.

Para hacer esto vamos a pincharte 2 ó 3 veces para tomar una pequeña cantidad de sangre (una cuchara de te).

Deberás venir al hospital varias veces luego de iniciado el tratamiento, como lo hacen todos los chicos que tratamos.

1. a los 7 días
2. a los 30 días
3. a los 60 días en este momento termina el tratamiento.
4. Luego tenés que venir cada 3 meses durante 1 año y luego cada 6 meses por 2 años más.

Para este estudio tomaremos un poco mas de sangre en 2 ó 3 visitas extras. Esto puede molestar un poco pero haremos todo lo posible para que las molestias sean mínimas. Te colocaremos una pomada que dormirá la zona para que no tengas dolor. Si tienes que quedarte algunas horas te daremos de comer.

Queremos contarte que no estas obligado a participar. Tu decisión no va a cambiar nuestra forma de atenderte y siempre haremos lo posible para que estés cómodo participes o no del estudio.

**POPULATION PHARMACOKINETICS STUDY OF
BENZNIDAZOLE IN CHILDREN WITH CHAGAS
DISEASE**

Principal Investigators:

Dr Jaime Altcheh (Children's Hospital of Buenos
Aires, Buenos Aires, Argentina)

Dr Facundo Garcia Bournissen

English version of Spanish version 2.1 - July 2007

POPULATION PHARMACOKINETICS STUDY OF BENZNIDAZOLE IN CHILDREN WITH CHAGAS DISEASE

Principal Investigators

Dr. Altcheh, Jaime
Parasitology
Children's Hospital "R. Gutiérrez"
Gallo 1330, C1425EFD, Ciudad de Buenos Aires.

Dr. Koren, Gideon
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
The Hospital for Sick Children, University of Toronto,
555 University Ave, 8th floor, Toronto, ON M5G 1X8, Canada

Coinvestigators

Dr. Garcia Bournissen, Facundo
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
The Hospital for Sick Children, University of Toronto,
555 University Ave, 8th floor, Toronto, ON M5G1X8, Canada

Dr. Giglio, Norberto
Epidemiology
Children's Hospital "R. Gutiérrez"
Gallo 1330, C1425EFD, Ciudad de Buenos Aires.

Dr. Della Védova, Carlos Omar
Laboratorio de Servicios a la Industria y al Sistema
Científico (CONICET-CIC) Departamento de Química, Facultad
de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Cno. Centenario e/ 505 y 508 Gonnet - CP 1897,
La Plata , Pcia de Buenos Aires

Dr. Alejandro Nava-Ocampo
Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
The Hospital for Sick Children, University of Toronto,
555 University Ave, 8th floor, Toronto, ON M5G 1X8, Canada

1 PROTOCOL SUMMARY

| | |
|------------------------------------|--|
| Title | Study of population pharmacokinetics of benznidazole (BNZ) in children with Chagas disease |
| Duration | 24 months |
| Objective | To study the population pharmacokinetics of benznidazole in children with Chagas disease |
| Design | Phase I study in special populations (children). Population pharmacokinetics |
| Population | Ambulatory pediatric patients with Chagas disease |
| Sample size | Total N=50 Patients will be divided in 3 groups: <ul style="list-style-type: none">- Group 1: Patients receiving the first dose of BNZ (N=12)- Group 2: Patients in steady state of BNZ (N=26)- Group 3: Patients receiving the last dose of BNZ (N=12) |
| Selection Criteria | Children 2 to 12 years old with infection due to Trypanosome Cruzi (Chagas disease) |
| Inclusion Criteria | Children 2 to 14 year old under treatment with BNZ for Chagas disease. Diagnosis of Chagas disease with at least 2 techniques (ELISA, hemagglutination or particle agglutination). Informed consent provided by the parents and assentment provided by the patient. |
| Exclusion Criteria | Patients with hypersensitivity to BNZ. Immunocompromised patients. Altered liver or kidney function. Pregnancy. |
| Treatment | Benznidazole 5-8 mg/kg/day p.o. in 2 daily doses for 60 days |
| Safety monitoring | Vital signs, adverse events, laboratory markers. |
| Samples for pharmacokinetics study | Samples per patient: 3 (sparse sampling) Volume of blood per sample: 3ml |

2 TABLE OF CONTENTS

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | PROTOCOL SUMMARY | 3 |
| 2 | TABLE OF CONTENTS..... | 5 |
| 3 | GENERAL INFORMATION | 6 |
| 3.1 | STUDY TITLE..... | 6 |
| 3.2 | PRINCIPAL INVESTIGATORS..... | 6 |
| 3.3 | COINVESTIGATORS..... | 6 |
| 4 | INTRODUCTION..... | 7 |
| 4.1 | BACKGROUND | 7 |
| 5 | OBJECTIVE | 11 |
| 6 | STUDY DESIGN..... | 11 |
| 6.1 | STUDY TYPE | 11 |
| 6.2 | POPULATION | 11 |
| 6.2.1 | <i>Selection criteria.....</i> | <i>11</i> |
| 6.2.2 | <i>Inclusion criteria.....</i> | <i>11</i> |
| 6.2.3 | <i>Exclusion Criteria.....</i> | <i>11</i> |
| 6.2.4 | <i>Criteria for withdrawal from the study.....</i> | <i>12</i> |
| 7 | RESEARCH PLAN | 13 |
| 7.1 | GENERAL OVERVIEW OF THE STUDY..... | 13 |
| 7.2 | PATIENT RECRUITMENT..... | 14 |
| 7.3 | STUDY DURATION..... | 14 |
| 7.4 | DATA COLLECTION..... | 14 |
| 7.5 | TREATMENT..... | 14 |
| 7.6 | FOLLOW UP..... | 14 |
| 7.7 | SAMPLE OBTENTION FOR PHARMACOKINETICS..... | 15 |
| 7.7.1 | <i>Group 1: Patients receiving the first dose of benznidazole</i> | <i>16</i> |
| 7.7.2 | <i>Group 2: Patients in steady state phase (Days 3 - 59).....</i> | <i>16</i> |
| 7.7.3 | <i>Group 3: Patients receiving the last dose.....</i> | <i>16</i> |
| 7.8 | OVERVIEW OF DIAGNOSTIC STUDIES | 16 |
| 8 | STATISTICAL DESIGN | 17 |
| 8.1 | STATISTICAL METHODS | 17 |
| 8.2 | SAMPLE SIZE CALCULATION | 17 |
| 8.2.1 | <i>Sample size justification.....</i> | <i>17</i> |
| 8.2.2 | <i>Stratification of patient population.....</i> | <i>17</i> |
| 8.2.3 | <i>Interim analysis.....</i> | <i>17</i> |
| 9 | ETHICAL CONSIDERATIONS..... | 18 |
| 10 | ADVERSE DRUG EVENTS..... | 18 |
| 11 | DATA CONFIDENTIALITY | 18 |
| 12 | REFERENCES..... | 19 |

3 GENERAL INFORMATION

3.1 Study Title

Study of population pharmacokinetics of benznidazole (BNZ) in children with chagas disease

3.2 Principal Investigators

Dr. Koren, Gideon

Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
The Hospital for Sick Children, University of Toronto,
555 University Ave, 8th floor, Toronto, ON M5G 1X8, Canada

Dr. Altcheh, Jaime

Division of Parasitology
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
Gallo 1330, C1425EFD, Ciudad de Buenos Aires.

3.3 Coinvestigators

Dr Facundo Garcia Bournissen

Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada.

Dr. Giglio, Norberto

Division of Epidemiology
Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez
Gallo 1330, C1425EFD, Ciudad de Buenos Aires.

Dr. Carlos Della Vedova

Laboratorio de Servicios a la Industria y al Sistema Científico (CONICET-CIC) Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
Cno. Centenario e/ 505 y 508 Gonnet - CP 1897,
La Plata , Pcia de Buenos Aires

Dr. Alejandro Nava-Ocampo

Division of Clinical Pharmacology and Toxicology
The Hospital for Sick Children, University of Toronto,
555 University Ave, 8th floor, Toronto, ON M5G 1X8, Canada

4 INTRODUCTION

4.1 Background

Chagas disease is a parasitic infection caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*. The geographical distribution of this disease is wide, from the south of the USA to the south of Argentina, with endemic characteristics from the north of Mexico to the north of Argentina.¹

The parasite that causes this disease can be transmitted by an arthropod vector, transfusions or mother to child transmission during pregnancy. Great progress has been achieved in the last years in the control of the transmission by the vector and by transfusion. Nevertheless, many challenges for the control of this infection still remain.

After the initial phase of the infection, which happens mainly in children and has a mortality of up to 10%, an asymptomatic phase ensues that will eventually lead to irreversible heart and /or intestinal tract damage in up to 30% of the patients many years after the initial infection.¹

It is estimated that there are currently about 20 million people infected in Latin America, and that 200,000 new cases and 20,000 deaths due to complications of the disease happen every year.^{1;2} Most of the new infections happen in children, either by vector transmission or by vertical transmission. In Argentina, where 89% of the population lives in urban areas in particular in or around Buenos Aires, most of the patients infected with Chagas' disease live in urban areas. Prevalence of Chagas' disease in Buenos Aires has been estimated to be about 2%. Most new infections in urban areas are due to vertical transmission and occasionally due to blood transfusions. The transplacental route of transmission explains why most new cases in urban centers are detected in young children.

It has been shown that treatment of the infection in the acute phase is effective and carries a cure rate above 90%. Clinical trials have shown that the treatment of children in the quiescent phase leads to a positive therapeutic response.

New tools are being used to evaluate the response to the treatment such as PCR to detect parasite genome in blood and tissues and newer antigens for antibody tests. These advances have led to health authorities of Latin American countries and the World Health Organization to implement treatment programs of children with Chagas' disease across central and Latin America.³

There are only 2 drugs currently available for the treatment of Chagas disease, nifurtimox and benznidazole.¹

Benznidazole (N-benzyl-2-nitroimidazol-1-acetamide) is a nitroimidazol compound that was developed over 30 years ago.⁴ The mechanism of action of benznidazole is still not clear, but it has been shown to induce reductive stress leading to covalent modification of proteins and other macromolecules in the parasite.^{1;5} Another potential mechanism of action is the inhibition of the enzyme tripanotionine reductase, which leads to tripanotionine depletion, a molecule with important detoxification functions in the parasite *T. cruzi*.⁴ Benznidazole, and possibly its metabolites, like nifurtimox, induces the production of free radicals that can damage the parasite's DNA, as well as inhibit RNA and protein synthesis.^{4;6}

Only 2 studies on the pharmacokinetics of benznidazole have been published to date, both in the 1970's.

Benznidazole pharmacokinetics has been described as monocompartmental in healthy male adults.⁷⁻⁹ After a group of healthy male volunteers received 100 mg of benznidazole po, the plasmatic peak concentration of 2.2 - 2.8 mg/l was observed 3 - 4 hours post dose. The estimated half life was 12 hours, and the volume of distribution 0.56 l/kg.⁸ In a second study of multiple doses of benznidazole in Chagas patients, doses of 7 mg/kg produced plasma concentrations similar to those estimated based on the pharmacokinetic parameters obtained from the previous study.⁹ All patients reached steady state within 10 days of treatment with plasma concentrations between 5.4 - 16.4 mg/l (estimated required plasma concentration to kill the parasite: 3 - 6 mg/l).

Benznidazole is eliminated by the liver, with less than 20% excreted unchanged by the kidney. Protein binding is moderate (40%), and distribution into tissues is good, including central nervous system, liver, and red blood cells. There are virtually no studies on the metabolism of

benznidazole in humans, and very little and outdated information is available from animal studies.

Benznidazole, and other drugs used for the treatment of Chagas disease have never been adequately studied in the pediatric population.^{10;11} Also, there is no appropriate formulation for use of this drug in the pediatric population (liquid formulation), which many times forces health care providers to recur to pill fractionation, a methodology fraught with difficulties and risks.^{12;13}

In response to this dearth of information in the pediatric population, the Scientific Working Group on Chagas Disease, TDR, WHO/PAHO has signaled the study of the pharmacokinetics of benznidazole and nifurtimox in children as a research priority.

Pharmacokinetic studies have traditionally involved a limited number of patients, usually healthy volunteers. Pharmacokinetic profile of the studied drug would usually be characterized extensively in each individual participant, which requires a large number of samples to be obtained. The requirement for extensive sampling makes traditional pharmacokinetics studies very difficult to perform in pediatric populations due to ethical and logistical limitations (e.g. blood volume restrictions, inordinate number of punctures, etc).

In the last few decades, a new approach to pharmacokinetics, population pharmacokinetics, has gained momentum as the method of choice when studying vulnerable populations such as children. This method changes the focus away from the complete estimation of the pharmacokinetics parameters of each individual participant towards the estimation of the parameters (and its variability) in the whole population. In order to estimate the pharmacokinetics of a drug from a population perspective, a larger number of individuals is required to participate, but the amount of samples per individual is greatly reduced (to as little as 2 samples in some designs). This milder burden on the individual patient makes population pharmacokinetics the method of choice for studies in the pediatric population.

This method has been recommended by the FDA and EMEA as the standard method for pharmacokinetic studies in children.¹⁴⁻¹⁶

Given the absolute absence of data on the pharmacokinetics of benznidazole in the pediatric population, we propose to carry out a population pharmacokinetics study of this drug

in children receiving this drug for the treatment of Chagas disease.

5 OBJECTIVE

To study the pharmacokinetics of benznidazole in children with Chagas' disease.

6 STUDY DESIGN

6.1 Study type

Population pharmacokinetics study.
Observational prospective study in especial populations (children).

6.2 Population

6.2.1 Selection criteria

Children 2-12 years old, with Chagas' disease.

6.2.2 Inclusion criteria

- Children 2 - 12 years old, both sexes, with a diagnosis of Chagas' disease and eligible for treatment with benznidazole, as per current treatment protocols.
 - Chagas' disease diagnostic criteria: At least 2 positive serological tests for *Trypanosoma cruzi* infection técnicas serológicas reactivas (ELISA, Hemmoagglutination and particle agglutination tests).
- Informed consent signed by the parents and assentment of the patient.

6.2.3 Exclusion Criteria

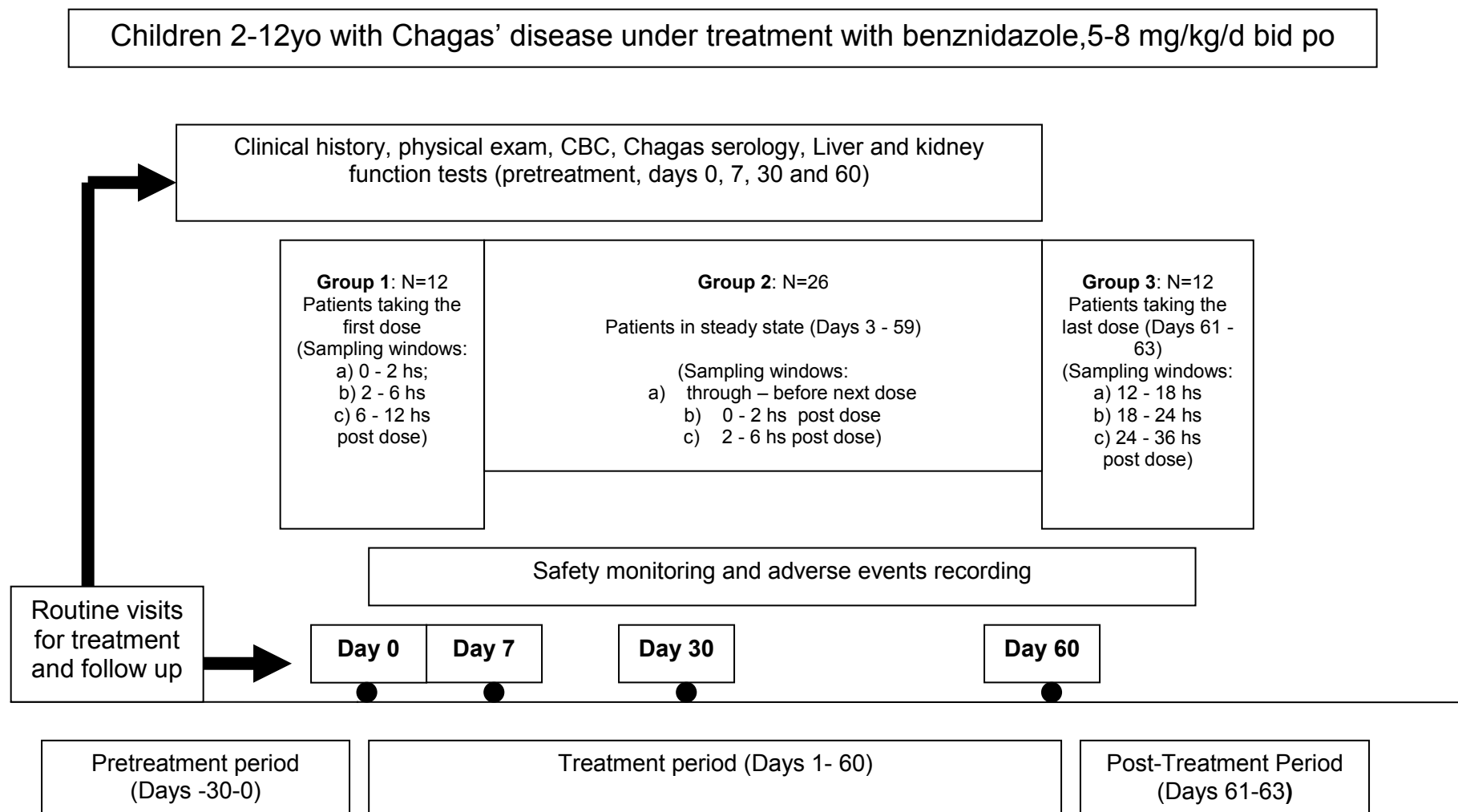
- Patients with a history of hypersensitivity to benznidazole or any of the drug excipients.
- Immunocompromised patients (Clinical history compatible with HIV infection, cancer, primary immunodeficiencies or prolonged treatment with corticosteroids or other immunosuppressants)
- Altered hepatic function (increase in AST/ALT x3 or billirubin x3).
- Altered renal function (increase in creatinine x3).
- Pregnancy

6.2.4 Criteria for withdrawal from the study

- Non-compliance with treatment plan
- Severe drug reaction potentially attributable to benznidazole
- Any situation that may put the safety of the patient at risk, according to the judgment of the researchers or attending physicians.

7 RESEARCH PLAN

7.1 General overview of the study



7.2 Patient recruitment

Patients eligible for the study will be recruited at the Parasitology Division, Children's Hospital of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, where these patients are routinely treated and followed up. Recruitment will be carried out by the treating pediatrician and principal investigator, Dr. Jaime Altcheh.

7.3 Study duration

The recruitment phase of the study will take an estimated 24 months.

7.4 Data collection

Information on clinical examination, weight, height, cardiological evaluation, and clinical biochemistry results will be collected. These studies are done routinely in children with Chagas' disease under treatment with benznidazole.

7.5 Treatment

The patients will receive, as per routine treatment protocol of Chagas disease, Benznidazole (RADANIL®, Roche). Dose: 5-8 mg/kg/d, bid, PO for 60 days. The patients are usually treated in an outpatient setting.

Benznidazole will be provided by the Argentine National Ministry of Health, for free. The patients will be given enough benznidazole for 1 month of treatment plus 5 days. Pill counts will be carried out at the day 30 visit, when enough benznidazole to complete the remaining of the treatment will be given to the patient's family. Pill counts will be carried out again at the end of the treatment period.

The patients parents will be given a treatment diary to complete during the treatment period with daily times of ingestion of the medication and any events that they think might be related to the treatment.

All concomitant medications will be registered in the patient's chart. There is no available information to date neither on the metabolism of benznidazole, nor on potential drug interactions.

7.6 Follow up

Patients will be followed according to the usual management protocol of children with Chagas' disease, at the ambulatory clinic of the Division of Parasitology, Children's Hospital of Buenos Aires.

Patients will be seen at the clinic at diagnosis, 7, 30 and 60 days after the start of the treatment. Clinical examination and laboratory studies will be performed at each visit, including CBC, liver and renal function tests and Chagas serology.

Parents will be instructed to report adverse events potentially related to the treatment.

Patients will be seen 3 months after the treatment period is completed, and every 6 months after that. Serology for Chagas' disease will be performed at each visit.

All adverse events will be immediately reported to the pharmacovigilance division of the ANMAT (Argentine National Administration of Medications and Medical Technology).

7.7 Sample obtention for pharmacokinetics

The patients enrolled in the study will be divided in 3 groups:

- Group 1: Patients receiving the first dose of benznidazole (N=12; Sampling windows: a=0-2hs; b=2-6hs; c=6-12hs post dose).
- Group 2: Patients in steady state phase (at least after 3 days of treatment; Days 3-59).(N=26; sampling windows: a=through-before next dose; b=0-2hs; c=2-6hs post dose).
- Group 3: Patients receiving the last dose of benznidazole (Days 61-63).(N=12; Sampling windows: a=12-18hs; b=18-24hs; c=24-36hs post dose).

Time of drug administration and blood extraction will be registered in a form. Extraction times will be distributed across the sampling windows (see 7.1), and taking into account, to the extent possible, patient availability and preferences.

Blood extraction will be done using a butterfly needle, with previous application of anaesthetic cream. Blood extractions will be done, whenever possible, within the context of other routine blood extractions required for the clinical follow up of the patient.

Samples will be stored in the fridge until extraction (less than 48 hs).

Benznidazole extraction and measurement: Benznidazole will be extracted and measured (by HPLC) according to published protocols.¹⁷⁻²¹

7.7.1 Group 1: Patients receiving the first dose of benznidazole

Number of patients: 12.

Number of blood extractions per patient: 3. The first extraction between 0 and 2 hours, the second extraction between 2 and 6 hours and the third extraction between 6 and 12 hours post dose.

Blood volume per extraction: 3ml.

Minimal interval between samples: 1 hour.

7.7.2 Group 2: Patients in steady state phase (Days 3 - 59)

Number of patients: 26

Number of blood extractions per patient: 3. The first extraction at through (right before the next dose), the second extraction between 0 and 2 and the third extraction between 2 and 6 hours post dose.

Blood volume per extraction: 3ml.

Minimal interval between samples: 1 hour.

7.7.3 Group 3: Patients receiving the last dose

Number of patients: 12

Number of blood extractions per patient: 3. Extractions times will be chosen from the following times: 12, 18, 24 and 36 hours post dose.

Blood volume per extraction: 3ml.

Minimal interval between samples: 1 hour.

7.8 Overview of diagnostic studies

| Visit | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|-----|----|----|---------------|
| Time | 0 | 7 d | 1m | 2m | posttreatment |
| Informed consent | X | | | | |
| Clinical history | X | X | X | X | X |
| Physical exam | X | X | X | X | X |
| Chagas' serology | X | X | X | X | X |
| CBC | X | X | X | X | |
| Liver enzymes | X | X | X | X | |
| Creatinine | X | X | X | X | |
| Cardiological exam | X | | | | |
| Adverse event evaluation | | X | X | X | X |
| Drug measurements (may not coincide with clinical visits) | | X | X | X | X |

8 STATISTICAL DESIGN

8.1 Statistical methods

Descriptive statistics (i.e. mean, median, sd, variation coefficient, etc) will be used to describe the analyzed variables. The pharmacokinetics parameters to be estimated in the population will be Volume of distribution (V), clearance (C), absorption rate constant (Ka/F), elimination rate constant (Ke).

The population pharmacokinetic model most appropriated for the data will be chosen using the Akaike information criteria. Pharmacokinetic data will be analyzed using the program NONMEM for nonlinear mixed effects modelling.

8.2 Sample size calculation

Fifty patients will be enrolled in the study.

8.2.1 Sample size justification

For a drug following one-compartment kinetics, as has been suggested for benznidazole^{8;9}, between 10 and 20 patients would be required to detect a subpopulation with a 30% difference in drug clearance.

Given the fact that there is virtually no data available on the disposition of benznidazole in children (and very little in adults, too), we assume that 50 patients should be enough to detect the existence of 2 subpopulations and account for patient attrition.

8.2.2 Stratification of patient population

Samples obtained from patients in the first group (Patients receiving the first dose of benznidazole) will provide information mainly on the absorption rate constant and volume of distribution of the drug. Samples from the remaining two groups (Patients in steady state phase and patients receiving the last dose) will provide information mainly on the clearance rate of the drug, as well as confirming if the drug follows a one-compartment model (or other).

8.2.3 Interim analysis

We expect to carry out an interim analysis when 50% of the patients are enrolled. This will allow us to adjust the number of patients required and better estimate the time required to complete the study.

9 ETHICAL CONSIDERATIONS

Informed written consent will be required of the patients' parents or guardians, and of the patients that are capable of understanding the written consent process. Patients who cannot understand the written consent process will be required to assent, and the assent will be registered by a witness.

The study will be done in agreement with the guidelines of the International Conference on Harmonisation (ICH6), Good clinical practice guidelines (GCP), the declaration of Helsinki, the UNICEF convention on the rights of children, and the regulations of the ANMAT (Argentine Ministry of Health).

10 ADVERSE DRUG EVENTS

Every adverse event, whether related to benznidazole or not, will be registered and notified to the pharmacovigilance division of the ANMAT, as well as the Teaching and Research Committee of the Children's Hospital of Buenos Aires.

11 DATA CONFIDENTIALITY

Patient data confidentiality will be strictly enforced, including patient anonymity. Samples will be identified by alphanumeric code, and patient data will be stored in files and computer to which the principal investigator and associate investigators only will have access.

12 REFERENCES

- (1) Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 2003; 19(11):495-501.
- (2) WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease, World Health Organization. Control of Chagas disease second report of the WHO Expert Committee. 905 ed. Geneva: World Health Organization, 2002
- (3) Control of Chagas disease second report of the WHO Expert Committee. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. 2002. Geneva, World Health Organization.
- (4) Raether W, Hanel H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol Res* 2003; 90 Supp 1:S19-S39.
- (5) Moreno SN, Docampo R, Mason RP et al. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys* 1982; 218(2):585-591.
- (6) Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact* 1990; 73(1):1-27.
- (7) Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC et al. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin Pharmacokinet* 1992; 23(5):328-364.
- (8) Raaflaub J, Ziegler WH. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 1979; 29(10):1611-1614.
- (9) Raaflaub J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 1980; 30(12):2192-2194.
- (10) The Therapeutic Orphan--30 Years Later. Proceedings of a joint conference of the Pediatric Pharmacology Research Unit Network, the European Society of Developmental Pharmacology, and the National Institute of Child Health and Human Development. Washington DC, USA, May 2, 1997. *Pediatrics* 1999; 104(3 Pt 2):581-645.
- (11) Wilson JT. An update on the therapeutic orphan. *Pediatrics* 1999; 104(3 Pt 2):585-590.
- (12) Schechter NL, Berde CB, Yaster M. Pain in infants, children, and adolescents. 2nd ed ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002
- (13) Nahata MC. Lack of pediatric drug formulations. *Pediatrics* 1999; 104(3 Pt 2):607-609.
- (14) Meibohm B, Laer S, Panetta JC et al. Population pharmacokinetic studies in pediatrics: issues in design and analysis. *AAPS J* 2005; 7(2):E475-E487.
- (15) Roy A, Ette EI. A pragmatic approach to the design of population pharmacokinetic studies. *AAPS J* 2005; 7(2):E408-E420.

- (16) Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1980; 8(6):553-571.
- (17) Workman P, White RA, Walton MI et al. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br J Cancer* 1984; 50(3):291-303.
- (18) Workman P, Walton MI, Lee FY. Benznidazole: nitroreduction and inhibition of cytochrome P-450 in chemosensitization of tumour response to cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol* 1986; 35(1):117-119.
- (19) Morilla MJ, Prieto MJ, Romero EL. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(2):213-219.
- (20) Morilla MJ, Benavidez PE, Lopez MO et al. Liposomal benznidazole: a high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. *J Chromatogr Sci* 2003; 41(8):405-409.
- (21) de Castro CR, az de Toranzo EG, Castro JA. Benznidazole-induced ultrastructural alterations in rat adrenal cortex. Mechanistic studies. *Toxicology* 1992; 74(2-3):223-232.

**ESTUDIO DE TRANSFERENCIA DE
MEDICAMENTOS ANTICHAGASICOS A
LA LECHE MATERNA**

Investigador Principal:

Dr Jaime Altchek

(Hospital de Niños “Ricardo Gutierrez”, Buenos Aires, Argentina)

INDICE

| | |
|---|----|
| Resumen del proyecto..... | 3 |
| Introducción..... | 4 |
| Objetivo..... | 6 |
| Población y Métodos..... | 6 |
| Población..... | 6 |
| Criterios de inclusión..... | 6 |
| Criterios de exclusión..... | 6 |
| Materiales y métodos..... | 7 |
| Modelado farmacocinético poblacional..... | 8 |
| Justificación del estudio..... | 8 |
| Resultados esperados..... | 9 |
| Grupo de Investigación..... | 10 |
| Investigador principal..... | 10 |
| Coinvestigadores..... | 10 |
| Figura I..... | 11 |
| Referencias..... | 12 |

RESUMEN DEL PROYECTO

Proponemos estudiar el pasaje de los medicamentos antichagásicos, benznidazol y nifurtimox, a la leche materna en mujeres lactantes con enfermedad de Chagas.

Se obtendrán muestras de leche materna de mujeres lactantes con enfermedad de Chagas para evaluar el pasaje de la droga a la leche. Esto se llevara a cabo por medio de la obtención, luego de la administración del medicamento, de muestras de leche materna a intervalos pre-especificados, así como un número limitado de muestras de sangre de cada participante para comparar las concentraciones sanguíneas del medicamento con las concentraciones en la leche.

En una segunda fase del proyecto, generaremos un modelo de farmacocinética poblacional para evaluar los parámetros farmacocinéticos de la droga con el objeto de estimar la transferencia media de benznidazol o nifurtimox a la leche en una población, así como la variabilidad inter-individual. Esperamos que estos modelos poblacionales nos permitan generar recomendaciones sobre la seguridad del benznidazol, y confirmar la del nifurtimox, para los bebés amamantados por mujeres lactantes que reciban el medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, que puede ser transmitido por un vector, transfusiones o por transmisión vertical (congénita). La distribución geográfica de la enfermedad es amplia, desde el sur de EEUU hasta el sur de Argentina, con características endémicas desde el norte de México hasta el norte de Argentina.^{1,2}

Se estima que hay actualmente 20 millones de infectados con la enfermedad de Chagas en Latino América, y que 200.000 nuevos casos y 20.000 muertes ocurren anualmente.^{1,2} La mayor parte de las infecciones en Argentina se producen en niños, ya sea por transmisión vectorial o congénita.

La fase inicial de la infección, que tiene lugar principalmente en niños con una mortalidad del 5%, es seguida de una fase asintomática que eventualmente llevara a el compromiso cardiaco irreversible (y/o el daño al tracto gastrointestinal) décadas más tarde en aproximadamente 30% de los infectados.^{1,2}

Se ha demostrado que el tratamiento de la infección en la etapa aguda es altamente efectivo, estando asociado a tasas de curación de hasta 90%. Ensayos clínicos también han demostrado que el tratamiento de pacientes pediátricos conlleva altas tasas de curación. Estudio realizados en adultos han demostrado una menor morbilidad en los pacientes tratados en la etapa crónica comparados con aquellos que no recibieron tratamiento.³ Esto ha llevado a que actualmente la Organización Mundial de la Salud recomiende el tratamiento de todo paciente con enfermedad de Chagas, sin importar su edad o estadio.⁴

Solo existen al momento 2 medicamentos disponibles y efectivos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el nifurtimox y el benznidazol.^{1,2} Ambos medicamentos están aprobados por el Administración Nacional de Medicamentos (ANMAT).

A pesar de que el benznidazol fue aprobado hace más de 30 años,⁵⁻⁸ su mecanismo de acción aún no está aclarado.^{1,2,8-10} Los efectos adversos más comunes observados en el tratamiento con benznidazol en pediatría son náuseas, anorexia, cefalea, molestias gastrointestinales y artralgias.¹¹ También son comunes el eritema y el prurito, razones frecuentes de abandono del tratamiento.¹¹ Las reacciones adversas más severas asociadas al benznidazol, tales como reacciones cutáneas severas y granulocitopenias, se observan raramente en niños, pero son frecuentes en adultos.¹¹ Las reacciones

adversas son raras y casi universalmente leves en la población pediátrica.¹² En un estudio realizado por nuestro grupo, hemos demostrado que la incidencia de eventos adversos en niños es baja, y que la aparición de eventos adversos severos es menor al 2%.¹² Numerosos expertos coinciden en que el grado de severidad de las reacciones adversas en adultos ha sido sobreestimadas.³ Estudios realizados en adultos con 30 días de tratamiento por el grupo del Dr Viotti y otros, con miles de pacientes tratados, sugieren una muy baja incidencia de eventos adversos severos en adultos, con una tasa de abandono al tratamiento menor al 10%.³

A pesar de que no se encuentran formalmente contraindicados durante la lactancia en el listado de medicamentos de la Organización Mundial de la Salud,¹³ no existe información disponible sobre el grado de pasaje de los medicamentos antichagásicos a la leche materna, por ejemplo en el caso de una mujer lactante que requiere tratamiento para la enfermedad de Chagas. Es importante tener en cuenta que la enfermedad de Chagas comúnmente ocurre en áreas con limitado acceso a recursos tales como atención sanitaria e incluso agua potable. La necesidad de tratar a una madre joven (en muchos casos adolescentes) que puede estar amamantando obliga a elegir entre el tratamiento de la madre y la lactancia, dada la escasa evidencia disponible para confirmar la seguridad del benznidazol o el nifurtimox durante la lactancia. Sin embargo, esta elección tampoco está exenta de riesgos, algunos significativos, tales como la pérdida de la oportunidad de tratar al paciente (en el caso de regiones con difícil acceso al agente sanitario, donde la madre puede no volver a consultar hasta su próximo embarazo), o, en caso de suspender la lactancia para realizar el tratamiento, la exposición del bebé a agua (para preparar fórmula) de dudosas condiciones de potabilidad, con el consiguiente riesgo de diarrea y otras complicaciones. En áreas con altas tasas de natalidad, la posibilidad de realizar el tratamiento adecuado (lo que en muchos casos implica la diferencia entre desarrollar complicaciones cardíacas o no) se vuelve extremadamente difícil debido al corto período disponible entre embarazos (con el período posterior de lactancia) y el siguiente embarazo.

Por otro lado, la absoluta falta de información sobre el nivel de transferencia de benznidazol y nifurtimox a la leche materna, y la evidencia de que otras drogas se pueden utilizar en forma segura durante la lactancia, sugiere que un número significativo de mujeres están posiblemente siendo privadas de tratamiento efectivo con la excusa de la ignorancia de los riesgos, sin que hasta el momento se haya realizado ningún esfuerzo por evaluar científicamente el alcance de dichos riesgos teóricos, o de confirmar la seguridad de la drogas durante la lactancia.

En el caso específico de nifurtimox, nuestro grupo ya ha llevado adelante un estudio teórico¹⁴ (el primero en el mundo en este área) que sugiere fuertemente que el pasaje de este medicamento a la leche materna es extremadamente bajo (Figura I). Esta información apoya el potencial uso de este medicamento durante la lactancia, pero requiere evidencia confirmatoria para poder llevar adelante esta práctica con certeza.

Dada la ausencia absoluta de información sobre la excreción de benznidazol y nifurtimox a la leche materna proponemos realizar un estudio para evaluar este aspecto ignorado de la farmacología de los antichagásicos. Este estudio sería el primero en su clase en estas drogas.

OBJETIVO

Evaluar el pasaje de drogas antichagásicas (benznidazol o nifurtimox) a la leche materna en mujeres lactantes con enfermedad de Chagas

POBLACIÓN Y MÉTODOS

POBLACIÓN

Estudio de cohorte, prospectivo, de benznidazol o nifurtimox en mujeres lactantes con enfermedad de Chagas para caracterizar el pasaje de estos medicamentos a la leche materna. Este estudio incluirá un total estimado de 16 pacientes (8 tratadas con benznidazol, 8 tratadas con nifurtimox).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Mujeres lactantes con enfermedad de Chagas
- Uso de métodos anticonceptivos

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Antecedentes de alergia o efectos adversos severos asociados al benznidazol o nifurtimox, o alguno de sus excipientes, en la madre o en el bebé amamantado.

- Embarazo
- Enfermedades sistémica significativa que según el criterio del investigador principal interfiera con la interpretación de los resultados
- Madres cuyos bebés lactantes se encuentren recibiendo medicamentos que pudieren presentar eventos adversos similares a los de los medicamentos antichagásicos (vómitos, diarrea, cefaleas o reacciones cutáneas alérgicas etc), que a criterio del investigador pudieren confundir la interpretación de los resultados
- Madres cuyos bebés lactantes presenten enfermedades sistémicas significativas que a criterio del investigador puedan interferir con la interpretación de los resultados

MATERIALES Y MÉTODOS

Cada una de las 16 pacientes recibirá tratamiento adecuado para la enfermedad de Chagas (benznidazol 5mg/kg/día cada 12 horas por 30 días, o nifurtimox 10 – 15 mg/kg/día cada 8 horas por 30 días) con seguimiento de la respuesta mediante un método parasitológico (PCR). El esquema de tratamiento y seguimiento de la enfermedad se llevará a cabo según protocolos de tratamiento. Brevemente, se realizará un examen clínico al ingreso al estudio que incluirá peso y talla, valoración cardiológica (electrocardiograma), estudios de laboratorio clínico (hemograma, hepatograma, creatinina, test de embarazo en mujeres en edad fértil), entre otros. Durante el seguimiento se realizará control clínico, hemograma, hepatograma, y serología de Chagas a los 7, y 30 días del tratamiento, así como serología para Chagas luego de terminado el tratamiento (post-tratamiento). También se realizará evaluación exhaustiva de eventos adversos, especialmente gastrointestinales, neurológicos y dermatológicos.

Se realizará monitoreo clínico, en los días 7, 30 y del control post-tratamiento, de los bebés lactantes de las pacientes que participen en el estudio, incluyendo evaluación de las pautas de crecimiento, peso, talla, perímetro cefálico, alimentación y otros parámetros clínicos que se consideren necesarios. No se realizarán estudios bioquímicos, a menos que se consideren necesarios en casos individuales, debido a la baja o nula exposición esperada de los lactantes a los medicamentos así como a la alta seguridad y ausencia de eventos adversos observada en los lactantes tratados con estos medicamentos (en los que la exposición sistémica es varios ordenes de magnitud superior a la esperada en nuestro estudio).¹²

Al momento del control del día 7 y del día 30 de tratamiento (durante el estadio estacionario), se obtendrán muestras simultáneas de leche materna y sangre para las mediciones de las drogas.

Adicionalmente se obtendrán a lo largo del tratamiento muestras de leche materna según conveniencia del paciente.

Las muestras de leche materna para dosaje de la medicación (aproximadamente 10 ml/muestra) se obtendrán por expresión en un frasco estéril (por ej., de urocultivo), con registro de día y horario de la muestra por parte del paciente. Las muestras se conservarán a -20°C hasta su posterior procesamiento. Las muestras de sangre (5 ml/muestra x 1 muestra) se obtendrán en coordinación con extracciones programadas para estudios diagnósticos o de seguimiento de manera de minimizar las molestias a los participantes.

Determinación de las drogas: el benznidazol y el nifurtimox serán extraídos y cuantificados por HPLC, según protocolos desarrollados por nuestro grupo¹⁵ y publicados en la literatura.¹⁶⁻¹⁹ Las determinaciones de la droga se llevarán a cabo en el Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

MODELADO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

Los parámetros farmacocinéticos de benznidazol (AUC, Ka, Cl aparente, Vd aparente) serán obtenidos por medio del método de farmacocinética poblacional utilizando el software de farmacocinética Winonlin y NONMEM (VII); Los resultados también serán comparados utilizando el método de farmacocinética tradicional (cálculo de AUC, Cmax y vida media para cada grupo y comparación por medio de ANOVA). El modelado y la simulación se llevarán a cabo con el software NONMEM y R.¹⁵

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La evaluación del grado de pasaje de los medicamentos antichagásicos a la leche materna es un paso indispensable para permitir la generalización del tratamiento del Chagas a las mujeres jóvenes lactantes que podrían no presentarse a la consulta médica en otro momento. La mujer lactante no suele recibir tratamiento por temor a la exposición del lactante a las drogas, siendo esta una oportunidad perdida dada la alta frecuencia de embarazos en esta población.

La continuación de la lactancia durante nuestro estudio se encuentra ampliamente justificada por la seguridad de ambas drogas en la infancia, incluyendo el período neonatal, como ha sido demostrado por

estudios de nuestro grupo^{12,20}, y otros.¹¹ Asimismo, modelos teóricos, también realizados por nuestro grupo,¹⁴ sugieren que es altamente improbable que el pasaje a la leche materna de los antichagásicos sea significativo, por lo que no es esperable la aparición de eventos adversos en los bebés amamantados. Por otro lado, los innegables beneficios de la leche materna hacen que la alternativa de suspender la lactancia durante el tratamiento del Chagas no sea una opción aceptable en la mayoría de los casos.

RESULTADOS ESPERADOS

Esperamos que la información obtenida nos permita obtener, por primera vez, información sobre el grado de pasaje del benznidazol y nifurtimox hacia la leche materna, lo que facilitará la evaluación apropiada del riesgo potencial de exposición a través de la leche materna de los bebés amamantados por mujeres que reciban tratamiento para la enfermedad de Chagas. Esto permitirá la implementación del tratamiento en mujeres jóvenes, evitando la aparición de nuevos casos de Chagas congénito en futuros hijos de esas mujeres, y el desarrollo de patología cardíaca y complicaciones graves de la enfermedad de Chagas crónica.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dr. Jaime Altcheh

Miembro de la Carrera de Investigador, GCBA

Servicio de Parasitología y Chagas

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Gallo 1330, C1425EFD,

Ciudad de Buenos Aires. Argentina

COINVESTIGADORES

Dr. Guillermo Moscatelli

Dr. Samanta Moroni

Dr. Facundo Garcia – Bournissen

Servicio de Parasitología y Chagas

Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez

Gallo 1330, C1425EFD,

Ciudad de Buenos Aires. Argentina

Dr. Guido Mastrantonio

Dr. Carlos Omar Della Védova

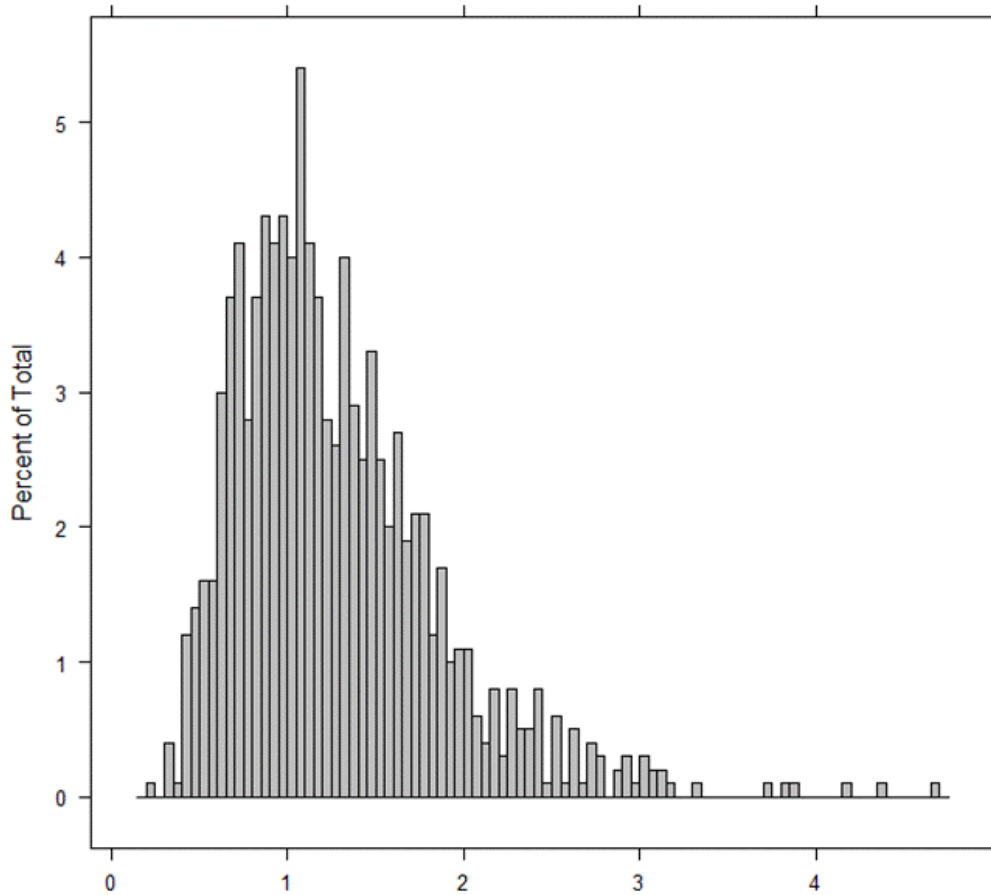
Área de Toxicología, Departamento de Ciencias
Biológicas,

Facultad de Ciencias Exactas, Universidad
Nacional de La Plata.

Calle 1 y 47 (1900) La Plata

La Plata , Pcia de Buenos Aires

FIGURA I



% de pasaje de nifurtimox a la leche materna, comparado con la dosis/kg de peso materna.

Este grafico demuestra que la exposición del lactante a nifurtimox a través de la leche materna sería menor al 4% de la dosis por kg de peso administrada a la madre. Exposiciones menores a 10% son generalmente consideradas seguras.

REFERENCIAS

1. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease & World Health Organization. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva (2002).
2. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease & World Health Organization. Report of the WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2005. World Health Organization, Geneva (2005).
3. Viotti,R. & Vigliano C. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Exp Rev Anti-Infective Ther* 7, 157-163. 2009.
4. Organizacion Mundial de la Salud. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas: conclusiones de una consulta técnica. Washington (1998).
5. Raether,W. & Hanel,H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol. Res.* 90 Supp 1, S19-S39 (2003).
6. Raaflaub,J. & Ziegler,W.H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung.* 29, 1611-1614 (1979).
7. Raaflaub,J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung.* 30, 2192-2194 (1980).
8. Lau,A.H., Lam,N.P., Piscitelli,S.C., Wilkes,L. & Danziger,L.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin. Pharmacokinet.* 23, 328-364 (1992).
9. Urbina,J.A. & Docampo,R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19, 495-501 (2003).
10. Moreno,S.N., Docampo,R., Mason,R.P., Leon,W. & Stoppani,A.O. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 585-591 (1982).
11. de Andrade,A.L. *et al.* Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 348, 1407-1413 (1996).
12. Altchek,J., Moscatelli,G., Moroni,S., Garcia-Bournissen,F. & Freilij,H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* 127, e212-e218 (2011).
13. World Health Organization. WHO model prescribing information drugs used in sexually transmitted diseases and HIV infection. World Health Organization, Geneva (1995).

14. Garcia-Bournissen,F., Altcheh,J., Panchaud,A. & Ito,S. Is use of nifurtimox for the treatment of Chagas disease compatible with breast feeding? A population pharmacokinetics analysis. *Arch. Dis. Child* 95, 224-228 (2010).
15. Altcheh J *et al.* Population pharmacokinetics study of benznidazole in children with Chagas disease. *Worldpharma* 201 (IUPHAR) . 2010.
16. Morilla,M.J., Benavidez,P.E., Lopez,M.O. & Romero,E.L. Liposomal benznidazole: a high-performance liquid chromatographic determination for biodistribution studies. *J Chromatogr. Sci.* 41, 405-409 (2003).
17. Morilla,M.J., Prieto,M.J. & Romero,E.L. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 213-219 (2005).
18. Workman,P., White,R.A., Walton,M.I., Owen,L.N. & Twentyman,P.R. Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br. J. Cancer* 50, 291-303 (1984).
19. Workman,P., Walton,M.I. & Lee,F.Y. Benznidazole: nitroreduction and inhibition of cytochrome P-450 in chemosensitization of tumour response to cytotoxic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 35, 117-119 (1986).
20. Freilij,H. & Altcheh,J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.* 21, 551-555 (1995).