

Estudio cronofarmacocinético del fenobarbital en perros sanos.

Chronopharmacokinetic study of phenobarbital in dogs.

Germán Zurbriggen¹ MV; **Diego Graiff**¹ MV, MSc; **María Dolores San Andrés Larrea**² MV, PhD; **MaríaVictoria Barahona Gomariz**² MV, Phd; **Marcelo Priotto**¹ MV; **Marcela Faya**¹ MV, EMAP. PhD.

Recibido: Julio 2012
Aceptado: Agosto 2012

Resumen

El fenobarbital sódico es un barbitúrico utilizado como agente anticonvulsivante. Presenta ciertos efectos colaterales como sedación, ataxia, polidipsia, poliuria y polifagia, que tienden a desaparecer en pocos días. La cronofarmacocinética estudia las variaciones farmacocinéticas de los fármacos a lo largo de un ritmo biológico. El objetivo fue establecer las posibles influencias de los ritmos biológicos en el comportamiento farmacocinético del fenobarbital en perros. Se utilizaron 6 perros, adultos, mestizos, hembras, en anestro y en correcto estado sanitario. Fueron tratados con Fenobarbital sódico FADA (5%) a dosis de 5 mg/Kg vía endovenosa lenta. El régimen de luz fue natural propio de los meses abril y mayo, en Córdoba, Argentina. Tres animales fueron tratados a las 11:30 horas y los otros tres a las 00:00hr invirtiéndolos luego de cuatro semanas. La sangre se extrajo a tiempo prefijado durante diez días y fue cuantificada con el método de inmunoensayo de fluorescencia polarizada. El análisis farmacocinético se realizó con el programa de ajuste farmacocinético lineal (PKSOLUTION) y el análisis estadístico mediante un test t-student. Existieron diferencias significativas en el aclaramiento ($p=0,0244$). A futuro, sería necesario incrementar el "n" y disminuir el intervalo entre administraciones (cada 6 hr.) para definir más precisamente la curva de variación cronobiológica.

Palabras Claves: Cronofarmacología, Fenobarbital sódico.

Summary

Sodium phenobarbital is a barbituric used as an anticonvulsive agent. It presents several collateral effects such as sedation, ataxia, polydipsia, polyuria, polyphagia, which tend to disappear in a few days. Chronopharmacokinetic studies the pharmacokinetic variations of drugs, all along a biological rhythm.

Our objective is to establish the possible influence of the biological rhythms on the pharmacokinetic behavior of phenobarbital in dogs.

We used 6 dogs, adults, mixed, female, anoestrus and in proper sanitary conditions. They were treated with Phenobarbital sodium FADA (5%) at doses of 5 mg/kg intravenously, applied slowly. Light was natural, typical of the months of April and May in Cordoba.

Three animals were treated at 11:30 am and the other three at 24:00 pm. After four weeks this procedure was inverted.

Blood was collected at a prefixed hour during ten days and was quantified with the method of fluorescence polarization immunoassay.

The pharmacokinetic analysis was adjusted with the lineal pharmacokinetic program (PKSOLUTION) and the statistical analysis, using a test t-student. There were significant differences in clearance ($p=0,0244$). In the future it would be necessary to increase the "n" and reduce the interval between the administrations of the drug (every 6 hs), to define more precisely the variation in the chronobiology curve.

Keywords: Chronopharmacology, Phenobarbital sodium.

Introducción

El fenobarbital sódico es un barbitúrico de acción larga utilizado, fundamentalmente, como agente anticonvulsivante. Entre sus contraindicaciones se encuentran enfermedad hepática grave, nefritis o depresión respiratoria grave¹. A su vez, se pueden nombrar ciertos efectos colaterales, al inicio del tratamiento, entre los que destacan sedación, ataxia, polidipsia, poliuria, polifagia; signos clínicos que tienden a desaparecer a medida que la fármaco alcanza el estado estacionario (7 a 10 días de tratamiento). Tras la estabilización de los niveles plasmáticos comienzan a desaparecer la ataxia y sedación, pudiendo persistir los demás signos clínicos, principalmente la polifagia. Su uso sistemático produce inducción enzimática

hepática, con autoinducción, por lo que sus niveles séricos deben ser controlados periódicamente.²

La homeostasis fue definida por Claude Bernard en 1878 (del griego *homeo* que significa «similar», y *stasis*, «estabilidad») como la capacidad que tienen los organismos vivos de adaptarse a las características variables del medio ambiente, manteniendo prácticamente inalteradas sus constantes biológicas (temperatura corporal, niveles hormonales, frecuencia cardíaca, etc.).³ Esto supone la aparición de mecanismos endógenos capaces de modificar el llamado "medio interno", con la finalidad de adaptarse constantemente a las variaciones ambientales.⁴

¹ Hospital Veterinario, Universidad Católica de Córdoba, Av. Armada Argentina 3555, Córdoba, Argentina.

² Dpto. de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, Madrid, España.

El avance en las técnicas analíticas, ha demostrado que las constantes biológicas manifiestan fluctuaciones, que se ajustan a una periodicidad cíclica. Estos ciclos se repiten a intervalos prácticamente regulares dando origen a un *ritmo biológico*, que atendiendo al intervalo de tiempo se pueden manifestar cada pocas horas generando los ciclos *ultradianos*, cada 24 horas dando lugar a los *ritmos circadianos*, cada semana, mes o estación del año siendo estos los ritmos *infradianos*. También existen *ritmos plurianuales*, en relación con el movimiento cíclico del cosmos.⁴ Desde un punto de vista clínico, el más importante es el ritmo circadiano, regulado por las horas de luz-oscuridad o, mejor dicho, por el ciclo vigilia-sueño. Se entiende como cronofarmacología la ciencia que estudia los conceptos o la influencia de los ritmos biológicos y los relaciona con los conocimientos propios de la farmacología. Son ramas de la cronofarmacología la cronocinética o cronofarmacocinética, que estudia las variaciones farmacocinéticas de los fármacos a lo largo de un ritmo biológico; la cronestesia, que estudia las variaciones cronobiológicas de los receptores o lugares de acción de los fármacos en función del momento del ritmo biológico; y la cronérgia, encargada de estudiar el efecto propio del fármaco producto de la interacción entre la cronocinética y la cronestesia.⁴ Basado, entre otros aspectos, en que el fenobarbital presenta una unión a proteínas plasmáticas (principalmente a la albúmina) del 45%,⁵ que existen variaciones circadianas en las concentraciones séricas de albúmina en perro⁶ o, que según algunos autores en seres humanos y ratas el nivel de proteínas plasmáticas decrece durante el período de descanso (nocturno), modificando la biodisponibilidad del fármaco, es que se plantea como hipótesis la posible variación cronofarmacocinética del fenobarbital sódico en caninos. Otro indicio que reafirma la necesidad de elaborar esta hipótesis se basa en que existen variaciones circadianas en los parámetros farmacocinéticos tras la administración oral de hexobarbital en esta especie.⁸

El objetivo general de este trabajo fue establecer las posibles influencias de los ritmos biológicos en la caracterización del comportamiento farmacocinético del fenobarbital en perros sanos. Teniendo como objetivos específicos el sentar las bases para posteriores estudios cronofarmacocinéticos del fenobarbital en animales en distintos estados fisiológicos y bajo distintas situaciones ambientales, así como el de valorar la posible utilización de los resultados obtenidos, para establecer regímenes terapéuticos en perros que presenten distintos síndromes epilépticos, optimizando su uso y disminuyendo la aparición de reacciones adversas.

Materiales y métodos

Animales:

Se utilizaron 6 perros mestizos hembras, pertenecientes a los caniles de la Universidad Católica de Córdoba. Su edad osciló entre los 3 y 4 años de edad y con un peso de entre 14 y 19 Kg. Se aseguró el correcto estado sanitario de los animales estudiados corroborando la ausencia de signos clínicos de enfermedad infecciosa o parasitaria y realizando chequeos clínicos y análisis bioquímicos (hemograma completo, perfil renal de urea y creatinina, perfil hepático con GOT, GPT, FA, albúmina y bilirrubina (BD, BI, BT). Dicho control general se realizó 7 días antes de iniciar la experiencia. Los animales fueron alimentados con pienso comercial administrado dos veces al día (125 - 175 g) y agua *ad libitum*. El régimen de luz fue el natural y se correspondía con la distribución luz-oscuridad propia de los meses abril y mayo, en Córdoba, Argentina. Para dicho trabajo, se cumplió con todas las normas establecidas por el centro de Bioética de la Universidad Católica de Córdoba.

Fármaco y Dosis:

Fenobarbital sódico inyectable FADA (5%). La dosis seleccionada fue de 5 mg/Kg por vía IV lenta.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño cruzado en el que los animales fueron enumerados y divididos aleatoriamente en dos grupos de 3 animales cada uno (A y B), a los cuales, previo ayuno de 12 horas, se les administró el fenobarbital a la dosis elegida en la vena yugular derecha, en horas contrapuestas: 11:30 horas para el grupo A y 00:00 horas para el grupo B. Tras un período de descanso de 4 semanas, se invirtieron los grupos designándole al grupo B el horario diurno (12:00 horas) y al grupo A el horario nocturno (00:00 horas).

Toma de muestras

Se extrajeron con jeringas desechables 5 ml de sangre de las venas cefálicas antebraquiales y, como última alternativa, de la vena yugular opuesta a la de la administración. Los tiempos de extracción post-administración fueron: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 36; 48; 72; 96; 120; 168 y 240 horas. Inmediatamente después de la extracción, la sangre se traspasó a tubos de ensayo rotulados, se dejó coagular y luego se separó el suero mediante centrifugación. Dicho proceso fue realizado a 3500 rpm durante 10 min. Las muestras se dividieron en dos alícuotas en tubos eppendorf. Una de ellas se congeló a -20°C y la otra se mantuvo en refrigeración hasta su envío al laboratorio de análisis, manteniendo en

todo momento la cadena de frío.

Previamente a comenzar la segunda etapa del estudio, se realizó una nueva toma de muestra, para comprobar el nivel cero de fenobarbital en sangre de cada animal. Durante este período, por razones de bienestar animal, se tuvo que apartar un animal, lo que obligó a realizar el análisis estadístico con cinco animales (n=5) en vez de seis (n=6) como se había planteado inicialmente.

Método de cuantificación

Para la cuantificación del fármaco en sangre, se utilizó *inmunoensayo de fluorescencia polarizada* (FPIA) utilizando reactivos y autoanalizador TDx de la firma Abbott. Las muestras se procesaron por triplicado informándose el promedio de las tres lecturas. Los resultados fueron corroborados por cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) (datos no publicados).

Procesamiento de datos

Análisis farmacocinético

Los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidos de cada animal se ajustaron a un modelo no compartimental mediante el programa de ajuste farmacocinético lineal (PKSOLUTION).

Análisis estadístico

Las medias aritméticas de los valores de los parámetros farmacocinéticos principales, para cada grupo, se compararon mediante métodos paramétricos con un test *t-student*, con la ayuda del programa informático *Infostat*®.⁹

Resultados y discusión

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos y la representación gráfica de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo, mañana respecto a la noche, quedan reflejados en la tabla 1 y gráfico 1, respectivamente.

Para este trabajo se utilizó la vía de administración endovenosa, a tiempos que resultaron adecuados al fin previsto,¹⁰ con el objeto de analizar el comportamiento del fármaco sin las posibles interferencias que pudieran surgir tras su administración por otras vías, como consecuencia de los fenómenos de absorción, especialmente por la interacción del fármaco con la dieta. De esta manera, se podrían atribuir las posibles modificaciones en su comportamiento al factor "hora de administración" junto con las variaciones inter e intra individuales. Por esa razón, se utilizó un diseño cruzado, de forma que se redujeran al máximo esos factores. De otro modo, hubiera sido necesario un número más elevado de animales, que permitiera contrarrestar los efectos de variabilidad de otras vías de administración o un diseño en paralelo, efecto arrastre, etc. No obstante y a tenor de la variabilidad expresada en las desviaciones estándar (tabla 1) se *justificaría* la realización de nuevas experiencias con "n" mayores. El "n" estimado para variables cuantitativas es de once (n=11), para lo cual se calculó el "n" de cada parámetro farmacocinético y en cada horario (mañana y noche), luego se calculó el promedio entre los valores diurnos y nocturnos y se expresó en la Tabla 1, como "n" promedio.

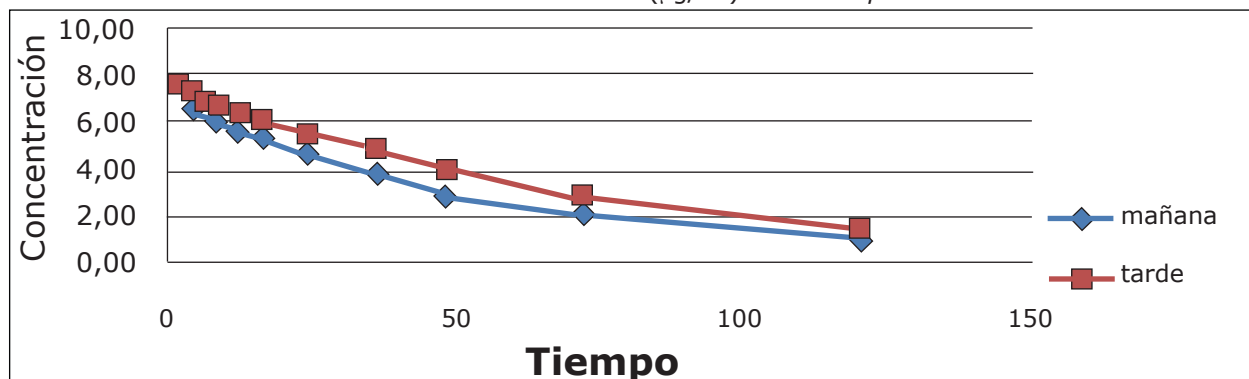
Se puede observar que sólo existen diferencias significativas en el *aclaramiento* (Cl) ($p=0,0244$), no observándose en el resto de los parámetros farmacocinéticos, pudiéndose atribuir este hecho al bajo tamaño muestral (n=5), como se comentó, si bien éste es un estudio preliminar.

El volumen de distribución (Vd), a pesar de no mostrar diferencias significativas entre los grupos de mañana y noche, como consecuencia de la DS del grupo de mañana, se vio, levemente, aumentado tras la administración matinal. Los dos factores que podrían influir serían la unión a proteínas y el pH. La unión a proteínas plasmáticas es mayor por la mañana³, pero al ser

Tabla Nº1: Parámetros farmacocinéticos, "n" calculados y nivel de significancia ($p<0,05$)

	Mañana	Noche	"n" promedio	p-valor
Semivida (h)	40,60 ± 8,80	50,80 ± 22,10	10,65*	0,0696
ABC (µg-h/ml)	324,32 ± 95,75	463,5 ± 135,60	7,79*	0,0720
MRT (ml/h)	57,58 ± 11,85	72,26 ± 30,90	10,16*	0,2108
Vd (ml/kg)	700 ± 141,40	620 ± 44,70	2,10*	0,5864
Cl (ml/h/Kg)	12,8 ± 3,95	9,6 ± 3,25	9,46*	0,0244

*Los valores de "n" fueron calculados con la formula: $n = \frac{(2t_{(1-\alpha/2)} S)^2}{e^2}$

Gráfico N°1: Concentración de fenobarbital sódico ($\mu\text{g/ml}$) en el tiempo.

relativamente baja su capacidad de unión (45%), la influencia no debería ser muy grande; por otro lado, el pH sanguíneo en perros es menor en las horas nocturnas y como el fenobarbital es un base débil ($pK_a=7,3$) cuyo grado de ionización se modifica por el pH del medio en el que se encuentra, los valores mayores de pH en las horas matutinas permitirían que un porcentaje más alto del fármaco se encuentre en forma no ionizada, facilitando una mayor distribución hacia los tejidos en ese horario y, consecuentemente, habría una menor concentración plasmática, que redundaría en un mayor Vd.

Los fármaco con un aclaramiento más intenso presentan un ABC menor,^{11,12} como consecuencia del mayor grado de eliminación. La diferencia en el aclaramiento (CI) coincide con los resultados publicados,⁴ en el que el CI es más intenso por la mañana, generando así un descenso diurno más pronunciado de los niveles plasmáticos del fármaco. Por vía renal se elimina hasta un 25% del fenobarbital, siendo este valor variable en función del pH urinario. Valores mayores de pH sanguíneo matinal⁸ inducirían una alcalinización de la orina lo que llevaría a un mayor aclaramiento renal del fármaco. Otro de los factores que afectan el aclaramiento renal es el flujo sanguíneo renal y hepático, que al encontrarse disminuidos en la horas de descanso (noche), podría explicar por qué este parámetro es menor por la noche,⁸ además de una actividad más reducida de la capacidad metabólica del citocromo P-450.

Por otro lado es conocida la capacidad de inducción enzimática del fenobarbital sobre las isoformas que lo metabolizan (CYP2C9 y CYP 2C19), pudiendo aumentar la velocidad de aclaramiento, así como acelerar su propia tasa metabólica, pero este proceso no puede ser considerado en este trabajo ya que se realizó el estudio en dosis única, no pudiendo generar esa inducción. Para profundizar en el comportamiento cronofarmacocinético del fenobarbital, es necesaria la realización de estudios con una posología de

dosis múltiples y, a más largo plazo, teniendo en cuenta que con este tipo de intervención farmacológica se podría lograr una concentración plasmática terapéutica, en el estado estacionario, deseada para la terapéutica anticonvulsivante.^{1,10} También y con objeto de aproximarse más a la realidad clínica se usaría la vía oral, cuyos procesos de absorción se pueden ver más influenciados por las variaciones circadianas.

Conclusiones

Existen diferencias en el aclaramiento ($p=0,0244$) en caninos sanos, tras la aplicación de fenobarbital sódico por vía IV, que justificarían la modificación posológica.

Debido a la gran variabilidad encontrada en los datos, es necesario incrementar el tamaño muestral.

De cara a futuros estudios, sería interesante conocer de forma más precisa la curva de variación cronobiológica; el MESOR (Midline Estimating Statistic Of Rhythm), la amplitud y, sobre todo, la acrofase (momento de máximo valor del ritmo). Esto se logra disminuyendo el intervalo entre administraciones (por ejemplo: 6 horas) y estableciendo así el momento de máxima y mínima concentración en el organismo, pudiendo diseñar un régimen terapéutico más eficaz minimizando los efectos secundarios.

Agradecimientos

A la Universidad Católica de Córdoba, a la Universidad Complutense de Madrid, a los Drs. Cristian Hansen y Andrés Suárez del Laboratorio de Toxicología LACE - Centro de Tomografía Computada Oulton, Córdoba-Argentina y a Royal Canin Argentina.

Referencias Bibliográficas

1. Plumb D C. Manual de farmacología veterinaria (3ª ed.). Inter-medica. Argentina; 2006.
2. Pellegrino F. C. Suraniti A. Garibaldi L. El Libro de Neurología para la práctica clínica (1ª ed.). Buenos Aires: Inter-médica. Argentina; 2003.
3. Díaz D C. Cronofarmacocinética del meclofenamato sódico en bovinos. 3ª Reunión de comunicaciones científicas de la carrera de veterinaria Facultad de ciencias veterinarias UNL. Perú; 2001.
4. Betes de Toro M. Cronofarmacología Clínica: Principios y aplicaciones terapéuticas. Medicina Clínica; 1994, 102: 150-155.
5. Boothe D M. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 2º ed. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza. España; 2001.
6. Widenhorn N I. Ritmos circadianos de la albúmina sanguínea en caninos. XXVII Jornadas de actualización en Ciencias Veterinarias 2007, Villa Giardino- Córdoba. Argentina.
7. Boggio, J.; Encinas, T.; Rodríguez, C.; San Andrés, M. Rhythmic variations of pharmacokinetics processes of cyproterone acetate in rabbits. Biological Rhythm Research; 2001 a, 32 (4):401 – 411.
8. Widenhorn, N I. Estudio cronofarmacocinético de gentamicina en caninos. Memoria de la Maestría en Ciencias Veterinarias .Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Agrarias y Ciencias Veterinarias. Argentina; 2002.
9. Balzarini M. González L. Tablada E. Casanoves F, Di Rienzo J. Robledo C. Infostat version 2004. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
10. Pedersoli W M. Wike J S. Ravis W R. Pharmacokinetics of single doses of phenobarbital given intravenously and orally to dogs. American Journal of Veterinary Research; 1987, 48(4): 679-683.
11. Boggio J. Sanchez S. Valtorta S. Mc Kellar Q. Cronobiological variation of indomethacin pharmacokinetics in sheep. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics; 2001 b, 24 (4): 261-226.
12. Adams H R. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 8ª ed. Iowa. State University Press. USA; 2008.