



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Tesis de Doctorado en Química

# Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de los medicamentos

Q.F. Manuel Ibarra

Directores

Prof. Marta Vázquez

Prof. Pietro Fagiolino

Facultad de Química

Universidad de la República

Uruguay

La defensa oral de la Tesis fue realizada el 15 de diciembre de 2014, frente a un tribunal examinador conformado por los Profesores: Dr. Hugo Cerecetto (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay), Dr. Álvaro Mombrú (Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay) y Dr. Modesto Rubio (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina).

## INDICE DE CONTENIDOS

---

Resumen.....	1
Listado de artículos científicos .....	2
Abreviaciones utilizadas .....	3
CAPITULO 1. Introducción, objetivos y metodología general.....	4
CAPITULO 2. Influencia del sexo en la biodisponibilidad y bioequivalencia de comprimidos conteniendo lopinavir y ritonavir .....	31
CAPITULO 3. Respuesta farmacocinética a ciclosporina A formulada como microemulsión .....	50
CAPITULO 4. Bioequivalencia de antirretrovirales inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos.....	63
CAPITULO 5. Recirculación de nevirapina: farmacocinética poblacional mediante modelos no lineales de efectos mixtos.....	75
CAPITULO 6. Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética del ácido valproico .....	92
CAPITULO 7. Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de fenitoína .....	106
CAPITULO 8. Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de los medicamentos: conclusiones generales.....	118
Agradecimientos.....	127
Referencias .....	128

## Resumen

---

Al administrar un medicamento a un individuo se busca producir una respuesta clínica específica a través de un efecto farmacológico determinado en gran parte por la respuesta farmacocinética, es decir, por las cantidades de fármaco presentes a lo largo del tiempo en los diferentes tejidos y fluidos del cuerpo humano. Medicamento y organismo conforman un complejo sistema que debe ser correctamente interpretado para cumplir con los objetivos terapéuticos de eficacia y seguridad al diseñar un tratamiento farmacológico. La natural variabilidad fisiológica que presentan los individuos a lo largo de una población exige racionalizar la instauración de los mismos, ya que posee un gran impacto en el destino de un fármaco administrado.

El sexo como característica fisiológica divide a la población en dos mitades, su relevancia en el campo de la medicina es altamente notoria, hombre y mujer al interactuar con un medicamento componen sistemas diferentes. Es de esperar entonces que ciertas características específicas al sexo del paciente puedan condicionar el éxito de un tratamiento farmacológico.

Durante esta tesis doctoral se analizó la influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de principios activos correspondientes a diversos grupos farmacológicos dividiendo el análisis en dos bloques: su efecto sobre la evaluación de biodisponibilidad de medicamentos y su efecto sobre la disposición de fármacos.

La diferente discriminación de marcas comerciales de medicamentos que pueden hacer hombres y mujeres, y sus consecuencias sobre las conclusiones de un ensayo de bioequivalencia promedio no habían sido analizadas hasta el momento en profundidad. El análisis realizado demuestra la importancia de tener en cuenta el sexo en la evaluación de bioequivalencia y de diseñar ensayos clínicos a modo de obtener conclusiones sobre ambos grupos.

Los resultados hallados aumentan la evidencia respecto a diferentes respuestas farmacocinéticas en hombres y mujeres. Se incorpora la recirculación de fármacos como proceso de disposición relevante, y se introducen modelos no lineales de efectos mixtos para describir y cuantificar su contribución.

Al indicar un medicamento, el sexo del paciente debe ser considerado ya que de acuerdo a las características del mismo podría tener un significativo efecto sobre el resultado clínico del tratamiento.

## Listado de artículos científicos

---

La presente tesis doctoral dio lugar a la publicación de los artículos científicos listados a continuación en orden cronológico. Durante el documento estos artículos serán referenciados de acuerdo a esta numeración.

- I. Ibarra M., Fagiolino P., Vázquez M., Ruiz S., Vega M., Bellocq B., Pérez M., González B., Goyret A. (2012). *Impact of food administration on lopinavir-ritonavir bioequivalence studies. European Journal of Pharmaceutical Sciences* 46: 516 – 521.
- II. Ibarra M., Vázquez M., Fagiolino P., Derendorf H. (2013). *Sex related differences on valproic acid pharmacokinetics after oral single dose. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 40(4): 479 – 486.
- III. Fagiolino P., Vázquez M., Ibarra M., Magallanes L., Guevara N., Fotaki N. (2014). *Sex- and smoke-related differences in gastrointestinal transit of cyclosporin A microemulsion capsules. European Journal of Pharmaceutical Sciences* 63: 140-146.
- IV. Ibarra M., Vázquez M., Fagiolino P. (2014). *Population pharmacokinetic model to analyze nevirapine multiple-peaks profile after a single oral dose. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 41(4): 351-362.
- V. Vázquez M., Fagiolino P., Ibarra M., Magallanes L. (2014). *Safety assesment of efavirenz after a single-dose bioequivalence study: a trend to correlate central nervous system effect and plasma concentration. International Journal of Pharmacy* 5(1). Aceptado para publicación.

## Abreviaciones utilizadas

---

ANOVA – Análisis de la varianza.

$AUC_{\infty}$  – Área bajo la curva (concentración versus tiempo) integrada desde cero hasta infinito.

$AUC_T$  – Área bajo la curva (concentración versus tiempo) integrada desde cero hasta un tiempo específico denominado T.

BOV – Variabilidad interocasión.

BSV – Variabilidad interindividual.

CL – Clearance plasmático total de eliminación.

$C_{MAX}$  – Concentración máxima.

$C_{MAX}/AUC$  – Cociente entre  $C_{MAX}$  y  $AUC_{\infty}$ .

CV – Coeficiente de variación (desviación estándar relativa a la media).

$CV_{RES}$  – Coeficiente de variación estimado para la varianza residual en ensayos de bioequivalencia.

HPLC – Cromatografía líquida de alto rendimiento.

IC – Intervalo de confianza.

$k_A$  – Constante de absorción de primer orden.

$k_{EL}$  – Constante de eliminación de primer orden.

LI – Liberación inmediata.

LLOQ – Límite inferior de cuantificación.

LR – Liberación retardada.

Q – Clearance de distribución intercompartimental.

$T_{MAX}$  – Tiempo al cual ocurre la  $C_{MAX}$ .

$T_0$  – Tiempo de latencia en el ingreso de fármaco luego de una administración oral.

$t_{1/2}$  – Semivida de eliminación.

ULOQ – Límite superior de cuantificación.

$V_C$  – Volumen de distribución del compartimento central.

$V_D$  – Volumen de distribución área (o de pseudoequilibrio).

## **CAPITULO 1. Introducción, objetivos y metodología general**

---

### **Definiciones generales**

La administración de un medicamento a un paciente se considerará exitosa siempre y cuando cumpla con dos objetivos: ser eficaz y ser seguro. Ambos objetivos refieren a la respuesta farmacodinámica (PD) que provocará el fármaco contenido en dicho medicamento, determinada por un mecanismo específico de acción farmacológica que desencadenará efectos bioquímicos y fisiológicos para finalmente producir un resultado clínico observable [1]. La eficacia se conseguirá cuando este último sea beneficioso en cuanto a la prevención, mitigación o eliminación de una enfermedad. El perfil de seguridad a conseguir dependerá de las características del fármaco, pero consistirá en disminuir al máximo la ocurrencia de efectos bioquímicos y fisiológicos que desencadenen un resultado clínico adverso para la salud del paciente. A pesar de que los tratamientos medicamentosos deben estar condicionados y construidos en base a la respuesta clínica, la correlación entre dosis e intensidad de efectos resulta altamente imprecisa, dada la dificultad existente para observar y cuantificar la intensidad de todos los efectos que podría estar provocando un fármaco. Diferentes individuos que reciben idénticas dosis del mismo medicamento presentarán probablemente respuestas farmacodinámicas diferentes.

La respuesta farmacodinámica, que en su conjunto puede ser descrita como “lo que el medicamento le hace al organismo”, se encuentra condicionada por la exposición al fármaco existente en aquellos tejidos o fluidos donde se produce la acción farmacológica, denominados “sitios de acción” o “biofase”. Esta exposición está a la vez condicionada por los procesos a los cuales es sometido un medicamento al administrarlo en el organismo, desde el ingreso de fármaco a la circulación sanguínea pasando por su distribución en los distintos órganos corporales hasta la eliminación mediante biotransformación enzimática y/o excreción. El perfil de concentraciones de fármaco en fluidos biológicos, obtenido como resultado de dichos procesos, conforma la respuesta farmacocinética (PK), que puede ser descrita a su vez como “lo que el organismo le hace al medicamento”[2]. La utilización de concentraciones de fármaco para estimar intensidad de efectos reduce el número de variables en juego y por tanto resulta más precisa: diferentes individuos que presenten idéntica concentración de fármaco en sitio de acción exhibirán muy probablemente similar intensidad de efecto.

La interacción medicamento-organismo representada por la respuesta PK/PD, lejos de conformar un sistema determinista, estará siempre asociada en mayor o menor medida a componentes de variabilidad. Diversos factores pueden explicar dicha variabilidad (tabla 1.1), tanto asociados al medicamento (dosis de fármaco, excipientes, tecnología de fabricación) como al organismo (demográficos, fisiológicos, fisiopatológicos, genéticos, ambientales, etc.).

**Tabla 1.1. Factores asociados a variabilidad farmacocinética**

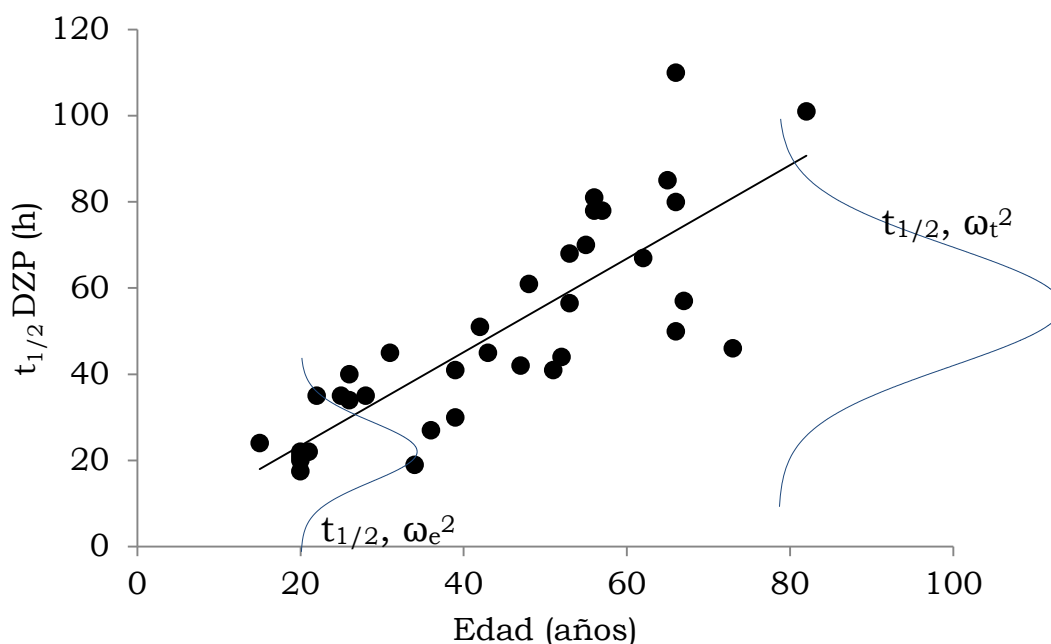
Demográficos	Sexo, edad, etnia, peso corporal, etc.
Ambientales	Dieta, consumo de tabaco, consumo de xantinas, comedicación, etc.
Fisiológicos - Fisiopatológicos	Ciclo menstrual, embarazo, menopausia, ritmos circadianos, insuficiencia renal/hepática, sepsis, etc.
Genotipo	Polimorfismo enzimático, transportadores de membrana, etc.
Asociados al medicamento	Excipientes, dosis real, rendimiento <i>in vivo</i> (liberación, disolución), tecnología de fabricación, forma farmacéutica.

El análisis poblacional describe a la variabilidad en términos de *efectos fijos* y *aleatorios*. Los efectos fijos son los parámetros PK/PD medios que presenta un fármaco en una población de individuos, los cuales podrían estar condicionados por los factores antes mencionados. Los efectos aleatorios cuantifican la variabilidad no explicada por los efectos fijos: la variabilidad interindividual e intraindividual del sistema medicamento-individuo. La estimación de ambos tipos de efectos permite: a) reconocer factores que aportan significativamente a la variabilidad poblacional de un parámetro; b) cuantificar la influencia de dichos factores como parte de los efectos fijos disminuyendo la magnitud de los efectos aleatorios (explicar la variabilidad); y c) optimizar el diseño de regímenes posológicos: al reducir la variabilidad no explicada aumenta la probabilidad de éxito terapéutico en el tratamiento medicamentoso.

Ejemplificando, Klotz *et al.* reportaron en 1975 que la semivida de eliminación del diazepam ( $t_{1/2}$  DZP) aumentaba en función de la edad del individuo [3], es decir, la variabilidad de este parámetro farmacocinético en el conjunto de la población fue explicada en gran parte por la variabilidad en la edad de cada sujeto. Al incluir a la edad como covariable en  $t_{1/2}$  DZP cuantificando su efecto fijo sobre la media poblacional, el efecto aleatorio restante fue sustancialmente reducido (Figura 1.1). La variabilidad



interindividual restante corresponde a la variabilidad no explicada dentro de cada franja etaria.



**Figura 1.1.** Adaptada de Klotz *et al.* [3]. La variabilidad interindividual en la semivida de eliminación de diazepam ( $\omega_t^2$ ) disminuye considerablemente ( $\omega_e^2$ ) al incluir la edad como covariable. El cambio farmacocinético que explica esta correlación es un aumento del  $V_D$  de DZP secundario a la redistribución del flujo sanguíneo que tiene lugar durante el envejecimiento.

En la práctica clínica la respuesta farmacocinética se ha caracterizado generalmente a través de la medición de concentraciones plasmáticas, las cuales subrogan a las concentraciones en biofase en la estimación del efecto provocado por un fármaco. Esto sucede simplemente porque el plasma es el fluido que conecta a todos los órganos de la economía, y desde el cual las sustancias circulantes establecen equilibrios con el espacio extravascular. Medir concentraciones en biofase resultaría altamente invasivo e ineficiente: deberíamos obtener niveles de fármaco en varias zonas del organismo a fin de estimar la respuesta farmacodinámica completa.

La farmacocinética es el estudio cuantitativo de la interacción medicamento-organismo basado en el análisis de concentraciones de fármacos y/o metabolitos a lo largo del tiempo. Se construyen modelos matemáticos que adecuadamente describan los mencionados perfiles de manera de utilizarlos luego para simular y predecir la exposición al fármaco bajo diferentes situaciones.

La farmacocinética poblacional es el área de la farmacología clínica dedicada a la evaluación cuantitativa de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y su variabilidad interindividual, interocasión (intraindividual)

y residual que explican los procesos de absorción, distribución y eliminación de un fármaco. La *variabilidad residual* incluye a la variabilidad no explicada por un modelo farmacocinético (diferencias entre predicciones y observaciones). Presenta entre otros componentes: error analítico en la medición de concentraciones de fármaco, error asociado a la aplicación de un modelo farmacocinético dado para explicar un proceso biológico y variabilidad asociada al medicamento [4]. La figura 1.2 ilustra el concepto mediante un modelo básico: ingreso y distribución instantánea de fármaco con eliminación monoexponencial (cinética de primer orden). El cambio de concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo es función de dos parámetros: tasa de eliminación (*clearance*, CL) y volumen de distribución ( $V_D$ ). Tanto para éstos como para otros parámetros biológicos, se asumirá una distribución log-normal en una población de individuos de acuerdo a:

$$CL_{il} = CL_P * e^{(\eta_i + \kappa_l)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $CL_P$  es la tendencia media poblacional (efecto fijo) del *clearance* y  $CL_{il}$  es el valor que toma para el individuo  $i$  en la ocasión  $l$ , cuyo apartamiento del valor medio estará dado por las magnitudes de  $\eta$  y  $\kappa$  en dicho individuo. Para estas variables se asume distribución normal:  $\eta \sim N(0, \omega^2)$ ,  $\kappa \sim N(0, \pi^2)$ . Las varianzas  $\omega^2$  y  $\pi^2$  cuantifican entonces la variabilidad interindividual y la variabilidad interocasión o intraindividual, y forman parte de los efectos aleatorios. Asumiendo entonces un modelo farmacocinético de un compartimiento con eliminación según una cinética de primer orden con constante  $\lambda = CL_{il}/V_{Dil}$ , podremos estimar el devenir de las concentraciones plasmáticas en el individuo  $i$  con el tiempo luego de administrar una dosis (D) por vía intravenosa según:

$$C_{il}(t) = \frac{D}{V_{Dil}} e^{-\lambda_{il} \times t_j} + \varepsilon_{ilj} \quad (\text{Ecuación 2})$$

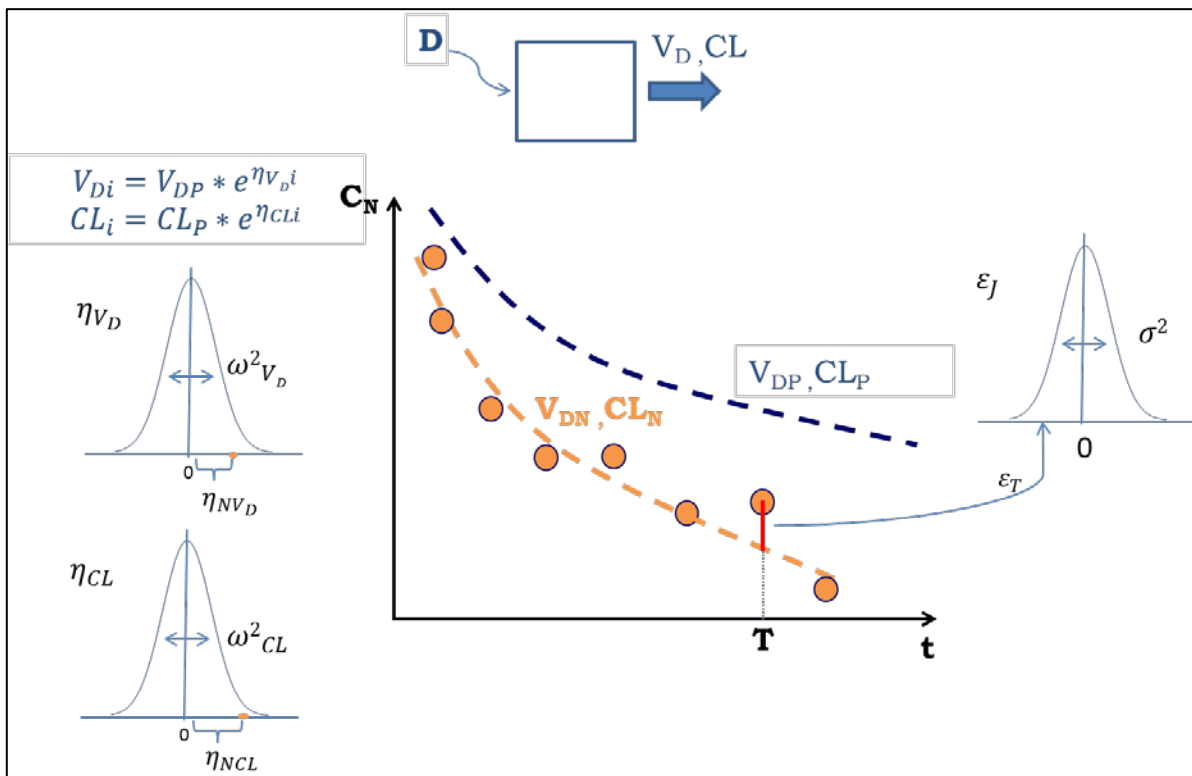
Donde  $\varepsilon_{ilj}$  cuantifica la variabilidad residual para las concentraciones del sujeto  $i$ , en la ocasión  $l$ , a tiempo  $j$ . Si bien la variabilidad residual se incluye en este caso de acuerdo a un modelo aditivo podría ser incluida con un modelo proporcional, exponencial o combinado (aditivo y proporcional) según la naturaleza de los datos farmacocinéticos en cuestión. Se asumirá distribución normal para el error residual en torno a cero con varianza  $\sigma^2$ :  $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ .

Este tipo de modelos, que incluyen efectos fijos y aleatorios, se conocen como modelos de efectos mixtos. En farmacocinética poblacional, como las funciones que describen la variable dependiente (concentración) son de naturaleza no lineal, se utilizan modelos no lineales de efectos mixtos. La

estructura general de un modelo no lineal de efectos mixtos puede ser expresada según la siguiente ecuación:

$$y_{ij} = f(I_{ij}, X_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación 3})$$

siendo  $y_{ij}$  la variable dependiente observada para el sujeto  $i$ , en la ocasión  $l$ , a tiempo  $j$ .  $y_{ij}$  es descrita por una función de vectores de variables independientes  $I_{ij}$ , y parámetros individuales  $X_{ij}$ . En farmacocinética, las variables independientes que usualmente afectan al sistema son dosis y tiempo, aunque el vector  $I_{ij}$  puede incluir otros factores denominados covariables para mejorar la descripción de la variable dependiente. En la presente tesis, se hará especial énfasis en analizar la significancia del sexo como covariable de la respuesta farmacocinética.



**Figura 1.2.** Predicción de la respuesta farmacocinética observada en el sujeto N (círculos naranjas) mediante un modelo de un compartimiento. Considerando los parámetros  $V_{DP}$  y  $CL_P$  (estimados con  $\eta=0$ ) se obtiene la respuesta media poblacional (línea punteada azul). Estimando los parámetros para el sujeto N ( $\eta_{V_D} = \eta_{NV_D}$ ,  $\eta_{CL} = \eta_{NCL}$ ) se obtiene la función de mejor ajuste a los datos observados. Se ignora en este ejemplo la variabilidad interocasión.

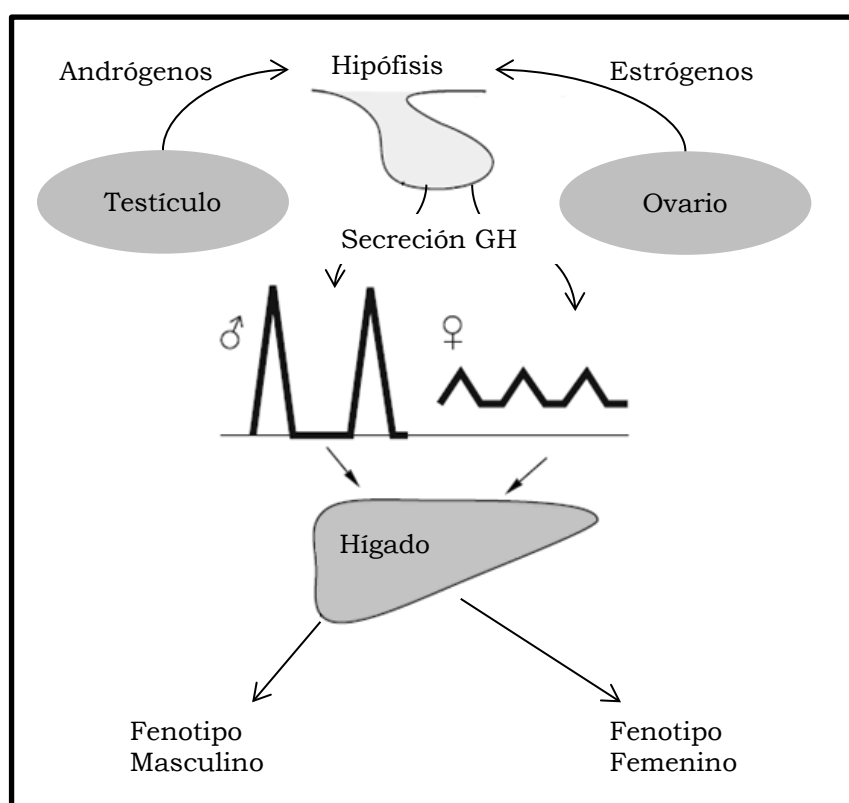
### Respuesta farmacocinética y sexo

De todas las posibles fuentes de variabilidad que pueden tener un efecto fijo sobre los parámetros farmacocinéticos, el sexo divide a la población en dos mitades con características marcadamente diferentes.

Hombre y mujer se diferencian a partir de la expresión durante la sexta semana de vida fetal del gen SRY (región Y determinante del sexo) ubicado en el cromosoma Y masculino. A grosso modo, dicha expresión provoca el desarrollo de la gónada embrionaria bipotencial en testículos, mientras que la ausencia de expresión resulta en el inherente desarrollo de ovarios [5, 6]. Estos dos caminos conducen a distintos perfiles hormonales afectando el eje hipotálamo-hipofisario, que llevarán a la diferenciación sexual afectando el desarrollo del organismo y su fisiología. A modo de ejemplo, Waxman *et al.* [7–9] han estudiado el impacto de la secreción de la hormona de crecimiento (GH) a partir de la adenohipófisis en la expresión enzimática a nivel hepático en ratones y ratas. Existe un dimorfismo sexual en el patrón de secreción de la GH, la cual presenta una marcada oscilación en machos con períodos de niveles indetectables separados de picos de altas concentraciones lo cual contrasta con los niveles mantenidos y poco oscilantes observados en hembras. Esto fue directamente asociado al fenotipo enzimático en hígado, especialmente con enzimas del citocromo P450 (CYP450): la administración continua de GH a velocidad constante en machos provocaba un cambio en la expresión enzimática pasando a un fenotipo hepático femenino (Figura 1.3). El dimorfismo sexual en la secreción de GH también se encuentra en humanos, aunque no es tan marcado. La secreción de GH está controlada por el núcleo supraquiasmático (NSQ) ubicado en el hipotálamo, que a su vez presenta receptores para hormonas sexuales [10]. El NSQ es llamado el “reloj biológico”, centro primario de regulación de ritmos circadianos, su funcionamiento ha sido analizado como el causante de varias diferencias de sexo, entre otras a nivel del comportamiento humano.

**Figura 1.3.**

Perfiles de hormona de crecimiento (GH) y efecto en expresión enzimática a nivel hepático según sexo. Adaptado de Smirnov *et al.* [11].



Las hormonas sexuales, aquellas que interaccionan con receptores androgénicos, estrogénicos y de progestágenos, tienen incidencia en muchas funciones del organismo, por lo tanto es de esperar que hombres y mujeres al diferir cualitativa y cuantitativamente en el perfil de dichas hormonas presenten diferencias fisiológicas que alteren la respuesta farmacocinética y farmacodinámica de los medicamentos, desde la ya comentada diferencia en expresión enzimática que afectará la eliminación de fármacos y su ingreso por vía oral hasta diferencias en cascadas bioquímicas que aumenten la susceptibilidad a una enfermedad, como es el caso de la epilepsia catamenial [12]. Hombres y mujeres incluso difieren en la incidencia de muchas afecciones: cefaleas, artritis, depresión y asma afectan más al sexo femenino, mientras que enfermedades cardiovasculares y enfisema afectan en mayor proporción al sexo masculino [13]. Sin embargo, la investigación en este sentido es relativamente reciente, principalmente debido a que no fue hasta los inicios de los años 90 donde las mujeres comenzaron a ser incluidas en los ensayos clínicos y en los análisis realizados en publicaciones científicas [14]. Previamente, la exclusión se debía principalmente al riesgo de ocasionar efectos adversos en mujeres de edad fértil que se reflejaran posteriormente en afecciones en la descendencia; la FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos) desde 1977 hasta 1993 mantuvo en sus guías para realización de ensayos clínicos la recomendación explícita de excluir mujeres en edad fértil en ensayos de fases I y II, desaconsejando también la inclusión en fases posteriores [15]. Sólo mujeres con patologías que implicaran riesgo de vida, como SIDA y cáncer, podían ser incluidas. La recomendación estaba basada también en la creencia de que no habría diferencias relacionadas al sexo en la absorción y disposición de fármacos, concepción que fue progresivamente rebatida con el correr de los años. Si bien luego de que la FDA y el NIH (*National Institutes of Health*, Estados Unidos) cambiaran sus políticas al respecto la cantidad de mujeres incluidas en ensayos clínicos aumentó significativamente, aún existe una sub-representación de la cantidad poblacional, e incluso existe un alto porcentaje de estudios realizados en hombres y mujeres cuyos resultados no son analizados según sexo [16–19].

En Uruguay, según datos del Instituto Nacional de Estadística actualizados al año 2011, el número de hombres y mujeres en la población es similar (48 y 52 % respectivamente)[20].

Por último, es necesario mencionar que existen muchos reportes en la literatura científica respecto a diferencias PK/PD asociadas al sexo basados en ensayos pre-clínicos (en animales de experimentación). Como fue explicitado anteriormente las dicotomías sexuales halladas en estos ensayos pueden no ser extrapolables a seres humanos, pudiendo conducir a

conclusiones erróneas. Las diferencias halladas durante ensayos pre-clínicos deben ser confirmadas en humanos, de lo contrario deben ser criteriosamente utilizadas en conjunto con otros reportes bibliográficos para apoyar a la construcción de hipótesis. De esta manera se ha trabajado con la información científica disponible durante el desarrollo de esta investigación.

La evidencia clínica muestra que las diferencias de sexo al recibir tratamientos farmacológicos están presentes: estadísticamente los efectos adversos son más frecuentes en mujeres [21–23]. Quizás en gran parte esto se pueda explicar por la principal diferencia que presentan hombres y mujeres: el peso corporal. Esto afecta directamente al volumen de distribución de fármacos y por ende a la exposición resultante de la administración de una determinada dosis. Generalmente durante la práctica clínica la dosificación no se realiza normalizada por peso, llevando a que mujeres al tener un menor peso medio presenten en general mayor exposición a fármacos que hombres. Para realizar un adecuado análisis del impacto del sexo en la respuesta farmacocinética, la corrección por peso debe ser incluida en aquellos parámetros donde esté presente el volumen de distribución a modo de evitar que el componente alométrico sea malinterpretado. Frecuentemente, diferencias hombre-mujer desaparecen al considerar el peso corporal.

Se debe tener en cuenta que tanto hombres como mujeres muestran cambios anatómico-fisiológicos con el paso del tiempo, cambios que no siempre impactan en el mismo sentido. El dimorfismo sexual, aunque esté presente desde la gestación, se hace más evidente a partir de la pubertad. La edad, por lo tanto, es una de las variables que hay que tener en cuenta al analizar la influencia del sexo: la diferencia en varios parámetros disminuye al considerar por ejemplo mujeres posmenopáusicas, ya que el perfil hormonal cambia significativamente. A menos que se especifique lo contrario, se apunta en esta investigación al análisis de adultos en edad fértil. Algo similar aunque posiblemente con menor influencia ocurre al considerar la raza de la población, ya que ciertas diferencias hombre-mujer no se conservan en todas las etnias. En Uruguay aproximadamente un 90% de la población ha declarado tener ascendencia de raza blanca [20].

A continuación se realiza un resumen de las diferencias fisiológicas y constitutivas asociadas al sexo referenciadas para humanos que tienen o pueden tener impacto en la respuesta farmacocinética a los medicamentos. Si bien se ha avanzado mucho en el análisis del impacto del sexo en la respuesta PK/PD a medicamentos, existe mucho terreno aún para profundizar. Mediante el presente trabajo se pretende aportar evidencia en

este sentido y evaluar el impacto que las diferencias halladas puedan tener sobre la respuesta clínica.

a) Composición corporal

Como fue comentado anteriormente, en promedio los hombres pesan entre 15 y 20% más que las mujeres y tienen mayor altura, aunque manteniendo una leve superioridad en el Índice de Masa Corporal (IMC). Las mujeres muestran una tendencia a tener mayor proporción de tejido graso, menor proporción de tejido muscular esquelético y menor volumen de agua total corporal [24–26]. Estas diferencias pueden afectar el volumen de distribución de un fármaco dependiendo de sus características fisicoquímicas: fármacos lipofílicos podrían tener mayor  $V_D$  en mujeres. Este parámetro se define como la relación entre cantidad total de fármaco en el organismo ( $x_T$ ) y la concentración plasmática ( $C_p$ ) a un tiempo dado:

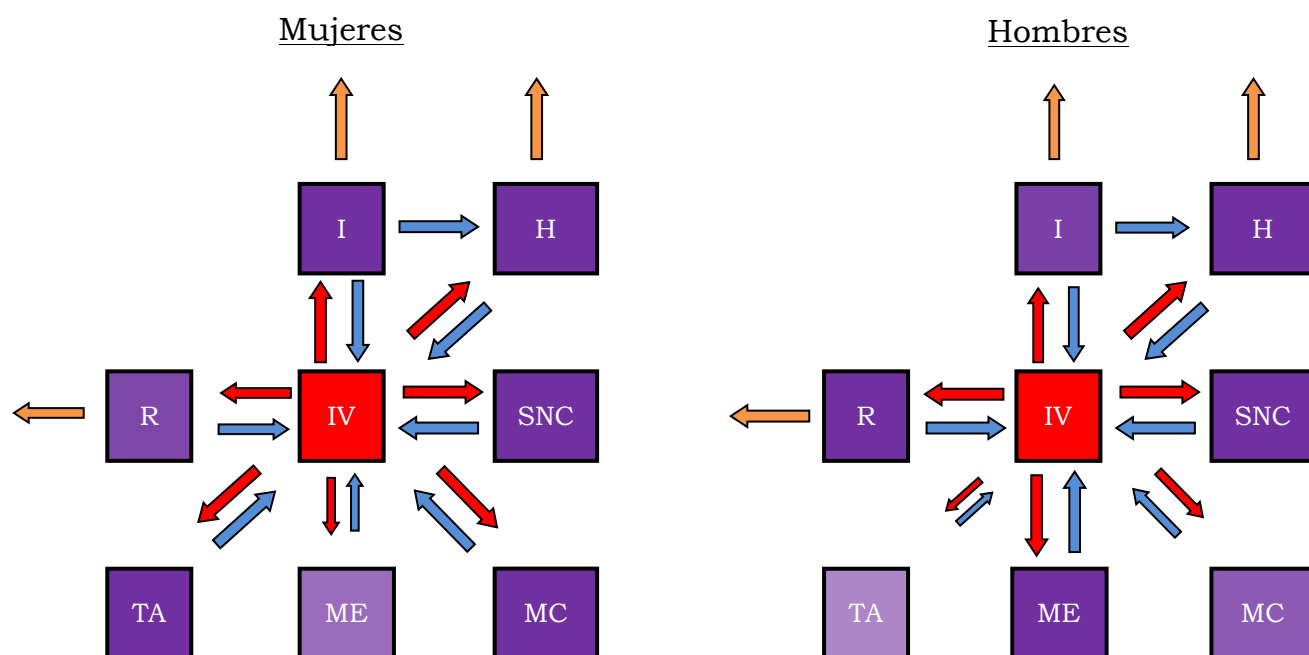
$$V_D = x_T / C_p \quad (\text{Ecuación 4})$$

Mediante el  $V_D$  se estima la capacidad del fármaco para difundir desde el plasma hacia tejidos periféricos. Para una misma dosis/peso, un mayor  $V_D$  conducirá a menores concentraciones en plasma con mayor acumulación de fármaco en tejidos periféricos. Si bien esto disminuirá la  $t_{1/2}$  aumentando el tiempo de permanencia del principio activo en el organismo, el impacto en la respuesta PD dependerá de la localización del sitio de acción: de encontrarse en un órgano de rápido equilibrio con el plasma, donde hay menores concentraciones, probablemente se produzca una disminución en la intensidad media de efecto; en cambio de encontrarse en un tejido periférico, el efecto podría tener mayor intensidad y duración.

b) Distribución de flujo sanguíneo

La transferencia de una sustancia circulante en plasma hacia un órgano es afectada por el flujo sanguíneo destinado a dicho órgano, con la excepción de procesos activos de transporte en situación cinética de orden cero. A su vez, la cantidad de sustancia repartida entre los diferentes órganos depende del porcentaje de gasto cardíaco que le llega a cada uno, el cual varía de acuerdo a tamaño y requerimiento metabólico. Este porcentaje se conoce como distribución regional de flujo sanguíneo, y tiene un alto impacto en la disposición de fármacos ya que regula la fracción de masa disuelta en plasma que estará en contacto con cada órgano [27]. Si bien la distribución de flujo sanguíneo es similar entre hombres y mujeres considerando ciertos órganos (5% huesos, 12% cerebro, 2,5%

pulmones, 5% piel), es significativamente diferente en otros: tejido adiposo (8,5 % mujeres, 5% hombres), miocardio (5% mujeres, 4% hombres), riñones (17% mujeres, 19% hombres), región esplácnica (27% mujeres, 25% hombres) y músculo esquelético (12% mujeres, 17% hombres) [28]. Es de esperar, por lo tanto, una diferente disposición de fármacos de acuerdo al sexo, como se ilustra en la figura 1.4.



**Figura 1.4.** Modelos farmacocinéticos multicompartmentales de disposición para hombre y mujer ilustrando diferencias en distribución del flujo sanguíneo, donde I es intestino, H hígado, IV espacio intravascular, R riñones, SNC sistema nervioso central, TA tejido adiposo, MC músculo cardíaco y M el tejido muscular esquelético. Las flechas rojas simbolizan sangre arterial, mientras que las azules sangre venosa y las naranjas la tasa de eliminación únicamente al flujo sanguíneo. Las diferencias en largo y espesor de flechas, y en transparencia en relleno de compartimentos reflejan diferencias de sexo relativas en flujo sanguíneo a cada compartimento.

Fármacos que se eliminan por excreción renal presentan en principio mayor CL en hombres que en mujeres, ya que el flujo sanguíneo 10% mayor afecta proporcionalmente al filtrado glomerular [29–31]. Así ocurre por ejemplo en la disposición de digoxina [32]. Interesante es que la distribución de flujo sanguíneo también tiene influencia directa en la respuesta farmacodinámica de digoxina, cuya acumulación en miocardio de mujeres considerando una similar concentración media en plasma sería mayor. Diferencias de sexo en la respuesta clínica a tratamientos con este fármaco han sido referenciadas [33, 34].

Para principios activos eliminados por metabolismo a nivel esplácnico, si la expresión de enzimas y transportadores de eflujo relacionados a



la biotransformación es similar entre sexos, se esperaría un mayor CL en mujeres debido a una mayor concentración de sustrato secundaria a la mayor distribución de flujo sanguíneo. Sin embargo, aquí conviene realizar una distinción entre dos zonas bien diferentes: hígado (que recibe moléculas por vena porta y por arteria hepática) y demás órganos esplácnicos (que solo reciben moléculas por sus respectivas arterias). La gran diferencia entre sexos se da a nivel del caudal sanguíneo que recoge la vena porta, lo cual no significa que el hígado sea preferido para distribuir fármacos en mujeres, sino el intestino, por ejemplo. Es así que fármacos metabolizados a nivel intestinal sufran mayor depuración en mujeres que en hombres. La depuración por ruta hepática se cree similar entre ambos sexos.

c) Fisiología del tracto gastrointestinal

Hombres y mujeres presentan importantes diferencias en cuanto a la composición y al funcionamiento del aparato digestivo que influyen principalmente en la biodisponibilidad oral de medicamentos, es decir, la cantidad y velocidad con la que un fármaco se hace disponible para todos los órganos del cuerpo a partir de un medicamento administrado por vía oral. La biodisponibilidad afecta en forma directamente proporcional a la exposición total del organismo frente al fármaco, estimada a través del área bajo la curva del perfil de concentraciones plasmáticas (AUC):

$$AUC^{\infty}_{EV} = \int_0^{\infty} C(t) = F * D / CL \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde  $AUC^{\infty}_{EV}$  y  $F$  representan el AUC integrada entre cero e infinito luego de una única dosis extravasal y el factor de biodisponibilidad, respectivamente. Para un medicamento el valor de dicho factor es estimable únicamente mediante la relación de exposición entre una dosis extravasal y una dosis intravenosa, para la cual toma su valor máximo igual a la unidad (el 100% de la dosis ingresa al torrente circulatorio y por lo tanto estará disponible para todo el organismo):

$$F = AUC^{\infty}_{EV} / AUC^{\infty}_{IV} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Es necesario aclarar además, que las diferencias a nivel gastrointestinal podrían afectar no sólo la biodisponibilidad oral de medicamentos, sino también la distribución y eliminación de fármacos.

A nivel gástrico el pH del fluido es significativamente menor en hombres (pH 1-2, frente a pH 2-3 para mujeres), debido a una mayor secreción de ácido clorhídrico hacia el lumen tanto en condiciones basales como en respuesta a estímulos como la ingesta de alimento [35–38]. Si bien no se han reportado diferencias significativas en pH luminal a nivel intestinal, esto podría deberse a la dificultad en la medición y a la alta variabilidad intraindividual. Paradójicamente, la secreción de bicarbonato desde el páncreas hacia el duodeno es mayor en mujeres debido a su estimulación por estrógenos [39], por lo que el contenido duodenal debería tener un pH más básico que en hombres. La mayor prevalencia de úlcera duodenal en hombres respalda esta hipótesis [40]. Adicionalmente a la diferente acidez, el volumen del fluido en estómago a pesar de ser similar entre sexos en condiciones de ayuno, es significativamente mayor en hombres luego de las comidas [41].

Estas diferencias afectarán la liberación y disolución de principios activos contenidos en formas farmacéuticas sólidas. Dependiendo de las características del medicamento podrían aparecer rendimientos diferentes según el sexo. Por ejemplo, en un estudio de bioequivalencia de medicamentos conteniendo el antimicótico Itraconazol, de muy baja solubilidad y pKa igual a 3,7 para la base protonada, se observó menor velocidad de absorción en mujeres, disminuyendo a su vez la cantidad total de fármaco biodisponible [42]. Fármacos inestables a bajos pH también podrían ver afectada su biodisponibilidad de manera diferente en hombres y mujeres.

Otro factor de la fisiología gastrointestinal con importantes consecuencias en la biodisponibilidad oral de medicamentos es el tiempo de permanencia de sólidos y líquidos en cada segmento del tracto. Luego de ingerido, el medicamento atraviesa el esófago en un tiempo despreciable llegando al estómago, donde el tiempo de vaciado gástrico es regulado por la fuerza y frecuencia de contracciones en la pared muscular gástrica, por el grado de relajación del esfínter pilórico y las contracciones a nivel del duodeno [43, 44]. Estas variables dependen a su vez de diversos estímulos que comienzan con la aparición del bolo alimenticio en la cavidad estomacal y varían con la magnitud, naturaleza y el contenido calórico de la ingesta. Sólidos y semisólidos permanecen un mayor tiempo en estómago siendo descargados hacia el duodeno en un proceso cinético de orden cero, ya que el tamaño de partícula en quimo debe ser reducido hasta al menos 1 mm antes de pasar a través del piloro durante las primeras horas poscomidas [45]; líquidos de bajo contenido en calorías son descargados en un proceso cinético de primer orden, mostrando una caída exponencial de la cantidad remanente en estómago; líquidos de

alto contenido en calorías son retenidos por períodos mayores. Sendos estudios referencian menores tiempos de residencia de contenido gástrico en hombres que en mujeres, tanto para sólidos (medias de 59,8 y 92,4 minutos respectivamente según Datz *et al.*) como para líquidos de alto contenido calórico (medias de 30,3 y 53,8 minutos respectivamente, Datz *et al.*) [46–53]. La diferencia se observa tanto en el tiempo de latencia en el inicio (para sólidos y semisólidos) como en la velocidad de descarga del quimo al duodeno. Líquidos de bajo contenido calórico muestran tiempos de residencia gástrica similares entre sexos. Aunque no se ha observado una correlación entre tiempo de vaciado gástrico y concentración de hormonas sexuales, al comparar hombres con mujeres posmenopáusicas sin tratamiento de reemplazo hormonal, Hutson *et al.* [51] encontraron similares tiempos en vaciado gástrico de sólidos. Para formas farmacéuticas, los reportes de tiempo de permanencia en estómago en ambos sexos son escasos [54]. Dado que el intestino delgado es el segmento del intestino con mayor superficie específica ( $>250 \text{ m}^2$ ), representa el sitio de absorción de sustancias por excelencia. La absorción en estómago, en cambio, es despreciable para la gran mayoría de sustancias. El tiempo de latencia en el vaciado gástrico y la velocidad con la cual el quimo es descargado al duodeno pueden afectar por lo tanto el inicio y la velocidad de absorción de fármaco.

En intestino delgado el tiempo de residencia está marcado principalmente por el peristaltismo muscular y por movimientos de segmentación, la velocidad lineal de transferencia del quimo va disminuyendo desde el duodeno al íleon. En cuanto al sexo se encuentran reportes contradictorios con estudios que informan mayor velocidad en hombres [50, 55] y estudios que no encontraron diferencias significativas [56, 57]. Para el intestino grueso, los reportes son más consistentes en cuanto al más lento tránsito en mujeres [49, 50, 55, 58, 59]. Entre ellos, Jung *et al.* hallaron un más lento tránsito para mujeres en etapa lútea del ciclo sexual femenino donde las concentraciones de progesterona son elevadas.

d) Expresión de enzimas y transportadores de eflujo

Los sistemas enzimáticos encargados de catalizar reacciones de biotransformación de xenobióticos y compuestos endógenos en fases I y II se encuentran principalmente en hígado, aunque también existe una densidad significativa a nivel de enterocitos de intestino delgado y en otros órganos y fluidos como riñones, pulmones, saliva y fluido gástrico. Los complejos enzimáticos más importantes relacionados a reacciones de oxidación en la biotransformación de xenobióticos pertenecen a la familia del citocromo P450 (CYP450), están

involucrados en el metabolismo de aproximadamente 90% de los fármacos utilizados en humanos [60]. Dentro esta familia, la isoforma CYP3A4 cataliza la oxidación de aproximadamente 30% de dichos fármacos. Por otro lado, las enzimas de fase II más relevantes son las UDP glucuronosil-transferasas (UGT), que catalizan la glucuronidación de varios compuestos.

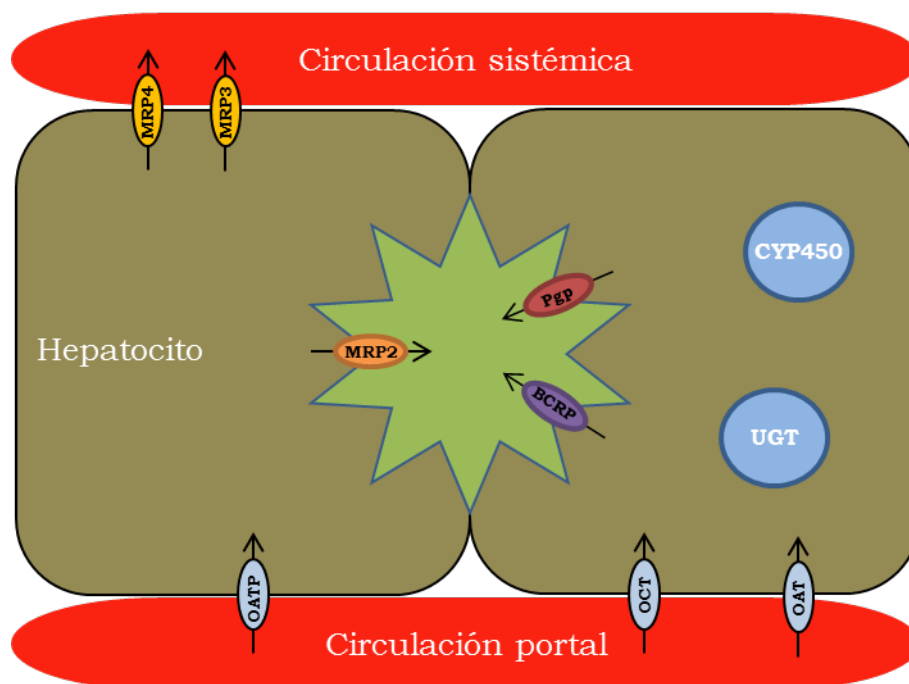
Los transportadores o bombas de eflujo son proteínas transmembrana que se unen a una amplia gama de sustratos, mediando activamente su transporte desde el citoplasma hacia el espacio extracelular, reduciendo así la concentración intracelular de sustrato. En mamíferos, las bombas de eflujo que participan significativamente en el transporte de fármacos son la glicoproteína P (Pgp), las proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP, subtipos 1 a 5) y la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP) [61]. Se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del cuerpo humano, incidiendo en procesos de absorción, distribución y eliminación de fármacos. A nivel intestinal existe una fuerte expresión de BCRP, MRP2 y Pgp en la cara apical de enterocitos. Mientras BCRP muestra densidad uniforme a lo largo del tracto, la expresión de MRP2 disminuye y la de Pgp aumenta hacia la región distal [62–64]. En el hígado, como se ilustra en la figura 1.5, los hepatocitos presentan una gran cantidad y variedad de transportadores: de influjo, ubicados en las vellosidades de la cara sinusoidal, cumplen un importante rol en la captación de sustancias desde los capilares sinusoidales (cargados de sangre proveniente de vena porta y de arteria hepática); de eflujo, ubicados en la cara basolateral (MRP3 y MRP4), expulsan sustratos hacia la circulación sistémica (devolviendo solutos a los sinusoides y de allí a la vena central del lobulillo hepático); y de eflujo ubicados en la membrana que separa al hepatocito del canalículo hepatobiliar (BCRP, MRP2 y Pgp), donde expulsan sustratos hacia la bilis [65].

También podemos encontrar transportadores de eflujo con importantes efectos en la farmacocinética de fármacos en riñones, páncreas [66], glándulas salivales, barrera hematoencefálica, cerebro, barrera hematotesticular, barrera placentaria, leucocitos, entre otros.

Los transportadores de eflujo tienen un gran impacto en la biodisponibilidad y el *clearance* de muchos fármacos [67–69]. Actúan de modo cooperativo con los complejos enzimáticos, ya que al reducir las concentraciones intracelulares permiten que las reacciones de biotransformación, pasibles de saturación con altos niveles de sustrato, mantengan una cinética de primer orden. En enterocitos, la aparición de fármacos sustratos de enzimas y transportadores de eflujo en citoplasma da lugar a una competencia entre

biotransformación enzimática, eflujo hacia el lumen intestinal e ingreso a la circulación portal a través de la cara basal.

Cuando un medicamento es administrado por vía oral, la dosis de fármaco que logre disolverse en fluidos gástricos e intestinales estará presente en el lumen intestinal provocando una concentración muy alta en relación a la capacidad enzimática del epitelio. El eflujo generará un ciclo de salida-ingreso de sustrato al enterocito, disminuyendo la concentración intracelular y enlenteciendo por tanto su ingreso al organismo, pero además evitará que el proceso de biotransformación alcance una cinética de orden cero (velocidad constante), favoreciendo su competencia con el ingreso hacia la circulación sistémica. El efecto neto para este tipo de fármacos es una disminución de la biodisponibilidad oral, lo cual ha sido revisado por Benet y coautores que dieron lugar a una nueva clasificación de fármacos a modo de predecir el efecto de los transportadores en la absorción oral de fármacos [70–73].

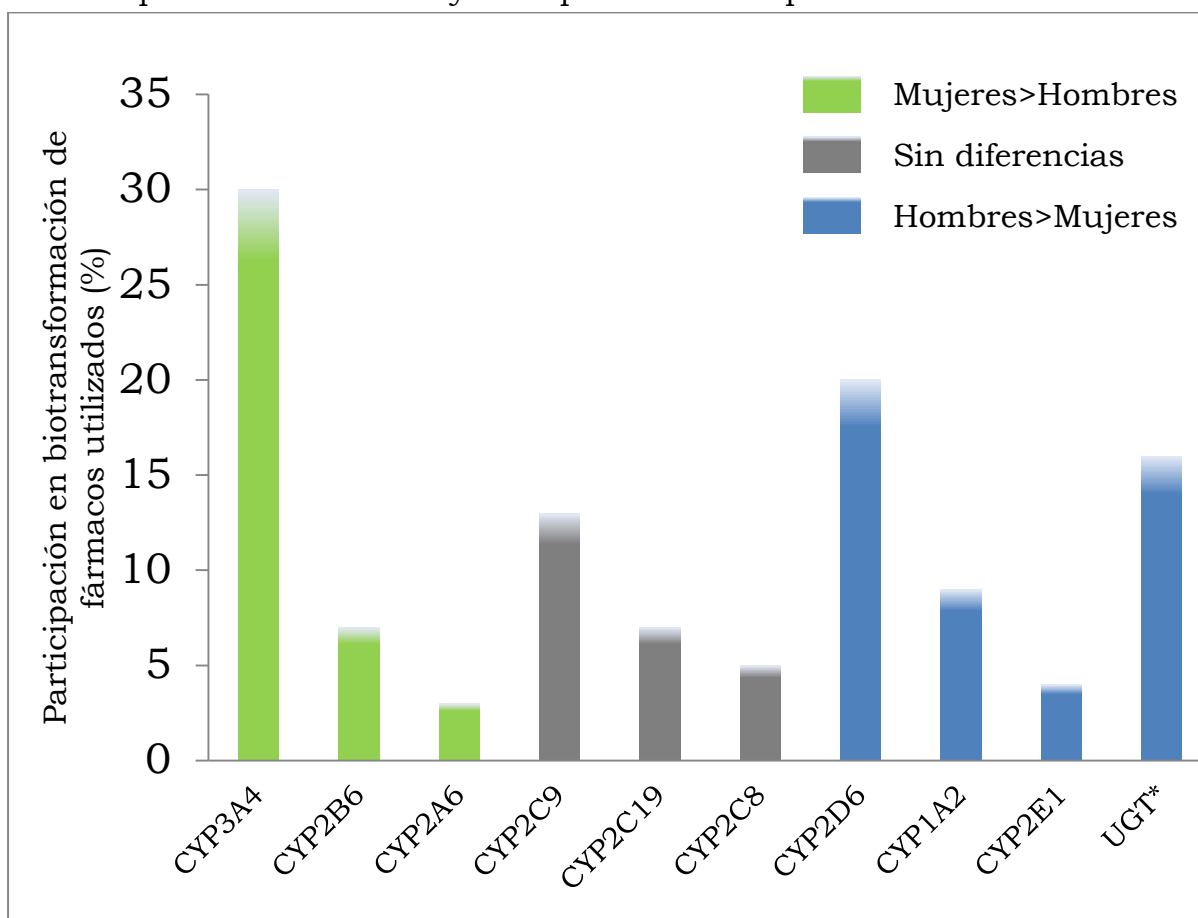


**Figura 1.5.** Representación de los principales transportadores de influjo (en celeste), eflujo (hacia circulación sistémica y canalículo biliar) y complejos enzimáticos vinculados a disposición de fármacos en hepatocito. OAT, OATP y OCT son transportadores orgánicos de aniones, de aniones polipéptidos y de cationes respectivamente.

En hígado, las bombas de eflujo tienen un efecto similar favoreciendo la biotransformación de sustratos, pero también cumplen un rol fundamental en la excreción hepatobiliar, por lo que pueden incidir directa e indirectamente aumentando el CL presistémico de una sustancia. El mismo fenómeno de excreción se puede dar en riñones (hacia la orina) e intestinos (hacia el lumen). Por último, la presencia

de transportadores de eflujo en barreras como la hematoencefálica puede disminuir el ingreso de fármaco al sitio de acción, considerándose uno de los mecanismos de desarrollo de farmacoresistencia [74].

Diferencias asociadas al sexo en la expresión y actividad de enzimas y transportadores de eflujo han sido referenciadas por varios autores [75–82]. En modelos animales de experimentación se ha demostrado el efecto regulatorio que poseen las hormonas sexuales sobre la expresión de estas proteínas [7, 83, 84]. Mediante la figura 1.6 y la tabla 1.2 se resumen las diferencias de mayor significancia en expresión de enzimas y transportadores respectivamente.



**Figura 1.6.** Se resumen las diferencias de sexo referenciadas en la expresión y/o actividad de los complejos enzimáticos más relevantes en conjunto con su involucramiento en la biotransformación de los fármacos utilizados. \*Para UGT, las diferencias han sido referenciadas sólo en algunos isotipos [75–81, 85–88].

Transportador	Diferencias según sexo	Referencias	Comentarios
Pgp	H>M	[89, 90]	A nivel hepático
MRP2	M>H	[91]	En modelos animales (rata)
BCRP	M>H	[92]	A nivel hepático

**Tabla 1.2.** Expresión de los principales transportadores de eflujo según sexo.

Adicionalmente, es necesario tener en cuenta que existen determinadas circunstancias que sólo afectarían a un sexo pudiendo ampliar o anular las diferencias de sexo basales. Aquí se presentan brevemente factores fisiológicos y ambientales que afectan a mujeres:

a) Tratamiento con anticonceptivos orales (ACO)

Tratándose de uno de los grupos de fármacos más prescritos en el mundo, estrógenos (principalmente etinilestradiol) y progestágenos (drospirenona, desogestrel, etc.) son utilizados en la anticoncepción oral. Estos análogos hormonales son metabolizados básicamente mediante CYP3A4 y UGT, y son, al igual que sus metabolitos, sustratos del transporte de eflujo (Pgp, MRP). Además de alterar los niveles circulantes de hormonas sexuales, son capaces de modular la expresión de transportadores de eflujo y complejos enzimáticos. En general, se ha observado inducción a nivel de UGT y transportadores de eflujo [88, 93, 94]. Por este motivo las interacciones farmacológicas involucrando ACO han sido ampliamente reportadas y es de esperar que presenten un impacto importante en el análisis de la respuesta farmacocinética según sexo, lo cual que debe ser evaluado en cada caso [95, 96].

b) Ciclo sexual femenino

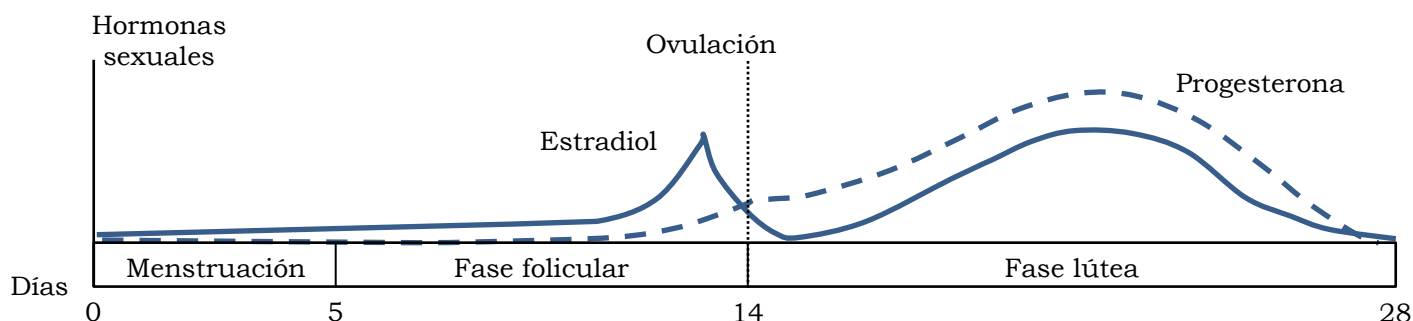
Mujeres en edad fértil presentan un ritmo biológico infradiano con duración promedio de 28 días, marcado principalmente por cambios en la concentración plasmática de hormonas: hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol y progesterona (figura 1.7). Como se ha comentado previamente, estradiol y progesterona tienen un importante impacto fisiológico que puede alterar la respuesta farmacocinética.

Si bien no son muchos, se han realizado ensayos clínicos diseñados concretamente para analizar cambios farmacocinéticos asociados al ciclo menstrual. Según un estudio realizado por Kharasch *et al.* [97], la actividad del complejo CYP3A4 no cambiaría a lo largo del ciclo. Sin embargo, sí se han encontrado diferencias en la eliminación de fenitoína, teofilina, cafeína y metacualona, relacionadas a alteraciones en actividad de otras isoformas CYP450 [98–101], y de paracetamol, posiblemente causada por diferente tasa de glucuronidación [102]. En todos los casos anteriores, un menor CL fue observado durante la fase lútea. A nivel gastrointestinal, si bien hay pocos reportes concretos, el aumento en concentraciones de progesterona durante la fase lútea reduciría el tránsito [59]. Para muchos fármacos, la mayor variabilidad farmacocinética interindividual observada en mujeres podría relacionarse a la diferente exposición a hormonas sexuales, ya

que exceptuando estudios muy específicos, difícilmente sean incluidas a un ensayo clínico mujeres en idéntica fase del ciclo menstrual.

### c) Embarazo

Si bien no se encuentra en el alcance del presente trabajo, es necesario destacar que el embarazo suele afectar profundamente la farmacocinética de muchos fármacos. Durante la gestación, el perfil hormonal está marcado por altos niveles de progesterona (aumenta abruptamente desde las primeras semanas), estradiol, estriol y estrona. Esto provoca profundos y dinámicos cambios fisiológicos entre los cuales son destacables la expansión del volumen plasmático al 150%, el aumento del flujo sanguíneo renal en un 50%, la aparición de un compartimiento extra (placenta y feto) con un pH menor que el plasmático, el aumento del pH gástrico, la disminución de la velocidad en tránsito gastrointestinal (asociada a progesterona), colestasis y cambios significativos en el metabolismo de xenobióticos. Por ejemplo, para fenitoína, fenobarbital y carbamazepina, se observó un aumento en la tasa de eliminación, provocando desajustes en el tratamiento de mujeres epilépticas. Sin embargo, cafeína ve aumentada su semivida al doble debido a la competencia por oxidasas microsomales con progesterona y estradiol [88, 103].



**Figura 1.7** Perfil de estradiol y progesterona durante el ciclo menstrual femenino. Adaptado de Slauterbeck *et al.* [104].

## Bioequivalencia

Las características de la exposición al fármaco que tenga el organismo dependerán de su interacción con el *medicamento* mediante el cual es administrado en una determinada dosis. En ese sentido, pueden diferenciarse tres factores con influencia en el rendimiento del medicamento: características fisicoquímicas del fármaco, cantidad y naturaleza de los excipientes y tecnología/procesos de fabricación. Cualquier modificación que sufra alguno de estos componentes puede tener impacto en la interacción medicamento-organismo y por lo tanto en la



respuesta PK/PD. Esto no siempre fue entendido así, la importancia de los excipientes y el proceso de fabricación sobre la respuesta clínica obtenida fue asimilada por la FDA a partir de 1975, cuando la noción de bioequivalencia fue introducida en la regulación de productos farmacéuticos.

Para comenzar a comercializar un medicamento conteniendo un fármaco original, la compañía innovadora debe presentar ante la entidad regulatoria estudios pre-clínicos y clínicos en los cuales se hayan evaluado eficacia y seguridad del mismo. Estos estudios representan de 10 a 15 años de investigación y una inversión de entre 500 y 2000 millones de dólares, dependiendo del tipo de fármaco y de la empresa desarrolladora [105]. Para estimular este gasto, se le concede a dicha empresa el monopolio en la comercialización de dicho fármaco por 20 años a partir del registro, durante los cuales el uso masivo del producto farmacéutico genera una enorme cantidad de datos respecto a su eficacia y seguridad, enmarcados en estudios de fase IV. Pasado dicho período se abre la posibilidad a otras empresas para registrar medicamentos conteniendo el mismo principio activo, las cuales respaldarán la eficacia y seguridad de su producto en el desarrollo y la comercialización llevados a cabo por la innovadora solicitando entonces un registro abreviado. Gracias a esto la sociedad accede a medicamentos más baratos disminuyendo significativamente el costo de la salud pública.

El producto de la empresa innovadora es conocido como “original”, mientras que los productos competidores surgidos luego del período de protección de la patente original son llamados “similares”. Si bien se trata de productos conteniendo el mismo fármaco, los excipientes, el proceso y la tecnología de fabricación serán probablemente diferentes, incluso se admite que la forma farmacéutica sea diferente (alternativa farmacéutica). La inclusión de bioequivalencia por la FDA determinó que para comercializar un medicamento similar de administración extravascular, la empresa competidora debe demostrar su similar biodisponibilidad respecto al medicamento original, además de cumplir con los ya exigidos controles de calidad fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en las farmacopeas oficiales. Así surgen los medicamentos “genéricos”: medicamentos similares que han demostrado ser bioequivalentes al original, es decir, han demostrado producir una similar biodisponibilidad en ensayos clínicos realizados sobre voluntarios sanos. Debe resaltarse que bioequivalencia no implica equivalencia terapéutica a pesar de haber sido concebida con esa finalidad, ya que la respuesta farmacodinámica relativa a cada producto no es evaluada [106]. Sin embargo, se trata del control de calidad más confiable

que se puede obtener al analizar un medicamento, ya que su rendimiento es evaluado *in vivo*.

Esta exigencia se difundió luego al resto del mundo, aunque muchos mercados demoraron en introducirla. En Uruguay a partir del año 2007 mediante el decreto 266/007, el Ministerio de Salud Pública (MSP) comenzó a exigir la demostración de bioequivalencia únicamente para medicamentos similares conteniendo ciertos principios activos incluidos en una lista de prioridad basada en el riesgo clínico (fármacos de estrecho margen terapéutico), existiendo actualmente una enorme cantidad de productos similares en plaza. El decreto nombra “intercambiables” a los productos similares bioequivalentes al producto original.

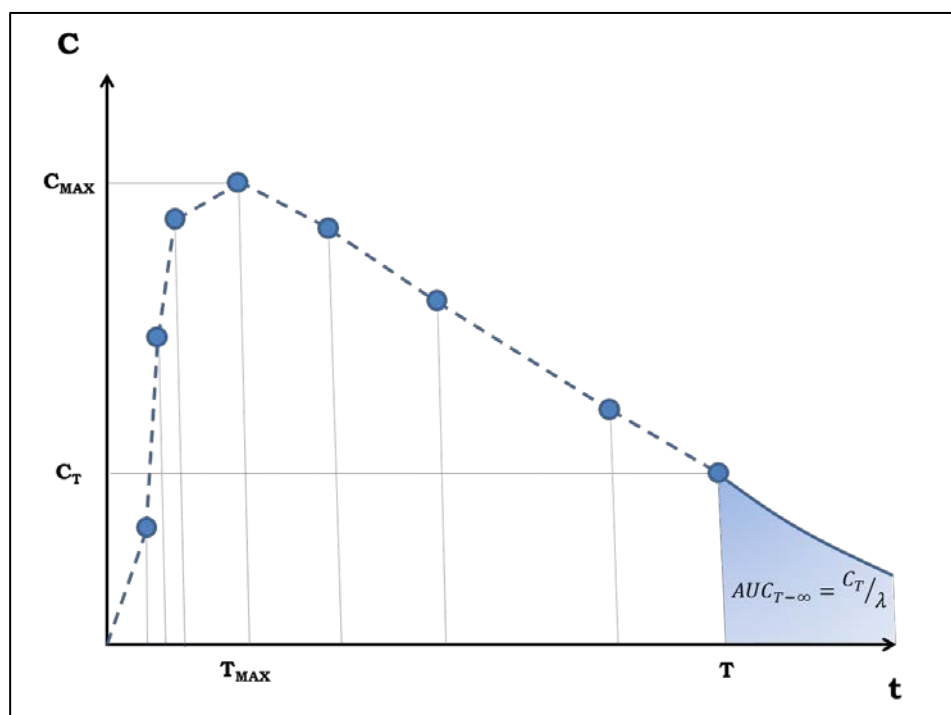
La biodisponibilidad de un fármaco obtenida por un producto farmacéutico es evaluada mediante los siguientes parámetros farmacocinéticos: 1) AUC; 2)  $C_{MAX}$ ; y 3)  $T_{MAX}$ . Estos parámetros son estimados tras la administración de una única dosis a partir del perfil de concentraciones plasmáticas obtenido (figura 1.8), exceptuando medicamentos de liberación prolongada donde la estimación se realiza tras 2 ensayos clínicos en dosis únicas: administrando en ayunas y con comida. En Estados Unidos también se exige un tratamiento en dosis múltiples.

La regulación exige que la determinación de  $C_{MAX}$  y  $T_{MAX}$  sea completamente experimental, impidiendo la utilización de modelos farmacocinéticos, lo cual aumenta la dependencia de la estimación respecto al diseño del protocolo experimental del ensayo clínico. El análisis llevado a cabo se denomina Análisis No Compartmental (NCA). El  $AUC_T$  es estimado en este análisis mediante sumatoria de trapecios:

$$AUC_T = \sum_{t=0}^{t=T-1} \left[ (C_t + C_{t+1}) * (\Delta t) / 2 \right] \quad (\text{Ecuación 7})$$

Para obtener el parámetro  $AUC_{\infty}$  se realiza una estimación del AUC obtenida luego de la última concentración experimental ( $C_T$ ) extrapolando el perfil de concentraciones hacia infinito. Se asume que a partir de cierto tiempo la concentración de fármaco en plasma decae según una función monoexponencial, con velocidad determinada por una constante de primer orden denominada  $\lambda_z$  la cual es obtenida mediante linealización de la función utilizando las últimas concentraciones experimentales.

$$AUC_{\infty} = AUC_T + C_T / \lambda_z \quad (\text{Ecuación 8})$$



**Figura 1.8.** Obtención de parámetros farmacocinéticos a partir de concentraciones plasmáticas en un análisis no compartimental. El  $AUC_T$  se obtiene de acuerdo a la ecuación 7.

Como fue comentado previamente, el parámetro AUC es un estimador de la exposición al fármaco que varía proporcionalmente con la cantidad absorbida.  $AUC_T$  puede ser utilizado como subrogante de  $AUC_\infty$  siempre y cuando represente más del 80% de su valor, lo cual dependerá de la semivida del fármaco y del diseño experimental del ensayo. Mediante  $T_{MAX}$  se evalúa el componente de velocidad del ingreso de fármaco al organismo.  $C_{MAX}$  es un parámetro mixto en este sentido, ya que varía tanto con la cantidad total como con la velocidad de fármaco absorbido. A partir del cociente  $C_{MAX}/AUC$  se obtiene una estimación de la velocidad de ingreso, ya

que el aporte de la cantidad ingresada es sustraído de  $C_{MAX}$ . La regulación vigente en Uruguay contempla la utilización de este parámetro.

Existen varios tipos de ensayos clínicos para determinar si dos formulaciones conteniendo un mismo principio activo poseen similar biodisponibilidad. Como en general se realiza una comparación relativa del producto similar frente al original, durante la evaluación estos productos son denominados TEST (T) y REFERENCIA (R) respectivamente. Se considera “similar” a la ausencia de diferencias significativas en  $T_{MAX}$  ( $\alpha=0,05$ , evaluado con Test de Wilcoxon) y a una diferencia menor al 20% en los parámetros farmacocinéticos AUC y  $C_{MAX}$ . Este límite fue incorporado por las autoridades regulatorias a nivel mundial bajo el fundamento de que una covariable que produzca un efecto menor no provocará cambios

significativos en la respuesta clínica a un medicamento. El ensayo más utilizado se denomina *Bioequivalencia Promedio*, en el cual la bioequivalencia es evaluada utilizando las respuestas medias obtenidas para los productos T y R en una muestra de voluntarios sanos: se concluye bioequivalencia cuando los cocientes de medias geométricas poblacionales T/R para AUC y  $C_{MAX}$  se encuentran dentro del intervalo 0,80-1,25 con un 90% de probabilidad. Como veremos más adelante, el principal problema de este método radica en que la conclusión se basa en la respuesta obtenida en un “sujeto promedio” utilizado para realizar una inferencia poblacional, que obviamente no existe como tal.

El diseño experimental adecuado para este tipo de ensayos es el cruzado y compensado, de dos períodos y dos secuencias de administración, ilustrado mediante la tabla 1.3. Cada voluntario recibirá una dosis de las formulaciones a comparar separadas por un período adecuado de “lavado” de fármaco (*wash-out*). Las secuencias de administración (RT y TR) se asignan de manera aleatoria de modo que en el primer período del ensayo la mitad de los voluntarios reciban el producto T y la otra mitad el producto R, alternando en el segundo período.

Número de sujetos	Secuencia asignada	Formulación administrada		
		Período 1		Período 2
N/2	RT	R	<i>lavado</i>	T
N/2	TR	T		R

**Tabla 1.3** – Diseño cruzado y compensado

La evaluación de la respuesta farmacocinética para ambos productos en un mismo sujeto aumenta la potencia estadística en la estimación de la biodisponibilidad relativa T-R, ya que se asume que los parámetros de disposición y la dosis nominal no cambiaron al recibir uno u otro producto:

$$\frac{AUC_T}{AUC_R} = \frac{D \cdot F_T / CL}{D \cdot F_R / CL} = \frac{F_T}{F_R} \quad (\text{Ecuación 9})$$

AUC y  $C_{MAX}$  se distribuyen naturalmente de modo log-normal en una población de sujetos por lo que a modo de aplicar métodos estadísticos paramétricos en la estimación de intervalos de confianza se realiza previamente una transformación logarítmica sobre los parámetros de cada sujeto. El estimador medio para cada producto ( $\bar{P} = \bar{T}$  o  $\bar{R}$ ), se obtiene con el promedio de los logaritmos individuales, o lo que es igual, con el logaritmo

de la media geométrica. Siendo X el parámetro a evaluar y N el número de voluntarios sanos:

$$\ln \bar{P}_X = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} \ln X_{P_i} = \ln \left[ \left( \prod_{i=1}^{i=N} X_{P_i} \right)^{1/N} \right] \quad (\text{Ecuación 10})$$

Otras ventajas de trabajar con medias geométricas son la mayor sensibilidad a desviaciones individuales (*outliers* son detectados más fácilmente), y la coincidencia real entre el cociente  $\bar{T}/\bar{R}$  y la media de cocientes T/R obtenidos en cada sujeto (lo cual no ocurre trabajando con medias aritméticas).

En suma, la bioequivalencia promedio evalúa si, con un 90% de probabilidad, el cociente de medias geométricas poblacionales se ubica entre 0,80 y 1,25. Esta inferencia se realiza construyendo intervalos de confianza al 90% (IC90%) para el cociente  $\bar{T}/\bar{R}$ , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IC\ 90\% = e^{\left[ \frac{\bar{T}_X}{\bar{R}_X} \pm t_{0,10}^{N-2} * \sqrt{\frac{2*s_{res}^2}{N}} \right]} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde  $t_{0,10}^{N-2}$  es el valor crítico para la distribución *t-student* con un error tipo 1 de 0,10 y N-2 grados de libertad, y  $s_{res}^2$  la varianza residual obtenida tras realizar un ANOVA. En el mismo, se asume un modelo mixto lineal de fuentes de variabilidad que afectan a un parámetro farmacocinético  $X_{ikj}$  (AUC o  $C_{MAX}$ ) estimado para el sujeto  $i$ , sometido a la formulación  $k$ , en el período  $j$ , según la ecuación 11:

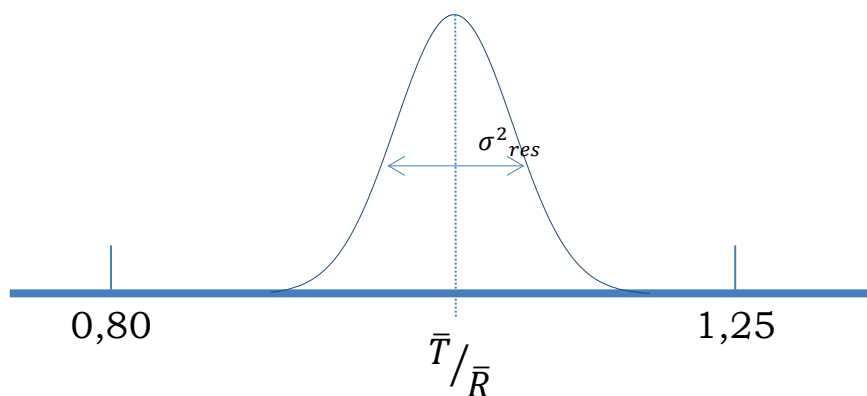
$$X_{ikl} = \mu + S_i + F_k + P_l + \varepsilon_{ikl} \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde  $\mu$  es la media poblacional del parámetro X;  $S_i$ ,  $F_k$  y  $P_l$  son los apartamientos respecto a la media producidos por el sujeto  $i$ , sometido a la formulación  $k$ , en el período  $l$ , respectivamente; y  $\varepsilon_{ikl}$  es el componente de error aditivo residual,  $\varepsilon \sim N(0, s_{res}^2)$ . Las fuentes de dispersión son independientes entre sí y están normalmente distribuidas, por lo tanto el parámetro X también presenta distribución normal. La variabilidad residual es obtenida sustrayendo la variabilidad aportada por los sujetos, las formulaciones y los períodos del ensayo a la variabilidad total.

La amplitud del IC90% es proporcional a la varianza residual e inversamente proporcional al número de sujetos. Un medicamento similar será considerado intercambiable con el original cuando el IC90% para AUC y  $C_{MAX}$  estimado mediante un ensayo de bioequivalencia promedio se encuentre dentro de la especificación, tal como se ilustra en la figura 1.9.

Existen entonces dos efectos determinantes en la evaluación de bioequivalencia: el cociente de medias geométricas poblacionales (estimador puntual, efecto fijo) y la varianza residual del ensayo (efecto aleatorio).

Algunos fármacos presentan alta variabilidad intraindividual e intraproducto, lo cual puede a su vez producir una distribución errática del cociente T/R interindividual, conduciendo a un incremento en  $s_{res}^2$ . La variabilidad para AUC y  $C_{MAX}$  en bioequivalencia se estima mediante el coeficiente de variación de la varianza residual ( $CV_{RES} = 100 * \sqrt{e^{s_{res}^2} - 1}$ ). El  $CV_{RES}$  para un medicamento debe ser previamente considerado al definir el tamaño de la muestra. Un diseño experimental sub-óptimo ocurrirá cuando, a pesar de que el cociente de medias poblacionales  $\bar{T}/\bar{R}$  se ubique cercano a la unidad, la variabilidad no permita concluir bioequivalencia al no permitir que el IC90% resultante entre en el intervalo especificado, ya sea porque no se enrolaron suficientes voluntarios sanos o porque se ignoraron factores con incidencia positiva en la varianza residual. Esto ocasionará mayores costos económicos y éticos, por lo cual el entendimiento de los factores que afectan al CV por parte de los investigadores es fundamental para lograr predecir y controlar la variabilidad del ensayo.



**Figura 1.9.** IC90% para un cociente T/R contenido dentro del intervalo especificado para bioequivalencia.

La metodología de bioequivalencia promedio presenta varias limitaciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar sus resultados. A punto de vista del presente trabajo se resaltarán las más importantes:

- La variabilidad interindividual no es considerada en el IC90%. Es importante entonces enrolar una muestra de voluntarios sanos representativa de la población en estudio.
- La varianza residual no incluye la variabilidad intraindividual en la respuesta a cada producto. Al realizar el ensayo en dos períodos, ningún voluntario recibe el mismo producto en dos ocasiones, por lo

que la variabilidad intraindividual producida por cada medicamento no es evaluada. Dos formulaciones que produzcan variabilidad farmacocinética totalmente diferente pueden ser consideradas bioequivalentes.

- Al concluir sobre la media poblacional del cociente T/R, se ignora la variabilidad interindividual en el cociente T/R. Esto es conocido como interacción sujeto-producto: distintos individuos pueden presentar cocientes T/R significativamente diferentes, incluso inversos. De ser suficientemente alta la magnitud de esta interacción, se podría obtener un cociente  $\bar{T}/\bar{R}$  que no haya sido observado en ningún voluntario.

### **Sexo y bioequivalencia**

El sexo de los voluntarios sanos que conforman la muestra tiene un gran impacto en los estudios de bioequivalencia, principalmente debido a que la gran mayoría de dichos estudios comparan la biodisponibilidad oral de productos farmacéuticos, la cual es condicionada por las características del tracto gastrointestinal donde hombres y mujeres presentan significativas diferencias. Dependiendo del medicamento a evaluar, la presencia de ambos sexos en la muestra de voluntarios sanos puede llevar a un importante aumento de la varianza residual ocasionado por un mayor componente de variabilidad intraindividual en la respuesta individuo-formulación y por la incidencia de la interacción sujeto-producto asociada al sexo (T/R significativamente diferente entre sexos). Este último componente, muchas veces ignorado, podría poner en duda el alcance real del resultado de un ensayo de bioequivalencia promedio donde el cociente  $\bar{T}/\bar{R}$ , estimador puntual del IC90%, se obtiene promediando los cocientes obtenidos para el total de voluntarios.

Esta incidencia ha sido previamente estudiada entre otros por nuestro grupo de investigación, que enfatizó en la importancia de considerar el sexo a la hora de diseñar el protocolo experimental [42, 107, 108]. Sin embargo, hace falta profundizar en el conocimiento de la misma analizando las causas fisiológicas vinculadas, proyectando su impacto en la práctica clínica y difundiendo su importancia en el resultado de bioequivalencia promedio para evitar la malinterpretación de resultados y asegurar menores costos económicos y éticos.

Muchos estudios de bioequivalencia son actualmente realizados únicamente en hombres bajo el entendimiento de que una menor variabilidad residual es obtenida. De cualquier manera, debe considerarse como fue mencionado anteriormente que la muestra de voluntarios debe ser representativa de la población en estudio para poder extrapolar los resultados obtenidos, por lo

que incorporar tanto hombres como mujeres en una cuota representativa debe ser una prioridad.

### **Ensayos clínicos sobre voluntarios sanos**

Para todos los ensayos clínicos referenciados en esta tesis se consideraron similares criterios de inclusión y exclusión en el reclutamiento de voluntarios sanos. Voluntarios de entre 18 y 50 años, con paraclínica y evaluación médica cardiológica normal, con peso corporal en el entorno del 15% del peso considerado adecuado de acuerdo a su altura y sexo, y firmantes de un consentimiento informado fueron considerados para ser incluidos. Voluntarios que no cumplieren alguno de los criterios anteriores, que se encuentren bajo tratamiento farmacológico (con excepción de anticonceptivos orales), que consuman diariamente más de 250 mL de vino (o su equivalente en alcohol para otras bebidas), que hayan participado de un ensayo clínico en los 6 meses previos, que hayan donado sangre en los 3 meses previos, que presenten alguna patología evaluada por el investigador médico, mujeres lactantes o cursando embarazo no fueron considerados para participar en los ensayos clínicos. Los ensayos fueron de libre deserción.

### **Métodos analíticos químicos**

El desarrollo, validación y aplicación de técnicas analíticas para determinación de fármacos tanto in vitro como en fluidos biológicos constituyó gran parte del trabajo experimental de la presente tesis. Los procedimientos analíticos pertenecen al CEBIOBE y se encuentran disponibles bajo pedido.

### **Objetivos de la tesis**

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Centro de Evaluación de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Medicamentos (CEBIOBE), por lo que los ensayos de bioequivalencia constituyeron la principal fuente de datos experimentales. Mediante el análisis farmacocinético se apuntó a abarcar dos objetivos generales:

- I. Estudiar el impacto del sexo en los ensayos de bioequivalencia promedio de medicamentos, analizando sus causas y consecuencias sobre el alcance de las conclusiones obtenidas, y promoviendo medidas a tomar en el diseño experimental a modo de arribar a resultados confiables, extrapolables a ambos sexos, con el menor tamaño de muestra posible.



- II. Investigar diferencias asociadas al sexo en la disposición de fármacos, evaluando el impacto que puede tener esta covariable en la práctica clínica.

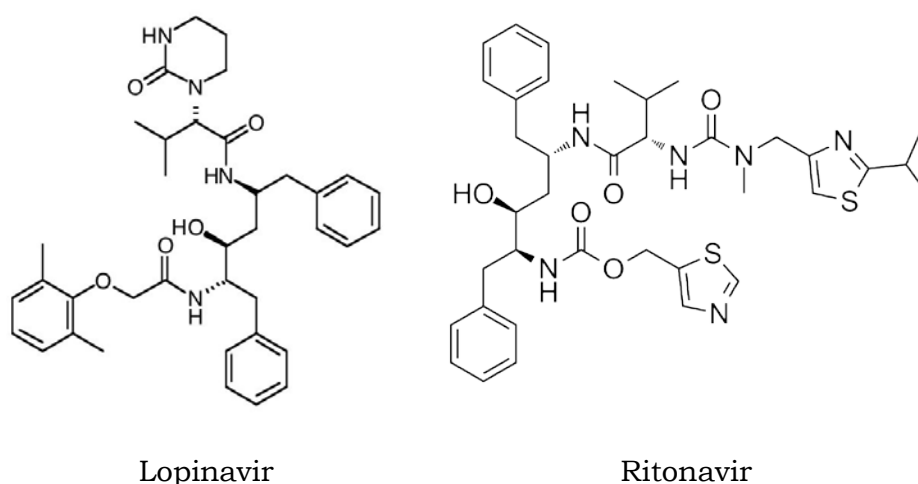
Los análisis realizados en la presente tesis se dividen en el abarcamiento de estos dos grandes objetivos, por lo tanto serán presentados de manera separada. En los capítulos 2, 3 y 4 se presentan análisis destinados a cubrir el primer objetivo, mientras que el segundo es abarcado en los capítulos 5, 6 y 7.

## CAPITULO 2. Influencia del sexo en la biodisponibilidad y bioequivalencia de comprimidos conteniendo lopinavir y ritonavir

La investigación presentada en el presente capítulo dio lugar a la publicación del artículo científico N° I.

### Introducción

Lopinavir (LPV) y Ritonavir (RTV), ilustrados mediante la figura 2.1, son compuestos de estructura peptidomimética con actividad inhibitoria sobre la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo 1, indicados para el tratamiento de pacientes con infecciones originadas por dicho virus. Al inhibir la proteasa durante la replicación viral impiden la fragmentación de las macro proteínas *gag* y *pol* del VIH, originando viriones inmaduros sin capacidad infecciosa. La asociación LPV-RTV (LPV/r) fue autorizada para comercialización en el año 2000 por la FDA. El medicamento original que incorporó estos principios activos, Kaletra®, es propiedad del Laboratorio Abbott y fue comercializado inicialmente bajo la forma de cápsulas de gelatina líquida conteniendo 133 mg de LPV y 33 mg de RTV y de solución oral conteniendo por mililitro 80 mg de LPV y 20 mg de RTV. A partir del año 2005 fue aprobada la forma farmacéutica comprimidos en dos presentaciones: 200 mg de LPV - 50 mg de RTV; y 100 mg de LPV - 25 mg de RTV. Actualmente es uno de los medicamentos más utilizados en el tratamiento de infección por VIH como inhibidor de proteasa (IP).



**Figura 2.1.** Estructuras químicas de Lopinavir y Ritonavir.

Si bien ambos fármacos poseen la actividad farmacológica descrita, LPV presenta una potencia 10 veces mayor, según fue observado en estudios *in*

*vitro* durante fases pre-clínicas de desarrollo [109]. El principal inconveniente observado para LPV fue su baja biodisponibilidad oral (25% en ratas) ocasionada por un extenso metabolismo presistémico producto de la acción concertada a nivel esplácnico del complejo enzimático CYP3A4 y de los transportadores de eflujo Pgp y MRP2, de los cuales es sustrato [110, 111]. RTV, además de ser sustrato de CYP3A4, Pgp y MRP2, demostró ser un potente inhibidor de sus actividades [112, 113]. La combinación de LPV con RTV en dosis subterapéuticas (una relación de 4:1) permitió aumentar significativamente la biodisponibilidad de LPV al inhibir su biotransformación, permitiendo obtener una exposición al IP adecuada para el tratamiento antirretroviral [114]. *In vivo*, la exposición relativa LPV:RTV obtenida es de 20:1. El tratamiento con LPV/r en dosis diarias de 400/100 mg reemplazó al uso de RTV como IP (600 mg diarios), el cual conducía a un rápido desarrollo de farmacoresistencia y era poco tolerado por pacientes debido principalmente a efectos adversos a nivel gastrointestinal (diarrea, náuseas, pérdida del gusto, vómitos). El principio activo responsable de la actividad farmacológica del medicamento es por lo tanto el LPV.

La biodisponibilidad absoluta obtenida para LPV en estas formulaciones orales no ha sido evaluada [115], pero es clara su gran dependencia respecto al efecto local inhibitorio de RTV sobre las proteínas vinculadas a la biotransformación pre-sistémica. En este sentido, el perfil de disolución de ambos fármacos desde la formulación juega un papel fundamental, debiendo ser igual o más rápida la disolución de RTV. Ambas moléculas se comportan como bases débiles con limitada solubilidad en medio acuoso, sin embargo mientras que LPV no presenta cambios de solubilidad a diferentes pH (pKa para base protonada muy bajo), RTV con dos grupos débilmente básicos (pKa=1,8 y 2,6 para bases protonadas) muestra un aumento de solubilidad en medio ácido [116]. En el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), incorporado por la FDA y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como criterio para eximir ensayos *in vivo* [117–121], LPV y RTV son clasificados como fármacos de Clase II (baja solubilidad/alta permeabilidad), y por lo tanto la biodisponibilidad de medicamentos conteniendo este activo no puede eximirse con ensayos *in vitro*.

Se debe considerar además la diferente expresión a lo largo del intestino de las proteínas involucradas en el metabolismo: CYP3A4 [122] y MRP2 son más abundantes en regiones proximales mientras que Pgp aumenta hacia regiones distales [64]. Varios ensayos han evaluado la biodisponibilidad relativa de la formulación LPV/r de acuerdo a la forma farmacéutica y al efecto de la coadministración con comidas [123, 124]. La biodisponibilidad de LPV en ayunas de acuerdo a la forma farmacéutica presenta la siguiente relación: comprimidos > cápsulas de gelatina blanda > solución oral [125,

126]. Para todas las formulaciones, la coadministración con comidas de moderado contenido graso genera un aumento de la biodisponibilidad de LPV, siendo mayor el impacto para solución oral (80% de aumento) que para cápsulas de gelatina blanda (48%) y comprimidos (26,9%). Además, la administración concomitante de Kaletra® con comidas disminuye significativamente la variabilidad interindividual en la biodisponibilidad de LPV. Es interesante que mientras el fabricante expresamente incluye la indicación de administrar las dos primeras formulaciones con comidas, para los comprimidos indica que el cambio en biodisponibilidad no conllevaría cambios farmacodinámicos y por lo tanto flexibiliza la indicación (“con o sin comidas”), sin embargo LPV/r comprimidos administrados con o sin comidas serían regímenes inequivalentes en virtud de que el intervalo de confianza 90% de biodisponibilidades relativas queda por fuera del intervalo (0,80-1,25) de bioequivalencia.

La principal diferencia producida por las formas farmacéuticas (comparadas en condición de ayuno) es el tiempo de residencia de la dosis en el estómago, para el cual se daría la relación comprimidos>cápsulas>solución. En ayunas, donde la disolución de los activos está más comprometida, la mayor retención gástrica promueve una mayor biodisponibilidad indicando la posible presencia de una ventana de absorción para LPV en las primeras porciones del intestino delgado. RTV tendría un importante efecto inhibiendo el metabolismo presistémico en dicha ventana, donde la expresión de MRP2 y CYP3A4 es mayor. La fracción de dosis de RTV disuelta en estómago estaría disminuida en regiones posteriores debido a su baja solubilidad a medida que aumenta el pH. Por otra parte, la elevada expresión de Pgp hacia zonas distales del intestino contribuiría a darle marco final a la mencionada ventana a través de la cual LPV ingresaría al medio interno.

La presencia de alimentos con contenido graso tiene un doble efecto: aumenta el tiempo de residencia gástrica y aumenta significativamente la disolución de ambos principios activos mediante la formación de micelas en estómago y promoviendo la secreción de sales biliares en el duodeno. Diversos estudios también referencian la inhibición de transportadores de eflujo mediada por triglicéridos [71]. Estos efectos harían que las distintas formulaciones administradas luego de una comida logren una mayor y similar biodisponibilidad.

Respecto al sexo, se esperaría por un lado observar mayor biodisponibilidad de LPV en mujeres debido a la menor velocidad de vaciado gástrico. Por otro lado, el más ácido pH gástrico en hombres favorecería la disolución de RTV y

por consiguiente su efecto como potenciador de la biodisponibilidad de LPV. Estos factores asociados al sexo podrían cancelarse, ya que originan efectos opuestos sobre la absorción de LPV. La evaluación de datos farmacocinéticos *in vivo* podría agregar información respecto al efecto final.

Los análisis contenidos en el presente capítulo fueron realizados en primer lugar para evaluar el impacto del sexo en la biodisponibilidad de LPV/r y en la bioequivalencia de productos conteniendo dicha asociación. Posteriormente se diseñó y se llevó a cabo un protocolo de ensayo de bioequivalencia considerando especialmente este impacto. Todos los resultados son presentados.

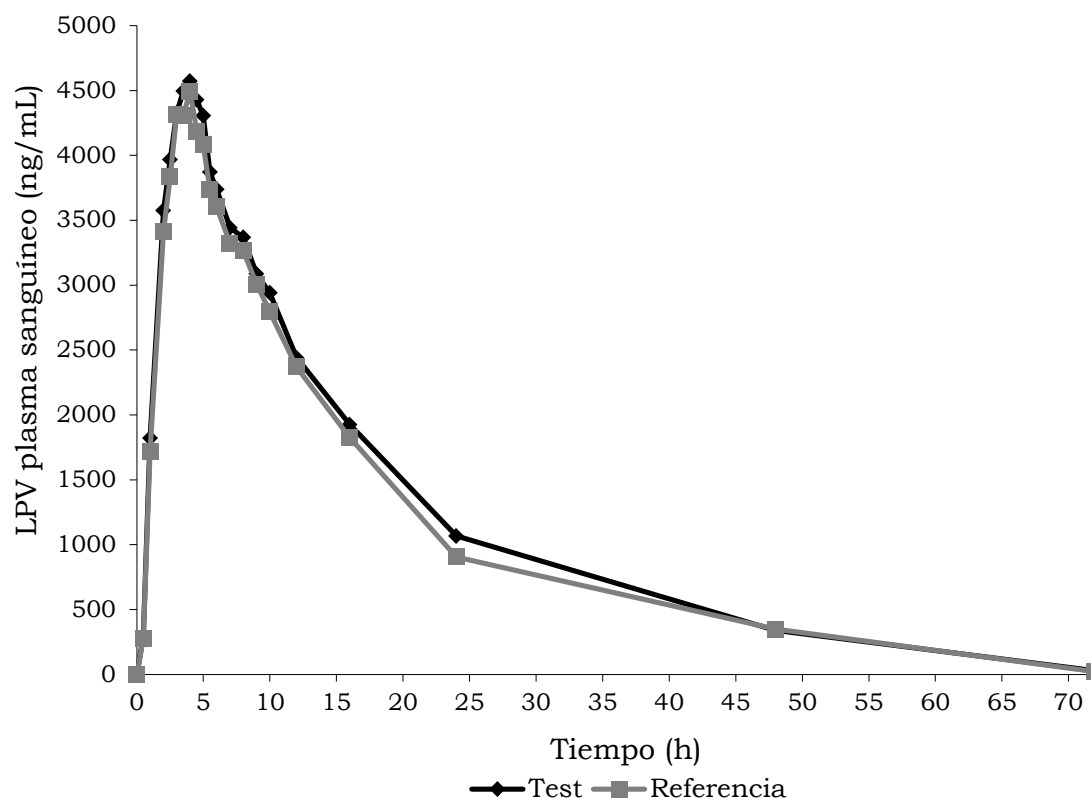
### **Evaluación del impacto del sexo en la biodisponibilidad y bioequivalencia de formulaciones conteniendo LPV/r. Estudio A (EA)**

Se realizó un análisis farmacocinético sobre datos disponibles de un estudio de bioequivalencia promedio realizado en India por el *Bombay Bioresearch Centre* (BBRC) entre formulaciones conteniendo la asociación LPV/r en dosis de 200/50 mg: Kaletra® comprimidos, de aquí en más llamado REFERENCIA (R); y Lopimune® comprimidos, un producto similar de la empresa Cipla Ltda., el cual será mencionado como TEST (T). El diseño de dicho estudio consistió en un ensayo aleatorio, cruzado y compensado de 2 períodos y 2 secuencias, administrando cada producto en ayunas en dosis de LPV/r de 400/100 mg (dos comprimidos) sobre 72 voluntarios sanos de entre 18 y 45 años (36 hombres, 36 mujeres), número considerado necesario por los investigadores del BBRC debido principalmente al elevado  $CV_{RES}$  esperado para los parámetros de AUC y  $C_{MAX}$ . Se obtuvieron muestras plasmáticas hasta las 72 horas posdosis y se utilizó un período de lavado de 10 días. Los resultados del ensayo de bioequivalencia se resumen en la tabla 2.1, mientras que los perfiles plasmáticos medios obtenidos según el producto para LPV y RTV se ilustran en las figuras 2.2 y 2.3 respectivamente. La inclusión de la semivida de eliminación como parámetro en la tabla 2.1 obedece a que diferencias en biodisponibilidad de RTV según el producto podrían afectar el *clearance* de LPV.

Como se puede observar, tanto considerando LPV como RTV, el producto T resultó bioequivalente respecto al producto R. Si bien el primero muestra una mayor biodisponibilidad oral para LPV, el IC90% queda comprendido dentro de la especificación tanto para AUC como para  $C_{MAX}$ . No se registraron diferencias significativas en  $T_{MAX}$  LPV (ambos productos con una mediana de 3,5 horas) ni en  $T_{MAX}$  RTV (2,75 y 3,0 horas de mediana para T y R respectivamente). La semivida de LPV no parece haber sido afectada por las formulaciones debido al cociente T/R cercano a 1 tanto para  $t_{1/2}$  LPV como para AUC y  $C_{MAX}$  RTV.

Parámetro	LPV			RTV		
	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)
AUC <sub>72</sub>	1,07	0,99-1,17	30,4	0,97	0,89-1,04	29,0
AUC <sub>∞</sub>	1,07	0,99-1,17	30,8	0,96	0,89-1,05	31,5
C <sub>MAX</sub>	1,04	0,98-1,09	19,4	0,98	0,91-1,04	24,0
C <sub>MAX</sub> /AUC	0,96	0,89-1,05	30,1	1,02	0,93-1,11	33,8
t <sub>1/2</sub>	0,98	0,87-1,10	42,7	1,05	0,90-1,23	61,5

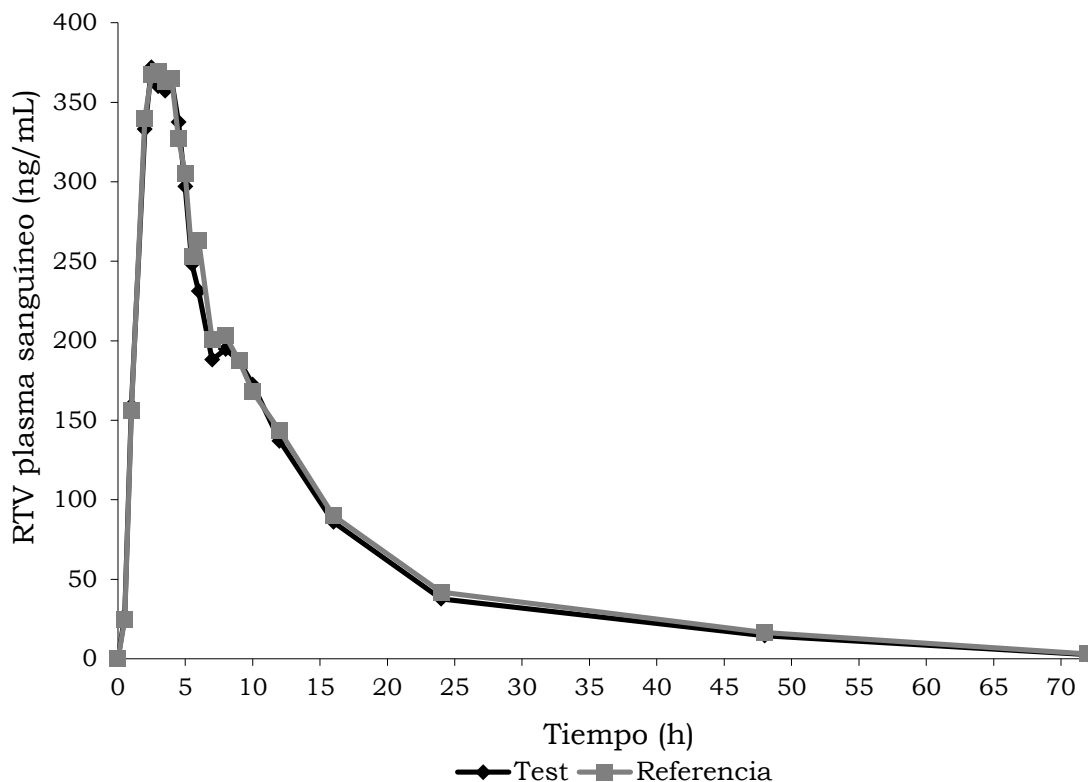
**Tabla 2.1.** Parámetros de bioequivalencia obtenidos para LPV y RTV en base a medias geométricas sobre 72 voluntarios sanos.



**Figura 2.2.** Perfiles plasmáticos medios obtenidos para LPV tras la administración de los productos T y R en 72 voluntarios sanos.

La magnitud de la variabilidad residual obtenida en los parámetros farmacocinéticos justificó el elevado número de voluntarios reclutados. Descartando el error analítico como contribuyente significativo de dicha variabilidad, la respuesta farmacocinética a las formulaciones LPV/r muestra ser altamente variable. Por un lado, el CV<sub>RES</sub> obtenido para t<sub>1/2</sub> LPV revela una alta variabilidad intraindividual en la disposición del fármaco. La

media obtenida para el total de voluntarios en este parámetro fue de 9,15 horas, valor que concuerda con estudios previos y para el cual ninguna tendencia fue observada asociada a los productos administrados o al sexo de los sujetos.



**Figura 2.3.** Perfiles plasmáticos medios obtenidos para RTV tras la administración de los productos T y R en 72 voluntarios sanos.

El otro componente de la variabilidad residual a resaltar es aquel agregado debido a la interacción sujeto-producto (ISP). Cuando el cociente T/R es cercano a 1, la magnitud de esta interacción puede estimarse de acuerdo a la proporción de sujetos con cocientes individuales T/R mayores que 1,25 y menores que 0,80 [127]. La tabla 2.2 fue construida ajustando los límites superior e inferior al cociente resultante para cada parámetro, a modo de mostrar la fracción de individuos cuyo cociente individual T/R se aleja en más de 20 % del cociente medio obtenido, la cual se puede asociar a una cierta magnitud de ISP. Los autores referenciados estiman como significativamente grande una ISP mayor a 0,150.

El parámetro con menor variabilidad residual fue  $C_{MAX}$ , lo cual es llamativo ya que es afectado en mayor medida por el error analítico y por el protocolo de muestreo. La variabilidad está presente tanto en la cantidad total de LPV/r absorbida como en la velocidad del proceso.

Parámetro	LPV				RTV			
	T/R	>20% (%)	<20% (%)	ISP*	T/R	>20% (%)	<20% (%)	ISP*
AUC <sub>72</sub>	1,07	29,2	27,8	0,375	0,97	22,2	26,4	0,325
AUC <sub>∞</sub>	1,07	33,3	27,8	0,400	0,96	22,2	25,0	0,325
C <sub>MAX</sub>	1,04	20,8	22,2	0,275	0,98	25,0	22,2	0,300
C <sub>MAX</sub> /AUC	0,96	30,6	26,4	0,400	1,02	30,6	25,0	0,375

**Tabla 2.2.** Interacción sujeto producto en estudio de bioequivalencia. \*El valor de ISP es aproximado, tomado de Hauck *et al.* [127], expresado como desviación estándar.

Al realizar el análisis de bioequivalencia por separado para hombres y mujeres se obtienen interesantes resultados, resumidos en la tabla 2.3.

Parámetro	LPV			RTV			
	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	
<b>HOMBRES</b> (N=36)	AUC <sub>72</sub>	1,02	0,90-1,16	32,3	0,98	0,88-1,11	30,0
	AUC <sub>∞</sub>	1,02	0,90-1,16	33,3	0,98	0,86-1,11	32,2
	C <sub>MAX</sub>	1,07	0,98-1,16	21,2	0,99	0,88-1,11	29,2
	C <sub>MAX</sub> /AUC	1,06	0,94-1,18	29,4	1,02	0,90-1,15	31,6
<b>MUJERES</b> (N=36)	AUC <sub>72</sub>	1,13	1,01-1,26	28,1	0,95	0,85-1,06	28,2
	AUC <sub>∞</sub>	1,14	1,02-1,27	29,9	0,95	0,84-1,07	31,2
	C <sub>MAX</sub>	1,01	0,94-1,08	17,3	0,96	0,90-1,04	18,1
	C <sub>MAX</sub> /AUC	0,88	0,78-0,99	29,9	1,01	0,88-1,17	36,1

**Tabla 2.3** Parámetros de bioequivalencia obtenidos para LPV y RTV en base a medias geométricas separados por sexo.

Mujeres presentan un cociente T/R para AUC LPV significativamente mayor a 1, mientras que para hombres el mismo se ubica cercano a la unidad. Esto significa que los productos T y R bajo estas condiciones de administración no son bioequivalentes en mujeres, pero sí en hombres. La fisiología gastrointestinal del sexo femenino reconoce diferencias entre productos farmacéuticos con impacto en la cantidad de LPV absorbida que no son detectadas en hombres. En cuanto a la velocidad de ingreso de LPV,



estimada mediante  $C_{MAX}/AUC$ , opuestos resultados se observaron para la comparación T/R según el sexo: 1,06 en hombres y 0,88 en mujeres. El cociente T/R para  $C_{MAX}$  LPV, estimador tanto de la velocidad como de la cantidad absorbida, fue el estimador puntual menos afectado por el sexo. Para RTV, no se observaron diferencias en el análisis de tendencias medias por sexo.

En cuanto a la variabilidad residual de los parámetros, hombres mostraron tendencia a presentar mayores magnitudes en las varianzas para AUC y  $C_{MAX}$  de ambos analitos. La diferencia se hace significativa para  $C_{MAX}$  RTV ( $p < 0,005$ ). La magnitud relativa de la varianza residual se mantuvo alta, mostrando que tanto hombres como mujeres presentan una elevada variabilidad intraindividual y componentes de interacción sujeto-producto no asociados al sexo.

Para analizar los resultados encontrados se hace necesario verificar mediante algún parámetro farmacocinético la ya mencionada presencia de una ventana de absorción para LPV. La figura 2.4 muestra un gráfico con la variación del cociente T/R en  $AUC_{\infty}$  respecto al cociente T/R en  $C_{MAX}/AUC$ . La utilización de  $C_{MAX}/AUC$  como parámetro de bioequivalencia se ha justificado debido a la correlación que posee con la constante de absorción en procesos de primer orden ( $k_A$ ). En un sistema donde no existe interrupción de la absorción ni metabolismo presistémico,  $C_{MAX}/AUC$  varía con  $k_A$  y con  $k_{EL}$  en igual sentido, y es independiente de la cantidad absorbida [128, 129]. Estudiando el cociente T/R, eliminamos la contribución de  $k_{EL}$  bajo la suposición de que la eliminación sistémica de fármaco no cambia significativamente para un mismo voluntario entre un período y otro, suposición que en bioequivalencia valida las conclusiones del ensayo y que está sustentada por el diseño del protocolo. Se ha planteado entonces que el T/R  $C_{MAX}/AUC$  varía únicamente con  $k_A$  y no debería por lo tanto mostrar ninguna correlación con el T/R en  $AUC_{\infty}$ . Sin embargo, puede demostrarse que cuando existe una interrupción de la absorción a tiempo  $T_F$ , el cociente  $C_{MAX}/AUC$  es afectado por la dosis biodisponible. Si  $T_F > T_{MAX}$ , la interrupción afectará únicamente el AUC, que disminuirá con menores  $T_F$  provocando que  $C_{MAX}/AUC$  aumente. Se puede demostrar que esta relación entre  $T_F$  y  $C_{MAX}/AUC$  se mantiene cuando  $T_F < T_{MAX}$ : siendo  $C(t)$  la concentración plasmática a lo largo del tiempo,  $C(T_F)$  tomaría el rol de  $C_{MAX}$  ya que no hay absorción posterior. Para un modelo de un compartimiento sin eliminación presistémica:

$$C(T_F) = C_{MAX} = \frac{(e^{-k_{EL}T_F} - e^{-k_A T_F}) * k_A * D^*}{V_D * (k_A - k_{EL})} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

$$AUC_{\infty} = \frac{(1 - e^{-k_A T_F}) * D^*}{V_D * k_{EL}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$D = (1 - e^{-k_A \cdot T_F}) * D^* \quad (\text{Ecuación 3})$$

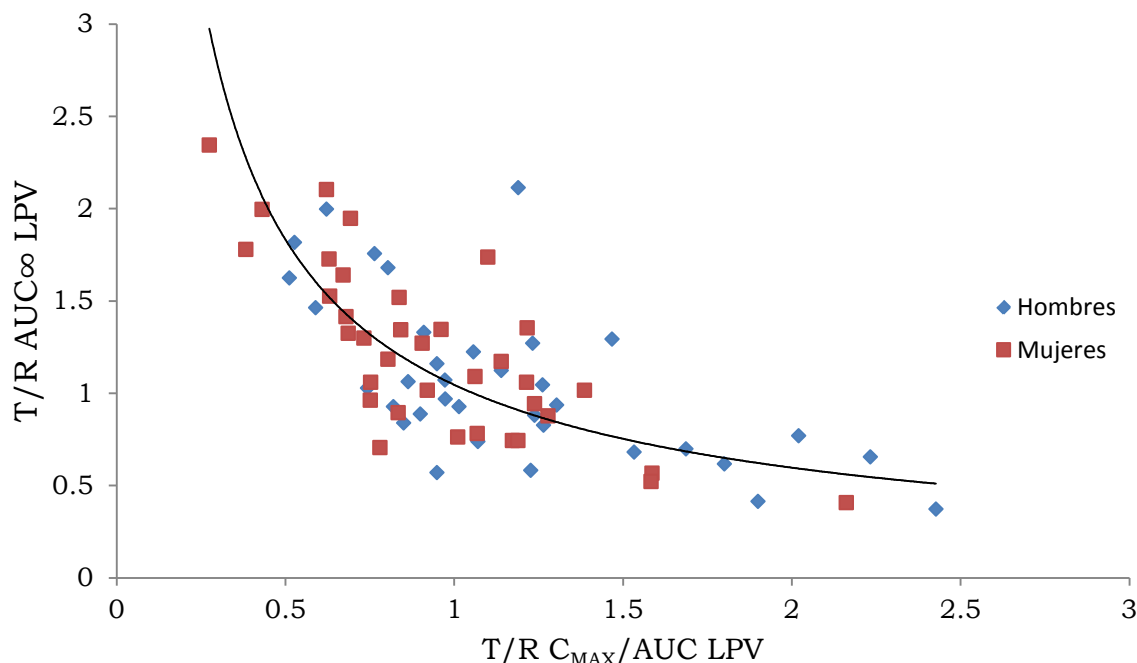
Siendo  $D^*$  la dosis administrada,  $D$  la fracción de dosis absorbida a tiempos inferiores que  $T_F$ , y  $k_{EL}$  la constante de eliminación de primer orden. Cuanto menor sea  $T_F$ , menor será  $D$  y menor por lo tanto será la biodisponibilidad. El cociente  $C_{MAX}/AUC$  puede escribirse como:

$$\frac{C_{MAX}}{AUC_{\infty}} = \frac{(e^{-k_{EL} \cdot T_F} - e^{-k_A \cdot T_F}) * k_A * D^*}{V_D * (k_A - k_{EL})} * \frac{V_D * k_{EL}}{(1 - e^{-k_A \cdot T_F}) * D^*} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Reordenando,

$$\frac{C_{MAX}}{AUC_{\infty}} = \frac{e^{-k_{EL} \cdot T_F} (1 - e^{-(k_A - k_{EL}) \cdot T_F})}{(1 - e^{-k_A \cdot T_F})} * \frac{k_A * k_{EL}}{(k_A - k_{EL})} \quad (\text{Ecuación 5})$$

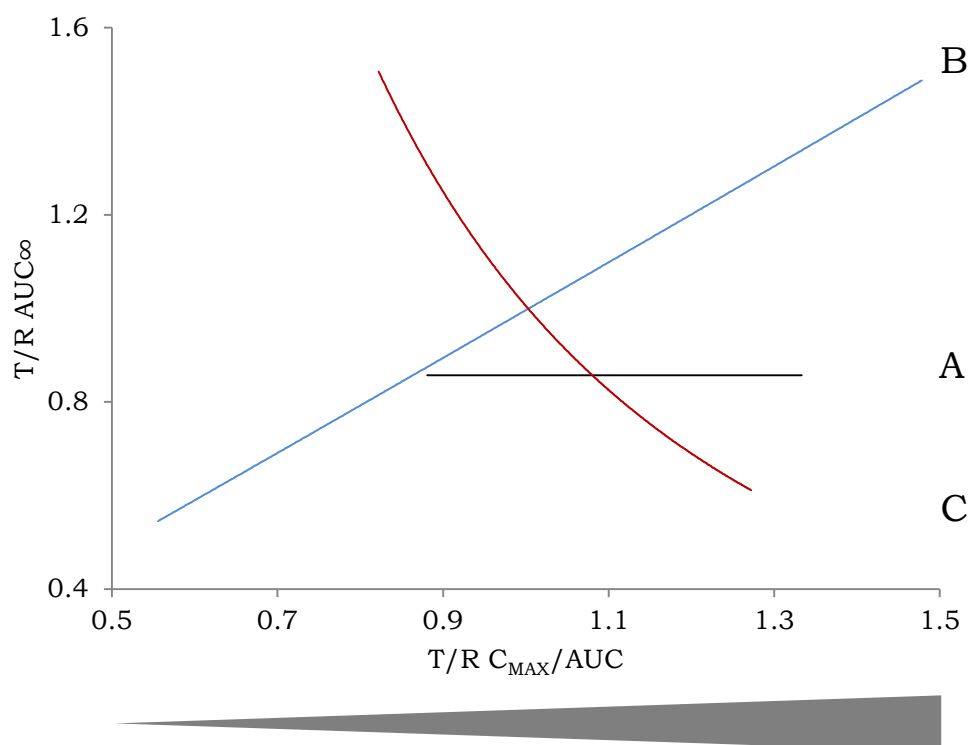
A medida que  $T_F$  disminuye, el término  $e^{-k_{EL} \cdot T_F}$  aumenta exponencialmente, el término  $(1 - e^{-(k_A - k_{EL}) \cdot T_F})$  disminuye, pero en menor medida que el término  $(1 - e^{-k_A \cdot T_F})$ , permaneciendo constantes el resto de los factores. Por lo tanto, con menores  $T_F$ , además de disminuir la biodisponibilidad el cociente  $C_{MAX}/AUC$  aumenta. Esto se daría para LPV ya que su metabolismo presistémico es fuertemente inhibido bajo la presencia de RTV y podría desprejiciarse a tiempos menores que  $T_F$ .



**Figura 2.4.** La relación entre los cocientes T/R de AUC y  $C_{MAX}/AUC$  obtenida para LPV en 72 voluntarios sanos indica la presencia de una ventana de absorción a nivel de las primeras porciones del intestino delgado. La línea de tendencia corresponde a una función potencial.

La tendencia observada en la figura 2.4 va de la mano con la presencia de una ventana de absorción. Cuando un voluntario presenta un cociente T/R en  $C_{MAX}/AUC$  mayor a la unidad, el cociente en AUC es menor a 1, y viceversa. Fisiológicamente, el  $T_F$  es el tiempo en el cual la dosis administrada se encuentra disuelta en una zona del intestino favorable a la absorción. Mayores  $T_F$  se traducen en un aumento de biodisponibilidad. De no existir esta interacción, el cociente T/R en AUC no debería modificarse en función del T/R en  $C_{MAX}/AUC$ .

La figura 2.5 muestra el resultado de simulaciones realizadas (Microsoft Excel®) asumiendo diferentes situaciones en un modelo farmacocinético de un compartimiento con absorción y eliminaciones, presistémica ( $k_{EP}$ ) y sistémica ( $k_{EL}$ ), de primer orden.

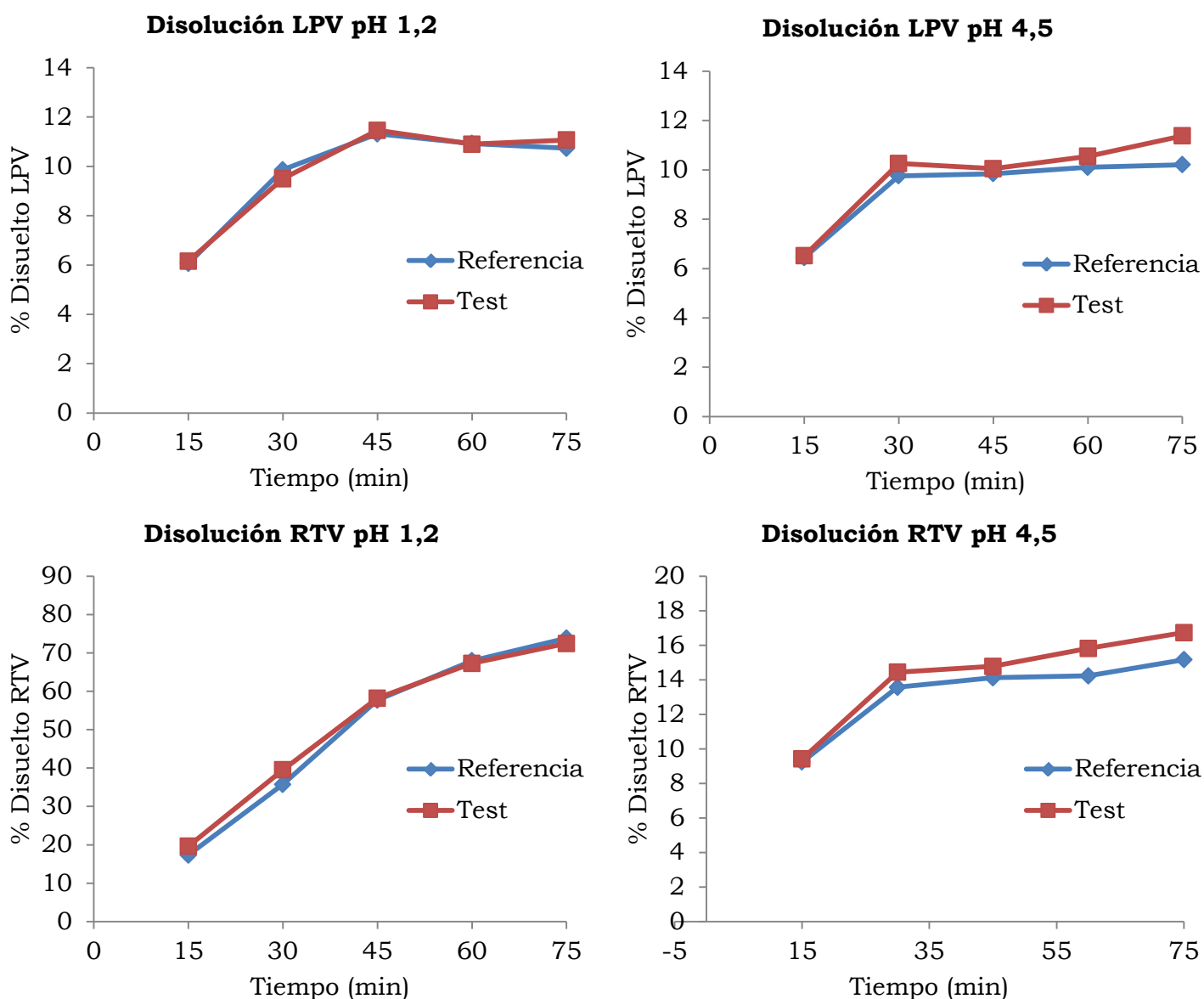


**Figura 2.5.** Tendencias medias para la relación  $T/R AUC_{\infty}$  respecto a  $T/R C_{MAX}/AUC$  para diferentes situaciones dentro de un sistema monocompartimental con eliminación de primer orden (constante): A) variación en  $k_A$  con metabolismo presistémico despreciable ( $k_{EP}=0$ ); B) variación en  $k_A$  con metabolismo presistémico no despreciable ( $k_{EP}=\text{constante}$ ); C) variación en  $k_{EP}$  con  $k_A$  constante. La barra gris inferior muestra la tendencia para la variación de las constantes en todos los casos.

La tendencia observada para LPV (figura 2.4) es similar a la situación C en la figura 2.5: variabilidad en  $k_{EP}$  (marcada por diferentes  $T_F$ ) con  $k_A$  constante.

Además del tiempo de residencia de la dosis en estómago, el pH del fluido gástrico puede jugar un rol importante debido a las características de los principios activos. En el CE BIOBE se realizaron ensayos de disolución *in*

*in vitro* de 6 comprimidos de cada formulación (T y R) en los tres medios biorrelevantes OMS con pH 1,2, 4,5 y 6,8. Se utilizó un volumen de medio igual a 900 mL termostatzado a  $37,0 \pm 0,5$  °C con agitación mediante paletas a 75 rpm (aparato II). La medición de concentraciones se hizo mediante HPLC-UV previo filtrado de la muestra por membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ , según una técnica desarrollada y validada por el Área Analítica del CEBIOBE. Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 2.6, exceptuando el perfil de disolución en medio pH 6,8 para el cual se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en medio pH 4,5.



**Figura 2.6.** Perfiles de disolución obtenidos para las formulaciones T y R en medios biorrelevantes OMS de pH 1,2 y 4,5.

El porcentaje disuelto para LPV en ambas formulaciones fue bajo, con similares resultados a pH 1,2 y una leve superioridad del producto T a pH

4,5. Como era de esperar, RTV logró disolverse en mayor cantidad a pH 1,2. A pH 4,5, el producto T también logra disolver RTV en un porcentaje superior que el producto R.

Hombres y mujeres difieren tanto en velocidad de vaciado gástrico como en el pH del fluido gástrico. La ventana de absorción hace que la biodisponibilidad sea errática. Los fragmentos de comprimido no disueltos se distribuyen de manera no homogénea en la luz estomacal. En algunas ocasiones, la frecuente apertura del píloro en ayunas puede hacer pasar al intestino pequeños fragmentos con tamaño entre 1 a 2 mm de diámetro, los cuales tienen un rápido pasaje por la zona de absorción. En otras ocasiones, el pasaje de estas fracciones es menos abrupto, permitiendo así que la dosis pueda continuar disolviéndose en el estómago e ir pasado al intestino con mayor rendimiento de absorción. En hombres, RTV tendría mayor velocidad de disolución gracias al bajo pH gástrico, provocando un rápido y más errático pasaje por la ventana de absorción. La mayor variabilidad de RTV en hombres no afectó la absorción de LPV, ya que probablemente la cantidad disuelta sea mayor a la necesaria para lograr inhibir el metabolismo presistémico de LPV. La tendencia para una mayor variabilidad en los parámetros de LPV hombres estaría dada por su más rápido tránsito gastrointestinal.

El cociente T/R AUC de LPV para hombres y mujeres muestra correlación con los perfiles de disolución obtenidos para cada producto a pH 1,2 y pH 4,5 respectivamente. Si bien las diferencias *in vitro* a pH 4,5 son pequeñas, denotan una tendencia que se acentuaría *in vivo* en mujeres, donde el pH de fluidos gástricos e intestinales es menos ácido y la solubilidad de RTV podría estar más limitada. Bajo estas condiciones, una pequeña ventaja del producto T frente al R en velocidad de disolución de RTV, podría producir una ventaja aún mayor en la biodisponibilidad del LPV debido al efecto potenciador de RTV. El T/R AUC de RTV no fue diferente a 1 en mujeres, quizás porque, considerando la limitada solubilidad de ambos fármacos (situación opuesta a la observada para hombres donde la solubilidad de RTV es mayor), la fracción extra disuelta de RTV en el T aumentó el ingreso de LPV a través de su propia biotransformación.

Es interesante observar cómo para mujeres el cociente T/R  $C_{MAX}$  LPV no se aparta de la unidad. La lenta velocidad de disolución de LPV marca un lento ingreso a la circulación sistémica, provocando perfiles farmacocinéticos poco oscilantes. Por esto, la interrupción de la absorción, que tiene un efecto significativo sobre AUC, no afecta tanto a  $C_{MAX}$ . La menor variabilidad residual obtenida para el ANOVA en este parámetro para todos los voluntarios también se explica con un lento ingreso de fármaco, siendo la excepción RTV en hombres.

### **Estudio de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo LPV/r llevado a cabo en el CEBIOBE. Estudio C (EC).**

Al diseñar el ensayo clínico para evaluar la bioequivalencia entre las mismas formulaciones (Kaletra®, R; y Lopimune®, T) llevado a cabo en el CEBIOBE, el análisis descrito anteriormente fue considerado. Se pretendía llevar a cabo el estudio con un número de voluntarios sanos significativamente menor, lo cual podía llevar a un resultado inconcluyente en caso de mantenerse la variabilidad registrada por el estudio del BBRC. La principal diferencia finalmente incluida en el protocolo fue la administración de los medicamentos posterior a la ingesta de una comida de moderado contenido graso.

Los efectos más importantes que provocaría la ingesta de comidas previo a la toma de dosis a punto de vista de la biodisponibilidad de LPV/r serían: enlentecimiento del vaciado gástrico, aumento del volumen y pH del fluido estomacal y aumento de la motilidad del intestino delgado (efectos fisiológicos); y mayor disolución de principios activos poco solubles en agua debido a la estimulación de secreción de sales y lípidos biliares y presencia de productos de la digestión de lípidos (efecto fisicoquímico) [44, 130–134]. Para fármacos de Clase BCS II, como Ciclosporina A formulada como emulsión (Sandimun®, Novartis), se ha observado un significativo aumento de la solubilidad y la velocidad de disolución en líquido intestinal simulado para condiciones poscomidas (de 16 y 7 veces respectivamente) [135, 136].

Al enlentecer el vaciado gástrico y mejorar la disolución de los principios activos, la administración de LPV/r con comidas disminuiría la variabilidad farmacocinética y aumentaría la biodisponibilidad de LPV/r. La interacción sujeto-producto se vería reducida significativamente en caso de estar asociada a la presencia de una ventana de absorción. Este modo de administración es además fácilmente adaptable a la práctica clínica ya que el intervalo entre dosis según la indicación posológica es de 12 horas, pudiendo coincidir con el desayuno y la cena de los pacientes bajo tratamiento. En cuanto al sexo, la administración con comidas disminuiría las diferencias hombre-mujer, al acercar el tiempo de residencia y el pH gástrico de hombres a los parámetros encontrados en mujeres. Esto es fundamental para una conclusión de bioequivalencia promedio donde como fue demostrado, el valor final enmascara diferencias T-R en mujeres. Si bien existe el riesgo de que al aumentar el pH las diferencias T-R observadas *in vitro* determinen bioinequivalencia (como se observó en mujeres), no se debería esperar el mismo perfil de disoluciones ya que el contenido del medio gástrico cambia drásticamente con la ingesta de alimentos. La solubilidad de los principios activos se verá favorecida por la presencia de grasas en estómago, y en duodeno por la presencia de sales biliares. El

significativo aumento de la biodisponibilidad, tal como está reportado, podría anular diferencias entre productos.

Se realizó entonces un estudio de bioequivalencia promedio aleatorio, cruzado y compensado de 2 períodos y 2 secuencias. Se reclutaron 16 voluntarios (8 hombres, 8 mujeres) de entre 18 y 37 años de edad, que recibieron 400/100 mg de LPV/r (dos comprimidos) de cada producto en la mañana 15 minutos después de ingerir un desayuno de moderado contenido graso. Las administraciones de T y R fueron separadas por un período de lavado de 7 días. Se tomaron muestras de sangre previo a la administración y hasta las 48 horas posdosis. Los voluntarios fueron internados en las instalaciones del CEBIOBE por 24 horas, tiempo en el cual recibieron alimentación estandarizada, continuando luego de manera ambulatoria. El protocolo de investigación fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química (UdelaR), y todos los voluntarios firmaron consentimiento informado luego de recibir detalles del ensayo. La cuantificación de LPV y RTV en plasma sanguíneo fue realizada mediante HPLC-UV, de acuerdo a una técnica analítica desarrollada y validada en el CEBIOBE, adaptada de Verbesselt *et al.* [137].

Parámetro	LPV			RTV		
	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)
AUC <sub>T</sub>	1,03	0,98-1,08	6,30	1,09	1,01-1,19	8,61
AUC <sub>∞</sub>	1,02	0,97-1,07	7,87	1,06	0,92-1,21	20,3
C <sub>MAX</sub>	1,03	0,98-1,09	8,03	1,07	1,00-1,15	9,93
C <sub>MAX</sub> /AUC	1,00	0,95-1,05	7,63	1,03	0,96-1,11	10,5
t <sub>1/2</sub>	0,98	0,90-1,07	13,9	0,97	0,78-1,20	33,1

**Tabla 2.4.** Parámetros de bioequivalencia obtenidos para LPV y RTV en base a medias geométricas sobre 16 y 14 voluntarios sanos respectivamente. AUC<sub>T</sub> significa AUC<sub>24</sub> para LPV y AUC<sub>16</sub> para RTV.

Los resultados de bioequivalencia obtenidos considerando todos los voluntarios, y analizando mujeres y hombres por separado se resumen en las tablas 2.4 y 2.5 respectivamente. El AUC parcial (AUC<sub>T</sub>) fue truncada para LPV a las 24 horas y para RTV a las 16 horas posdosis, ya que a tiempos posteriores pocos voluntarios presentaron concentraciones superiores a los respectivos límites de cuantificación. En el análisis de RTV, un sujeto mostró concentraciones muy disímiles al resto de los voluntarios,

por lo que se decidió quitarlo del análisis. Para mantener la compensación estadística, se quitó además un voluntario de sexo y secuencia opuestos.

	Parámetro	LPV			RTV		
		T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)
<b>HOMBRES</b>	AUC <sub>T</sub>	1,04	0,94-1,14	9,75	1,05	0,89-1,23	12,2
	AUC <sub>∞</sub>	1,01	0,95-1,16	11,7	1,00	0,75-1,32	30,1
	C <sub>MAX</sub>	1,04	0,96-1,13	8,41	1,03	0,94-1,12	8,28
	C <sub>MAX</sub> /AUC	1,05	0,98-1,12	6,91	0,99	0,85-1,15	13,4
<b>MUJERES</b>	AUC <sub>T</sub>	1,02	0,97-1,07	3,95	1,14	1,03-1,27	6,40
	AUC <sub>∞</sub>	1,02	0,98-1,07	4,65	1,12	0,96-1,30	15,5
	C <sub>MAX</sub>	1,03	0,95-1,11	8,16	1,12	1,01-1,24	8,06
	C <sub>MAX</sub> /AUC	1,03	0,96-1,11	7,36	0,97	0,91-1,04	6,35

**Tabla 2.5.** Parámetros de bioequivalencia obtenidos en EC para LPV (8 hombres, 8 mujeres) y RTV (7 hombres, 7 mujeres) en base a medias geométricas separados por sexo. AUC<sub>T</sub> significa AUC<sub>24</sub> y AUC<sub>16</sub> para LPV y RTV respectivamente.

En primer lugar, la exposición absoluta a LPV/r para estos voluntarios fue mayor que aquella observada en el EA. Considerando el peso de los voluntarios, el AUC<sub>T</sub>\*kg LPV fue un 33,3% mayor ( $p < 0,0001$ ), mientras que el AUC<sub>T</sub>\*kg RTV un 21,3% mayor ( $p < 0,001$ ). Estos resultados respaldarían un significativo aumento de la biodisponibilidad luego de administradas las formulaciones poscomida.

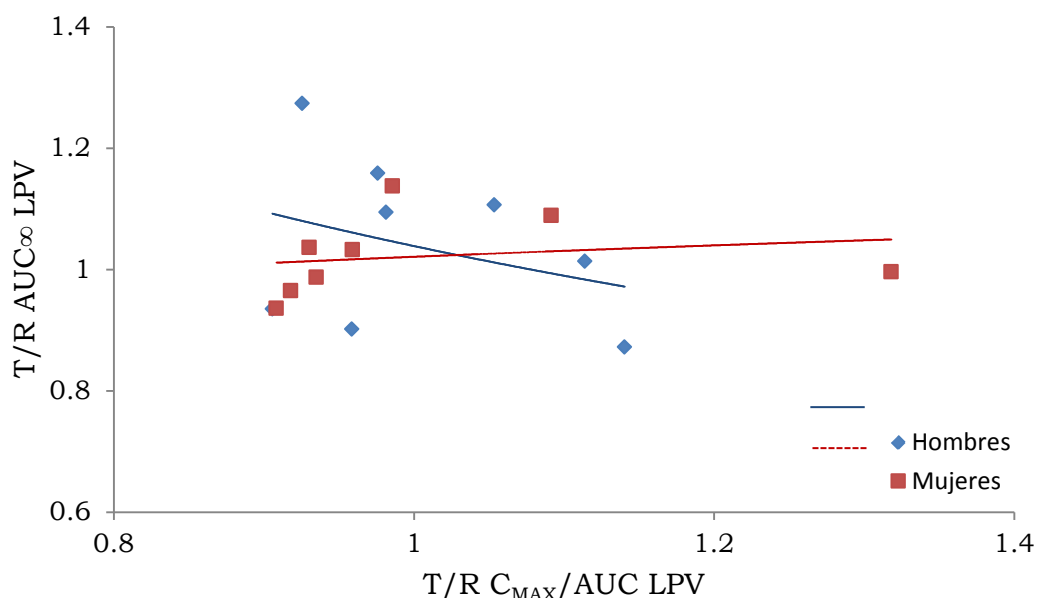
Los productos T y R resultaron bioequivalentes tanto considerando la biodisponibilidad de LPV como de RTV, ya que el IC90% para todos los parámetros se encontró dentro de la especificación 0,80-1,25 con cocientes T/R muy cercanos a la unidad. No se encontraron diferencias significativas para T<sub>MAX</sub> de LPV ni de RTV entre formulaciones. La variabilidad residual de todos los parámetros fue significativamente reducida respecto al ensayo en ayunas ( $p < 0,001$ ), comprobándose un más reproducible ingreso de fármacos gracias a la administración conjunta de las formulaciones con comida. El impacto sobre la ISP fue muy importante, para LPV tan sólo un individuo presentó un cociente menor al 20 % del T/R promedio en el parámetro C<sub>MAX</sub>/AUC (ISP=0,130), siendo nula dicha cantidad para el resto de los parámetros (ISP=0). Para RTV, se registró un ISP de 0,175 para C<sub>MAX</sub>, 0,150 para los parámetros de AUC y 0,100 para C<sub>MAX</sub>/AUC. La variabilidad



residual para RTV es alta en aquellos parámetros que incorporan la estimación de la constante de disposición lenta ( $t_{1/2}$  y  $AUC_{\infty}$ ), por lo que estaría asociada en mayor medida a la disposición del fármaco y al mayor error analítico provocado por la medición de bajas concentraciones.

La bioequivalencia entre T y R se concluye para LPV no sólo en el total de voluntarios, sino también en hombres y mujeres por separado. Pese al bajo número de sujetos para cada sexo, el IC90% para todos los parámetros fue incluido en el intervalo de bioequivalencia. Esto no fue así para RTV, donde la variabilidad farmacocinética y la mayor biodisponibilidad oral para el producto T en mujeres no permitieron concluir bioequivalencia en cada subgrupo.

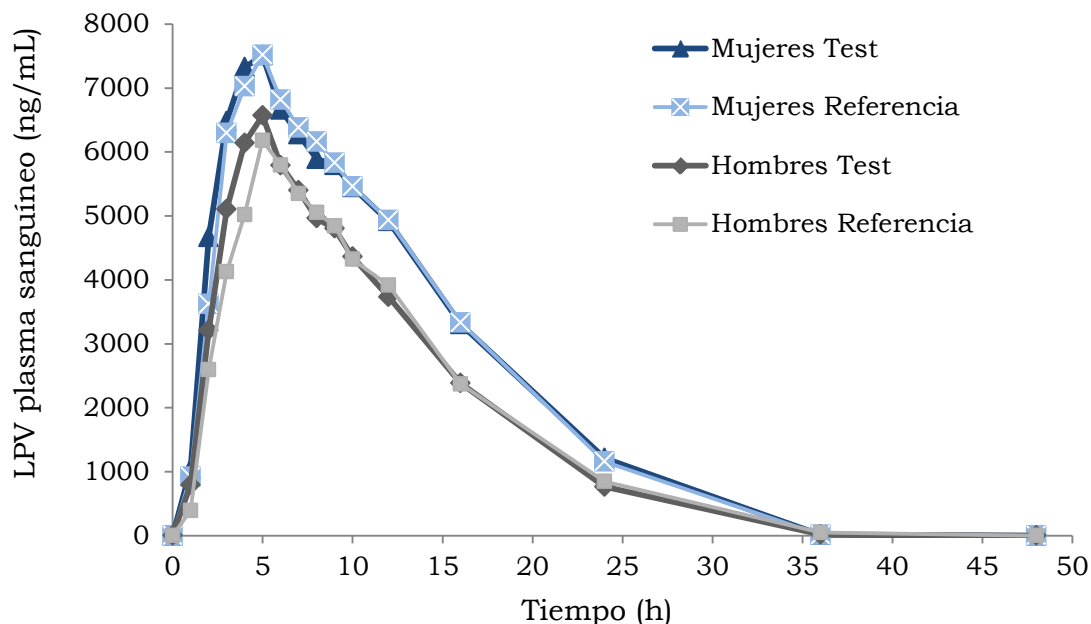
Si bien la administración de la dosis luego de una comida de moderado contenido graso redujo las diferencias entre hombres y mujeres, aún se observa el impacto de una diferente fisiología. La mayor variabilidad residual para AUC de LPV y RTV en hombres estaría asociada a la ventana de absorción. Aún en estas condiciones, hombres tienen mayor fuerza de contracción y menor tiempo de residencia de la dosis en el estómago. La interrupción en la absorción continúa siendo significativa para hombres, evidenciado no sólo por la mayor variabilidad en biodisponibilidad de LPV/r respecto a mujeres, sino también en la tendencia T/R AUC *vs.* T/R  $C_{MAX}/AUC$  (figura 2.7). Nótese que salvo un par de puntos, abajo y a la izquierda, se mantiene la tendencia de una ventana de absorción en hombres.



**Figura 2.7.** Relación entre AUC y  $C_{MAX}/AUC$  obtenida para LPV en hombres y mujeres, estudio EC.

Probablemente, la mayor motilidad sea el factor que provoque la interrupción de la absorción en hombres. De cualquier manera, la variabilidad que agrega la ventana de absorción es menor debido al más lento vaciado gástrico y a una mejor solubilización de los fármacos en los fluidos gastrointestinales. Se debe considerar que en condiciones de ayunas, LPV, con una solubilidad de 0,027 mg/mL está siendo administrado en una dosis de 400 mg sobre un volumen medio de 250 mL, llevando a condiciones de sobresaturación del fluido gástrico. El aumento de la solubilidad debido al mayor volumen y a la presencia de tensoactivos (más significativa en duodeno) es muy significativo. Es probable que la administración de una comida de alto contenido graso produzca un aumento mayor en la cantidad absorbida y una disminución adicional de la variabilidad en la biodisponibilidad.

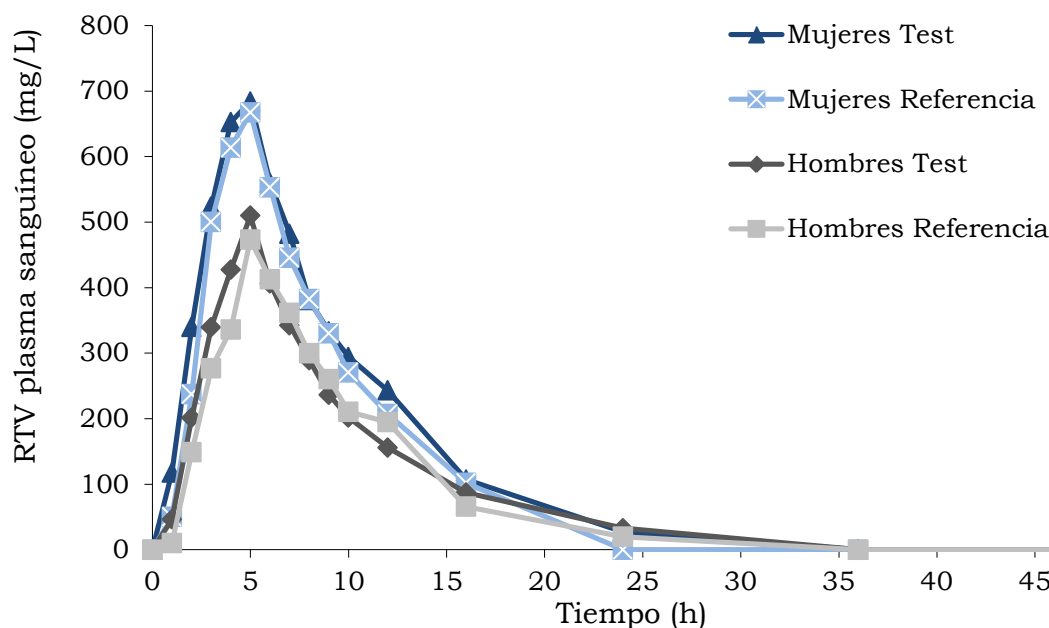
En mujeres, el cociente T/R RTV significativamente mayor a 1 para  $C_{MAX}$  y  $AUC_{16}$  se correlaciona con los resultados hallados *in vitro*, ya que aún presentarían pH gástrico mayor a hombres. Esta diferencia encontrada para RTV no tuvo impacto en la biodisponibilidad de LPV posiblemente porque el efecto inhibitorio de RTV sobre el metabolismo presistémico de LPV este ya alcanzando un máximo para el producto R.



**Figura 2.8.** Perfiles plasmáticos medios obtenidos para LPV tras la administración de los productos T y R en 8 hombres y 8 mujeres.

Mediante las figuras 2.8 y 2.9 se ilustran los perfiles farmacocinéticos obtenidos para LPV y RTV en hombres y mujeres tras administración de las formulaciones T y R. La tabla 2.6 resume un análisis no compartimental

realizado para los principales parámetros farmacocinéticos, los cuales no mostraron diferencias significativas asociadas al sexo.



**Figura 2.9.** Perfiles plasmáticos medios obtenidos para RTV tras la administración de los productos T y R en 7 hombres y 7 mujeres.

	<b>T<sub>MAX</sub>*</b> <b>(h)</b>	<b>C<sub>MAX</sub></b> <b>(ng/mL)</b>	<b>AUC<sub>T</sub></b> <b>(mg*h/L)</b>	<b>t<sub>1/2</sub></b> <b>(h)</b>	<b>CL/F</b> <b>(L/h/kg)</b>	<b>V<sub>D</sub></b> <b>(L/kg)</b>
<b>LPV</b>						
Hombres (N=8)	5,0 (0,25)	6447 (20,0)	73,92 (37,0)	4,72 (42,8)	0,0634 (35,6)	0,432 (21,6)
Mujeres (N=8)	4,0 (1,25)	7728 (15,4)	97,15 (28,7)	4,99 (45,8)	0,0672 (27,4)	0,484 (21,2)
Total (N=16)	5,0 (1,0)	7059 (19,9)	84,74 (35,6)	4,85 (43,7)	0,0653 (31,3)	0,457 (21,9)
<b>RTV</b>						
Hombres (N=7)	5,0 (1,0)	501,2 (29,7)	3,362 (47,2)	4,34 (40,4)	0,327 (55,9)	2,05 (42,0)
Mujeres (N=7)	5,0 (1,75)	722,0 (26,0)	4,955 (34,4)	4,61 (25,4)	0,3030 (43,2)	2,01 (33,6)
Total (N=14)	5,0 (1,25)	601,5 (33,5)	4,081 (45,7)	4,47 (33,0)	0,315 (49,0)	2,03 (37,3)

**Tabla 2.6.** Medias (CV%) para parámetros farmacocinéticos de LPV y RTV resultantes del análisis no compartimental. \*Para T<sub>MAX</sub> se informa mediana (rango intercuartílico).

Si bien la exposición en mujeres fue mayor, con mayores AUC y  $C_{MAX}$ , la diferencia sería atribuible al peso corporal, y desaparece una vez que el mismo es considerado. La incidencia de eventos adversos probablemente relacionados a LPV/r de intensidad leve, no severos, se registró en 3 mujeres y 2 hombres. El principal evento adverso fue la deposición de materia fecal líquida y dolor abdominal (para los 2 hombres y una mujer), habiendo menor incidencia de cefalea (2 mujeres) y náuseas y vómitos (una mujer).

### **Conclusiones**

La administración de LPV/r con comidas aumenta la biodisponibilidad y reduce significativamente la variabilidad en la absorción y disposición de LPV/r. En cuanto a la bioequivalencia de medicamentos, la administración con comidas no sólo permitiría un intercambio más seguro entre marcas comerciales al disminuir la variabilidad del cociente T/R, sino que evita la bioinequivalencia en un número muy elevado de pacientes, como se demostró comparando los valores de ISP. El diseño del ensayo de bioequivalencia promedio realizado en el CEBIOBE permitió: a) arribar a una conclusión estadística reclutando un número significativamente menor de voluntarios sanos, reduciendo costos económicos y éticos; b) demostrar bioequivalencia no sólo para el promedio de sujetos, sino también para hombres y mujeres por separado, hecho que no se cumplimentaba en el ensayo EA y que constituye un avance en el concepto de bioequivalencia; y c) demostrar bioequivalencia en las condiciones de administración de la práctica clínica, cada 12 horas con desayuno y cena, condiciones que favorecerían la adherencia al tratamiento antirretroviral.

Se desprende de estos análisis que la recomendación de administración de la formulación LPV/r debe ser “con comidas” y no “con o sin comidas” como recomienda actualmente el fabricante del producto original. Además de aumentar la biodisponibilidad, de este modo se evitaría poner al paciente en una situación de bioinequivalencia intraindividual.

Por último, tanto tras la administración de LVP/r comprimidos con comida como en ayunas, se evidencian diferencias en cuanto a la fisiología gastrointestinal de hombres y mujeres, con impacto en la biodisponibilidad y bioequivalencia de LPV/r. No se observaron en ninguno de los ensayos, diferencias significativas para la disposición de LPV/r según el sexo de los individuos.

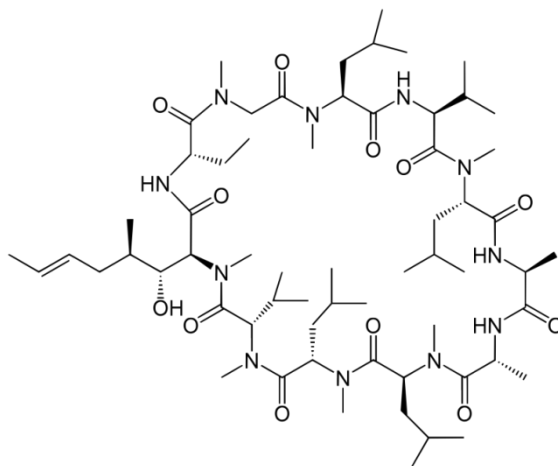
## CAPITULO 3. Respuesta farmacocinética a ciclosporina A formulada como microemulsión

---

La investigación presentada en el presente capítulo dio lugar a la publicación del artículo científico N° III.

### Introducción

La Ciclosporina A (CyA, figura 3.1) es un péptido cíclico de 11 aminoácidos producido por el hongo *Beauveria Nivea*, con potente actividad inmunosupresora asociada a la inhibición de la calcineurina. Es utilizada durante la prevención y tratamiento del rechazo inmune al trasplante de órganos sólidos o médula ósea en asociación con otros fármacos inmunomoduladores. También es indicada para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como psoriasis, dermatitis atópica, artritis reumatoide, entre otras. Es un fármaco de estrecho margen terapéutico, principalmente debido a su nefrotoxicidad, aunque también provoca hirsutismo, temores, hipertensión e hiperplasia gingival [138, 139].



**Figura 3.1.** Estructura química de Ciclosporina A.

Es clasificada por el BCS como fármaco de clase II. Debido a su muy baja solubilidad en medio acuoso (0,0052 mg/mL [140]). Sin embargo, el desarrollo de las formulaciones actuales en las cuales el fármaco se encuentra ya disuelto en una microemulsión permitió aumentar enormemente la solubilidad (0,91 mg/mL) [141]. La microemulsión se comercializa como tal, bajo forma de solución oral (SO), o contenida en cápsulas de gelatina blanda (CGB). Estas formulaciones ingresadas en 1995 permitieron aumentar la biodisponibilidad oral de CyA y disminuir significativamente la variabilidad interindividual respecto a formulaciones anteriores basadas en una emulsión [142, 143]. De cualquier manera el producto innovador, Sandimmun Neoral® de Laboratorios Novartis, presenta aún una incompleta absorción: aproximadamente el 40% de la

dosis ingresa a la circulación sistémica [144]. La pérdida de cantidad biodisponible se debe mayoritariamente al extenso metabolismo presistémico en enterocitos e hígado mediado por CYP3A4 y Pgp [145–148]. En línea con lo presentado en el capítulo anterior, Grevel *et al.* [149] describieron la presencia de una posible ventana de absorción para CyA formulada como emulsión (Sandimmun®) en zona proximal del intestino delgado luego de obtener perfiles sanguíneos de fármaco en hombres sanos. Respecto al efecto de los alimentos sobre la absorción oral de CyA para formulaciones basadas en la microemulsión, Novartis reporta que tanto con comidas de alto como de bajo contenido graso se detectó una pérdida de biodisponibilidad, con descensos en AUC y  $C_{MAX}$  de 13% y 33% respectivamente [138]. Llamativamente, para formulaciones previas de CyA (emulsión), el efecto de las comidas era el opuesto. Kees *et al.* observaron un aumento medio de 20% en AUC de CyA administrada bajo forma de emulsión contenida en CGB luego de la ingesta de un desayuno de alto contenido graso, aumento que fue mayor para hombres, únicos voluntarios que presentaron además un significativo aumento en  $C_{MAX}$  [150].

La CyA se distribuye ampliamente en el organismo. Su significativa y variable distribución a eritrocitos obliga a realizar dosificaciones sobre sangre entera. Presenta metabolismo mayoritariamente hepático e intestinal, catalizado principalmente por la isoforma CYP3A4. Solo un 0,1% de la dosis biodisponible es excretada en orina [138].

Respecto al sexo, existen reportes contradictorios respecto a diferencias en la disposición de CyA. Mientras algunos estudios no encontraron influencia del sexo [151, 152], otros hallaron menor CL en mujeres [153], y otros menor CL en hombres [154]. Estos estudios coinciden en referenciar un efecto significativo de la etnia sobre la farmacocinética del fármaco, pudiendo esto ser el factor detrás de los diferentes hallazgos.

El presente capítulo incluye el análisis de datos disponibles de estudios de bioequivalencia realizados en Canadá por PharmaNet entre el producto original Neoral® (referencia, R), y Sigmasporin® (test, T), en condiciones de ayunas y bajo presencia de alimentos, tanto entre formulaciones SO como entre CGB conteniendo microemulsión de CyA (4 estudios de bioequivalencia promedio). Posteriormente se incluye el análisis de un estudio de bioequivalencia realizado en el CEBIOBE entre los mismos productos para las CGB en condiciones de ayunas.

**Análisis sobre estudios de bioequivalencia realizados en Canadá: resultados.**

Datos de los siguientes ensayos de bioequivalencia promedio fueron analizados previo a la realización de un similar ensayo en el CEBIOBE. Para todos ellos se utilizó un diseño aleatorio, cruzado y compensado, de 2 períodos y 2 secuencias, con un período de lavado de 14 días. La dosis de CyA administrada en todos los casos fue de 200 mg: 2 mL de SO (presentación de 100 mg/mL) y 2 CGB (presentación de 100 mg) por producto.

- Estudio SA: entre SO en condiciones de ayuno. Completado por 32 voluntarios sanos, 14 mujeres y 18 hombres; 29 caucásicos, 2 hispanoamericanos y 1 afrodescendiente. Ningún voluntario era fumador de tabaco. Se tomaron muestras de sangre hasta las 36 horas posdosis.
- Estudio SC: entre SO administradas 30 minutos luego de la ingesta de un desayuno de alto contenido graso y calórico. Completado por 33 voluntarios sanos, 6 mujeres y 27 hombres; 21 caucásicos, 7 hispanoamericanos y 5 afrodescendientes. Ningún voluntario era fumador de tabaco. Se tomaron muestras de sangre hasta las 36 horas posdosis.
- Estudio CAC: entre CGB en condiciones de ayuno. Completado por 34 voluntarios, 16 mujeres y 18 hombres; todos caucásicos. Ningún voluntario era fumador de tabaco. Se tomaron muestras de sangre hasta las 48 horas posdosis.
- Estudio CCC: entre CGB, administradas 30 minutos luego de la ingesta de un desayuno de alto contenido graso y calórico. Completado por 33 voluntarios, 9 mujeres y 24 hombres; todos caucásicos. Ningún voluntario era fumador de tabaco. Se tomaron muestras de sangre hasta las 48 horas posdosis.

Los resultados de bioequivalencia entre los productos T y R para las SO y CGB se resumen en las tablas 3.1 y 3.2 respectivamente. Se presentan los resultados únicamente para  $AUC_T$  ya que en todos los casos representó más del 95% del  $AUC_\infty$ .

En todos los estudios se arribó a la conclusión de bioequivalencia entre los productos T y R para el total de voluntarios. No se registraron diferencias significativas en los  $T_{MAX}$  de las formulaciones en ningún caso. Las CGB mostraron un  $T_{MAX}$  independiente del sexo, con mediana igual a 1,25 horas

administradas en condiciones de ayuno y 1,50 horas administradas poscomida. Para la solución oral el  $T_{MAX}$  presentó mayor dependencia con la presencia de alimentos, con medianas para estudios SA y SC de 1,25 y 2,25 horas respectivamente.

Tanto en cantidad como en velocidad de ingreso de CyA se observó menor variabilidad residual para las administraciones en ayunas, con diferencias significativas entre varianzas para SO en  $C_{MAX}$  ( $p < 0,0001$ ) y  $C_{MAX}/AUC$  ( $p < 0,01$ ), y para CGB en  $AUC_T$  y en  $C_{MAX}$  ( $p < 0,0001$ ).

	Parámetro	Estudio SA			Estudio SC		
		T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)
<b>TOTAL</b>	$AUC_T$	0,99	0,95-1,04	9,97	0,94	0,89-0,99	11,9
	$C_{MAX}$	0,98	0,94-1,02	9,75	0,91	0,82-1,02	24,3
	$C_{MAX}/AUC$	0,99	0,94-1,03	10,4	0,97	0,90-1,04	16,3
<b>HOMBRES</b>	$AUC_T$	0,96	-	-	0,93	-	-
	$C_{MAX}$	0,97	-	-	0,90	-	-
	$C_{MAX}/AUC$	1,01	-	-	0,97	-	-
<b>MUJERES</b>	$AUC_T$	1,04	-	-	0,93	-	-
	$C_{MAX}$	0,99	-	-	0,95	-	-
	$C_{MAX}/AUC$	0,96	-	-	1,01	-	-

**Tabla 3.1.** Resumen de resultados de bioequivalencia entre SO de CyA (microemulsión). El análisis por sexo no incluye IC90% ni CV<sub>RES</sub> dado que las secuencias no se compensaron intra-sexo y existió un efecto significativo del período. Para el análisis TOTAL del estudio SC se quitaron aleatoriamente 3 hombres a modo de compensar las secuencias en el total de voluntarios, el T/R no varió para ningún parámetro.

Comparando los valores de  $AUC_{\infty} * kg$  entre los ensayos con y sin comida, y asumiendo igual CL para los diferentes estudios, no se observaron diferencias de biodisponibilidad para las CGB, en tanto que una pérdida media de biodisponibilidad del 31,2% se observó para las soluciones orales administradas bajo presencia de alimentos ( $p < 0,0001$ ). Para esta interacción hubo un significativo efecto del sexo, ya que en mujeres se registró una biodisponibilidad de CyA 41,4% menor, mientras que en hombres el descenso fue de 31,3% ( $p < 0,05$ ). De hecho, la exposición en hombres fue un 34,8% mayor que en mujeres para el estudio SC. Además, para estas formas



farmacéuticas, la presencia de alimentos incrementó las diferencias entre productos.

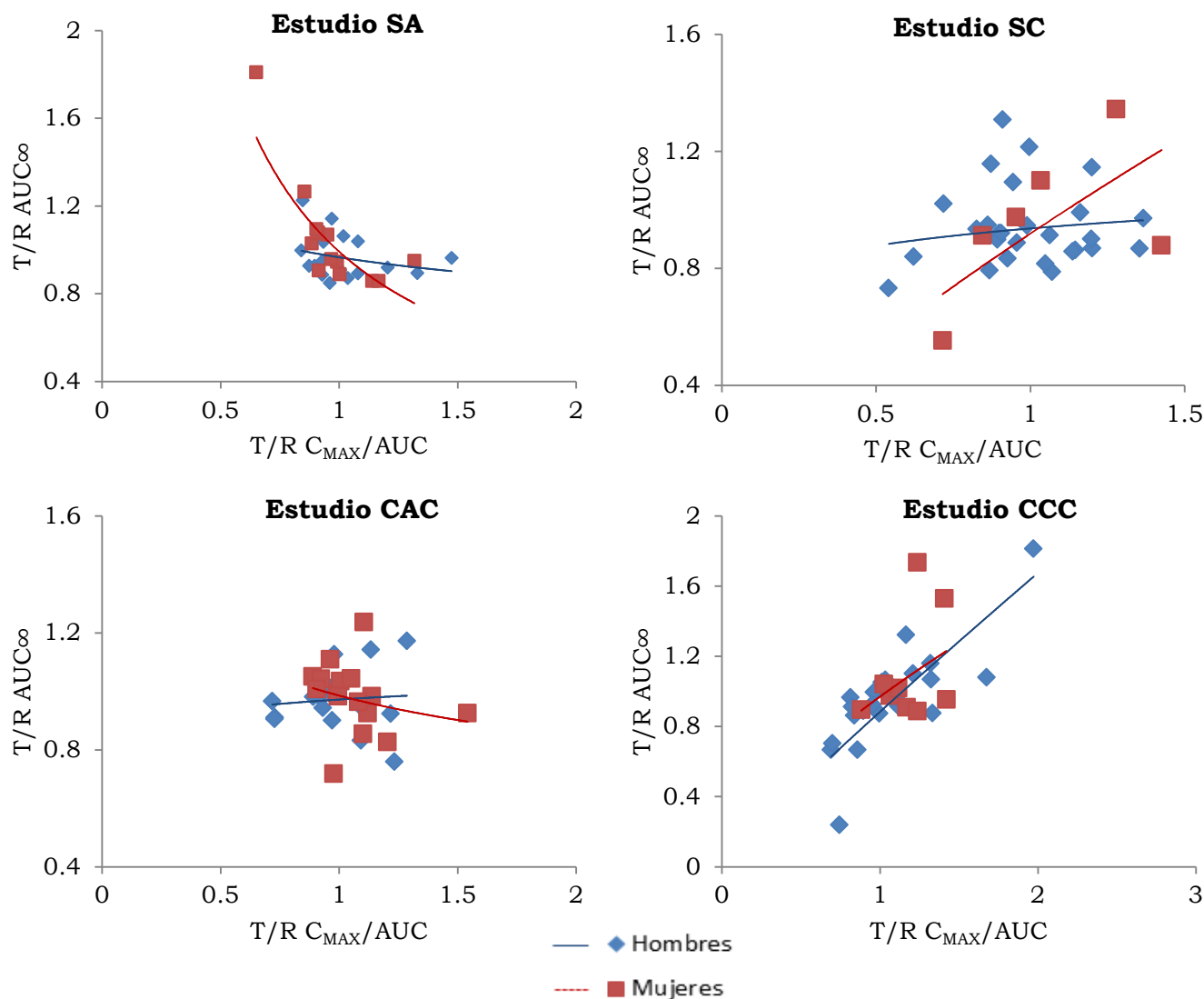
Únicamente en el estudio CCC se evidencia una interacción sexo-producto. La conclusión de bioequivalencia concluida para el total de voluntarios no fue verificada ni en hombres ni en mujeres por separado, presentando cocientes T/R opuestos respecto a la unidad. La variabilidad residual, tanto para AUC como para  $C_{MAX}$ , fue mayor en los voluntarios masculinos ( $p < 0,0001$ ). Para el ensayo en ayunas (CAC) no se observó esta interacción.

	Parámetro	Estudio CAC			Estudio CCC		
		T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)	T/R	IC90%	CV <sub>RES</sub> (%)
<b>TOTAL</b>	AUC <sub>T</sub>	0,98	0,95-1,01	7,84	0,96	0,86-1,07	24,1
	$C_{MAX}$	0,98	0,93-1,04	13,7	1,03	0,87-1,22	40,2
	$C_{MAX}/AUC$	1,03	0,97-1,09	14,4	1,07	1,00-1,16	17,4
<b>HOMBRES</b>	AUC <sub>T</sub>	0,98	0,94-1,02	6,87	0,91	0,80-1,04	26,1
	$C_{MAX}$	0,95	0,87-1,03	14,5	0,94	0,75-1,17	44,4
	$C_{MAX}/AUC$	1,01	0,92-1,12	17,0	1,03	0,93-1,14	19,8
<b>MUJERES</b>	AUC <sub>T</sub>	0,98	0,93-1,03	8,93	1,08	0,92-1,26	17,9
	$C_{MAX}$	1,03	0,96-1,10	11,4	1,25	1,00-1,55	24,6
	$C_{MAX}/AUC$	1,05	0,99-1,12	10,2	1,16	1,09-1,23	6,69

**Tabla 3.2.** Resumen de resultados de bioequivalencia entre CGB conteniendo microemulsión de CyA. En el estudio CAC las secuencias estaban compensadas intra-sexo. Para el estudio CCC, al no haber efecto significativo del periodo la descompensación de las secuencias no introduce error en la comparación T-R por lo tanto se incluyen todos los resultados.

La figura 3.2 muestra las gráficas T/R AUC<sub>∞</sub> respecto a T/R  $C_{MAX}/AUC$  para los cuatro estudios realizados.

Por último, para el total de 87 hombres y 45 mujeres participantes en los estudios evaluados, se observó una diferencia asociada al sexo en la semivida de eliminación, 10,3 y 13,2 horas respectivamente ( $p < 0,0001$ ). No existieron diferencias significativas para el CL/F luego de corregir por peso, con una media de 0,669 L/h/kg en el total de voluntarios. Sí se encontraron diferencias significativas para el  $V_D/F$ , siendo 13,6 y 10,0 L/kg las medias para mujeres y hombres respectivamente ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 3.2.**  $T/R AUC_{\infty}$  respecto a  $T/R C_{MAX}/AUC$  para los cuatro estudios realizados. Se incluye como línea de tendencia una función potencial.

### Estudio de bioequivalencia realizado en Uruguay: resultados.

Para el estudio de bioequivalencia promedio llevado a cabo entre CGB de los mismos productos en el CEBIOBE se decidió realizar la administración en condiciones de ayuno debido a la menor variabilidad residual y a la ausencia de la interacción sexo-producto. Participaron 16 voluntarios sanos (8 hombres y 8 mujeres con pesos medios iguales a 77,2 y 67,4 kg respectivamente), a los cuales se les administraron 200 mg de CyA de cada producto (2 CGB) separados por un período de lavado de 14 días. Las secuencias fueron compensadas dentro de cada sexo. Una considerable cantidad de voluntarios, 9, eran fumadores de tabaco (4 hombres, 5 mujeres). Los voluntarios fueron internados en las instalaciones del CEBIOBE por 24 horas, tiempo en el cual recibieron alimentación estandarizada, continuando luego de manera ambulatoria. El protocolo de

investigación fue previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química (UdelaR), y todos los voluntarios firmaron consentimiento informado luego de recibir detalles del ensayo. Las concentraciones de CyA fueron analizadas en sangre entera mediante técnica de inmunofluorescencia de luz polarizada (FPIA-AxSYM®, Laboratorios Abbott), en un período de 45 horas posterior a la administración.

La tabla 3.3 resume los resultados de bioequivalencia estimados, mientras que la figura 3.3 muestra los perfiles para CyA obtenidos para T y R en hombres y mujeres. El AUC<sub>T</sub> constituyó en promedio 95% del AUC<sub>∞</sub>, por lo que el monitoreo de niveles sanguíneos de CyA fue adecuado. Se incluye sólo el análisis para AUC<sub>T</sub>.

	<b>Parámetro</b>	<b>Media T<sup>a</sup></b>	<b>Media R<sup>a</sup></b>	<b>T/R*</b>	<b>IC90%*</b>	<b>CV<sub>RES</sub>* (%)</b>
<b>TOTAL</b> <b>(N=16)</b>	AUC <sub>T</sub> (ng*h/mL)	4509	4500	1,00	0,95-1,06	8,77
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	1131	1118	1,01	0,93-1,10	13,5
	T <sub>MAX</sub> (h)	2,00	1,33	0,67	0,25-0,67	0,42
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,2367	0,2321	1,02	0,94-1,11	13,6
<b>HOMBRES</b> <b>(N=8)</b>	AUC <sub>T</sub> (ng*h/mL)	4358	4243	1,03	0,93-1,13	10,1
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	1060	1035	1,02	0,94-1,12	9,15
	T <sub>MAX</sub> (h)	2,0	1,33	0,67	0,58-0,67	0,09
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,2297	0,2295	1,00	0,90-1,11	11,2
<b>MUJERES</b> <b>(N=8)</b>	AUC <sub>T</sub> (ng*h/mL)	4667	4773	0,98	0,90-1,06	8,11
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	1207	1207	1,00	0,84-1,19	18,5
	T <sub>MAX</sub> (h)	1,67	1,50	0,17	-0,33-0,34	0,67
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,2441	0,2346	1,04	0,88-1,22	16,8

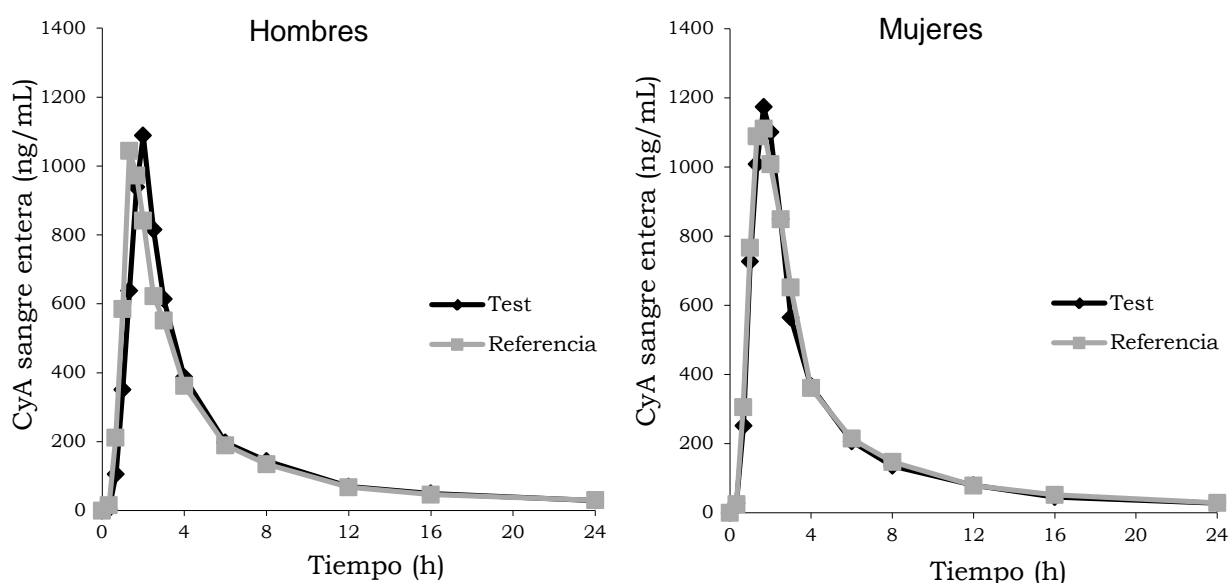
**Tabla 3.3.** Resultados de bioequivalencia entre CGB conteniendo microemulsión de CyA llevado a cabo en el CEBIOBE. <sup>a</sup>Se informa la media geométrica de todos los parámetros excepto para T<sub>MAX</sub>, para el cual se informa la mediana. \*Para T<sub>MAX</sub> se informa como T/R la diferencia de medianas T-R, como IC90% el rango entre el 1er y 3er cuartil, y su amplitud como CV<sub>RES</sub>.

En paralelo se realizó un ensayo de apertura de cápsulas *in vitro* para detectar posibles diferencias entre ambos productos. Se analizaron 6

cápsulas de cada marca comercial. El parámetro estimado en este ensayo fue el tiempo de apertura completa de cápsula en 500 mL de medio pH 1,2 a  $37,0 \pm 0,5$  °C, utilizando agitación con paletas a 50 rpm. Si bien la apertura de las CGB fue rápida para ambos productos, se detectó una significativa diferencia entre T y R, cuyos tiempos medios ( $\pm$ IC95%) fueron  $12,4 \pm 5,0$  y  $6,0 \pm 2,4$  minutos respectivamente.

Los resultados del ensayo muestran que los productos T y R son bioequivalentes, tanto en el total de voluntarios como en hombres y mujeres por separado. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el estudio CAC en cuanto a cocientes T/R y a variabilidad residual. La principal diferencia se observó para  $T_{MAX}$ , parámetro para el cual se registró un mayor valor en el producto T. Este resultado podría estar originado por el mayor tiempo de apertura de cápsula observado *in vitro*.

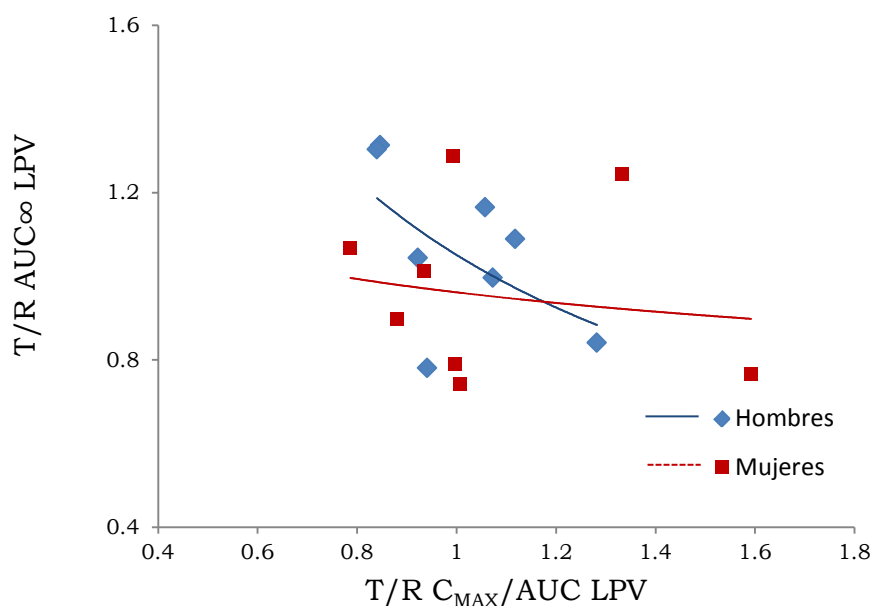
Considerando hombres únicamente, la diferencia T-R en  $T_{MAX}$  se torna significativa ( $p < 0,02$ ). Hombres presentaron consistentemente un mayor  $T_{MAX}$  para el producto T como se evidencia en los perfiles farmacocinéticos medios (figura 3.3), una diferencia entre productos que no fue detectable en mujeres, para las cuales las diferencias T-R se acomodaron entorno a cero.



**Figura 3.3.** Perfiles medios de CyA obtenidos tras la administración de 200 mg para los productos T y R en 8 hombres y 8 mujeres.

La figura 3.4 muestra el gráfico para T/R  $AUC_{\infty}$  respecto a T/R  $C_{MAX}/AUC$  para este ensayo en hombres y mujeres.

La diferente discriminación de marcas comerciales respecto a  $T_{MAX}$  no fue la única diferencia asociada al sexo. Mujeres presentaron mayor variabilidad en parámetros de velocidad de ingreso,  $C_{MAX}$  y  $C_{MAX}/AUC$ . Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas.



**Figura 3.4.** T/R AUC $\infty$  respecto a T/R C<sub>MAX</sub>/AUC para el estudio de bioequivalencia llevado a cabo por el CEBIOBE. Se incluye como línea de tendencia una función potencial.

Los valores absolutos de AUC<sub>T</sub> y C<sub>MAX</sub> fueron mayores para mujeres (tabla 3.3), diferencias que desaparecen luego de corregir los parámetros por el peso corporal de los sujetos. La tabla 3.4 muestra los valores medios para parámetros de disposición, donde no se encontraron diferencias significativas asociadas al sexo.

	<b>t<sub>1/2</sub></b> <b>(h)</b>	<b>CL/F</b> <b>(L/h/kg)</b>	<b>V<sub>D</sub>/F</b> <b>(L/kg)</b>
Hombres (N=8)	13,3 (65,8%)	0,590 (62,4%)	11,3 (67,0%)
Mujeres (N=8)	14,8 (64,3%)	0,591 (63,0%)	12,6 (66,8%)
Total (N=16)	14,0 (65,0%)	0,590 (62,6%)	11,9 (66,8%)

**Tabla 3.4.** Medias (CV%) para parámetros de disposición de CyA en voluntarios sanos.

Se registraron eventos adversos de intensidad leve posiblemente relacionables a CyA durante el estudio, en ningún caso se trató de un evento severo. Tres hombres adujeron calor en cara y cuerpo entre 1 y 2 horas posdosis, dos de ellos tras recibir el producto T. La incidencia del mismo evento adverso en mujeres fue mayor, 10 eventos, 5 luego de administrado el producto T y 5 luego de administrado el R. Una de ellas presentó además cefalea y otra adujo malestar estomacal. La mayor exposición a CyA en

mujeres debido a una mayor dosis/kg de fármaco es relacionable con el perfil de eventos adversos registrado luego de una única administración.

Si bien no se encuentra dentro del alcance de este capítulo, existió un efecto significativo del consumo de tabaco sobre la exposición de CyA. Los voluntarios fumadores presentaron menor exposición (mayor CL/F,  $p < 0,005$ ), probablemente asociado a una pérdida de biodisponibilidad.

### **Discusión de resultados**

Tanto los resultados de los estudios previos como los obtenidos por el CEBIOBE demuestran que los productos T y R son bioequivalentes, con cocientes T/R de los parámetros principales cercanos a la unidad tanto para SO como para CGB, administrados en condiciones de ayuno y bajo presencia de alimentos. La variabilidad residual es altamente dependiente de las condiciones de administración, siendo mayor para dosis poscomidas.

Los diferentes ensayos clínicos llevados a cabo en Canadá son muy interesantes para comprender el proceso de absorción de CyA en microemulsión, donde el metabolismo presistémico no es despreciable sino que es la principal causa de la pérdida de biodisponibilidad. Los gráficos de la figura 3.2 muestran cómo la tendencia  $T/R AUC_{\infty}$  vs.  $T/R C_{MAX}/AUC$  es diferente según la formulación y las condiciones de administración utilizadas. El principal factor asociado a esta diferencia sería la velocidad media con la cual la CyA es transferida desde el estómago hacia el duodeno ( $v_{ed}$ ). En el estudio SA se observa el más rápido inicio de la absorción de CyA, ya que no existe un proceso de liberación de la microemulsión ni aumento en el tiempo de retención gástrico por presencia de alimentos. Esto además se evidencia en la ausencia de tiempos de latencia: todos los voluntarios presentaron concentraciones detectables de CyA en la primer muestra posdosis (20 minutos). El rápido pasaje de CyA al duodeno origina condiciones de saturación enzimática (velocidad de absorción  $\gg$  velocidad de eliminación presistémica), ya que mientras que el ingreso de fármaco sigue una cinética de primer orden, el metabolismo presistémico presenta una cinética enzimática y con elevadas concentraciones de fármaco alcanza una velocidad máxima constante (condiciones de saturación). Esto ocurre al menos en las primeras porciones del intestino donde hay un rápido ingreso hacia la circulación sistémica. Para algunos sujetos, principalmente mujeres, con mayor variabilidad intraindividual en el vaciado gástrico y menores  $v_{ed}$ , el metabolismo presistémico aumenta en relación a la absorción a medida que se enlentece el pasaje desde estómago a duodeno. La leve tendencia observada en la figura 3.2 para este estudio avalaría esta hipótesis.

Para el estudio SC, las condiciones son bien diferentes. La menor biodisponibilidad de CyA obtenida en este ensayo respecto al SA sumado al significativamente menor valor medio obtenido en  $C_{MAX}/AUC$  para el total de voluntarios (0,1359 y 0,2423  $h^{-1}$  respectivamente,  $p < 0,0001$ ), evidencian una menor  $v_{ed}$ . Para este estudio se registró la menor velocidad de ingreso de CyA. Es probable que la microemulsión al ser administrada como tal bajo presencia de alimentos en el estómago se desnaturalice formando una emulsión. El pasaje hacia el duodeno es muy lento, acompañando a los alimentos digeridos, y produciendo entonces concentraciones de CyA en enterocitos muy por debajo del nivel de saturación enzimática. El metabolismo presistémico compite así con el ingreso de CyA al organismo. Esto se traduce en una baja biodisponibilidad oral. La  $v_{ed}$  es limitante de la cinética de las transferencias de CyA a nivel intestinal, al modificarse afecta de igual manera las velocidades de los procesos de absorción y de eliminación presistémica. La variabilidad en  $v_{ed}$  produce el gráfico observado para el estudio SC. Para las formulaciones SO, la exposición obtenida para CyA evaluada como  $AUC \cdot kg$  fue mayor en hombres que en mujeres ( $p < 0,05$ ), un 15,1% en SA y un 34,8% en SC.  $C_{MAX} \cdot kg$  también fue significativamente mayor en hombres, un 21,0% y un 60,4% en SA y SC respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Una menor  $v_{ed}$  en mujeres podría argumentar a favor de una pérdida de biodisponibilidad respecto al hombre, el cual presenta una comprobada menor residencia de contenido estomacal. No se considera que el CL sea la causa de diferentes  $AUC \cdot kg$  ya que si bien la mujer expresa más CYP3A4 también posee menor expresión de Pgp que el hombre, y por tanto podría suponerse que ambos fenómenos se compensarían llevando a un similar CL. La diferencia en  $t_{1/2}$  que se obtuvo entre hombres y mujeres podría explicarse por un mayor volumen de distribución de la mujer. A causa de una mayor proporción de tejido graso, por el cual la CyA presenta gran afinidad, el fármaco presenta mayor distribución extravasal reduciendo la velocidad de eliminación.

Al administrar CyA en cápsulas se observa que la biodisponibilidad es independiente del sexo y de la coadministración con comidas. De alguna manera, la CGB protege a la microemulsión de la interacción con alimentos presentes en el estómago, y de la amplia diseminación por la luz estomacal que tendría cuando se la administra en ayunas. En otras palabras, hombres y mujeres, ayuno y comida, lo que harían es entregar bien rápidamente el contenido al estómago, o bien fraccionándolo en sucesivas entregas. En cambio la solución ampliamente dispersada en el estómago de hombres y mujeres, sigue diferente curso si se transfiere como un proceso de primer orden rápido (hombres) o de primer orden lento (mujeres).

De hecho, el  $T_{MAX}$  de CyA luego de administrarse como CGB con comidas es menor al observado luego de administrada como SO con comidas (medianas de 1,50 y 2,25 horas respectivamente), y es apenas mayor al observado luego de administrada como SO en ayunas (1,25 horas). El impacto principal de la presencia de alimentos sobre la biodisponibilidad en el caso de CGB es un aumento de la variabilidad en el proceso de transferencia estómago-duodeno de fracciones con alta concentración de CyA. La ausencia de una tendencia para  $T/R AUC_{\infty}$  respecto a  $T/R C_{MAX}/AUC$  en el ensayo CAC obedece a la baja variabilidad residual de AUC. Para el ensayo CCC, la errática biodisponibilidad produce una importante tendencia en el mismo gráfico. Una alta concentración de CyA (CAC y CCC) genera condiciones de saturación del metabolismo presistémico, en tanto que una baja concentración de cada entrega gástrica hace que la eliminación presistémica compita de forma significativa como lo demostró el ensayo SC. Respecto al sexo, hombres presentaron mayor variabilidad residual tanto en cantidad absorbida como en velocidad de ingreso de CyA al organismo, mientras que la variabilidad de mujeres estaría asociada principalmente a la cantidad biodisponible. Es probable que la interacción sexo-producto que muestra la tabla 3.2 esté asociada al impacto de dos mujeres con elevados cocientes  $T/R$  en un grupo pequeño de individuos (ver figura 3.2).

El estudio de bioequivalencia realizado por el CEBIOBE obtuvo similares resultados que su análogo CAC. La variabilidad fue baja para los parámetros farmacocinéticos, respaldando la administración en ayunas como recomendación a la práctica clínica. Hombres discriminaron los productos T y R en cuanto a  $T_{MAX}$ . El mayor tiempo de apertura de cápsula observado in vitro para el producto T al evaluar los lotes utilizados para el estudio in vivo pudo ser detectado en hombres. Esto no tiene impacto en la cantidad absorbida, sino en una mayor latencia para el producto T respecto al R, que en la práctica clínica no generaría diferencias farmacodinámicas.

Si bien estuvieron repartidos casi equitativamente entre los sexos, la presencia de un significativo número de fumadores puede haber afectado el análisis de diferencias hombre-mujer. Para los voluntarios no fumadores, si bien dado su escasa cantidad por sexo no es posible realizar un análisis estadístico, los promedios para  $t_{1/2}$ ,  $CL/F$  y  $V_D$  en hombres y mujeres fueron 13,7 y 16,1 horas, 0,515 y 0,483 L/h/kg, y 10,1 y 11,2 L/kg respectivamente.

## **Conclusiones**

La biodisponibilidad de CyA en microemulsión es altamente dependiente de su pasaje desde el estómago al duodeno, y del mantenimiento de su integridad como microemulsión, tal como se evidencia en la pérdida de



cantidad absorbida cuando la solución oral es administrada con comidas. Formulada como solución oral, tanto la presencia de alimentos en estómago como el sexo tienen gran impacto en la absorción de CyA. Como reportan varios autores, estos resultados confirman que mujeres presentan un vaciado gástrico más lento. Contenida en cápsulas de gelatina blanda, el efecto de la comida y del sexo no fue evidenciado por los resultados de estos ensayos. Es probable que en este caso la microemulsión sea transferida hacia el duodeno de modo más uniforme, al menos en condiciones de ayuno.

La coadministración con comidas aumenta significativamente la variabilidad en la biodisponibilidad de CyA, tanto para solución oral como para cápsulas de gelatina blanda. Este efecto puede estar asociado a la mayor variabilidad en vaciado gástrico provocada por la presencia de alimentos. Dado que la eficacia del fármaco es altamente dependiente de la exposición generada en las primeras horas posdosis, se debería indicar la administración en ayunas.

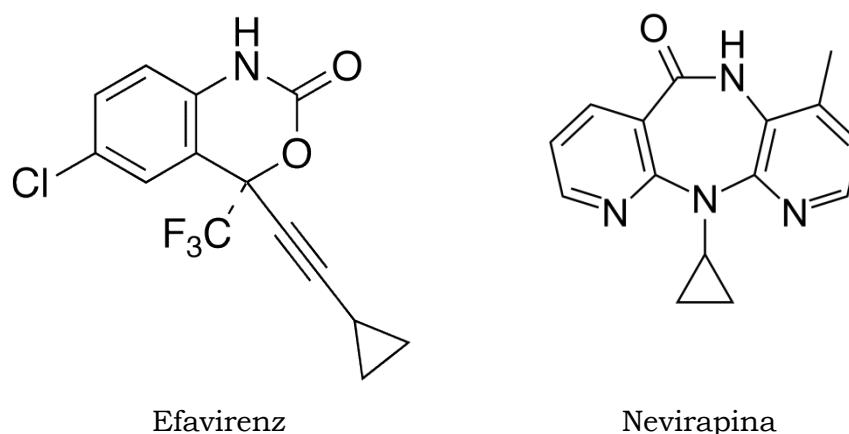
El uso de las formulaciones de solución oral de microemulsión de CyA debería evitarse, ya que introducen una interacción con el sexo (hombres presentando mayor biodisponibilidad) y es más sensible a la presencia de alimentos en estómago.

Si bien no son concluyentes, los resultados sugieren una menor biodisponibilidad de CyA para mujeres y una menor semivida en hombres. La menor composición grasa del sexo masculino llevaría a un menor volumen de distribución de la droga y con ello se explicaría la menor retención corporal. La mayor expresión de Pgp y menor expresión de CYP3A4 en hombres no impactaría sobre el CL de CyA de manera disímil a la mujer, ya que ésta por sus inversas expresiones de ambas proteínas alcanzaría un similar resultado.

## CAPITULO 4. Bioequivalencia de antirretrovirales inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

### Introducción

Efavirenz (EFV) y nevirapina (NVP) son fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) clasificados como “no análogos de nucleósidos”, sus estructuras químicas son ilustradas en la figura 4.1. Son ampliamente utilizados en el tratamiento de la infección por VIH en combinación con otros fármacos. Dependiendo del tratamiento se incluye EFV o NVP a la terapia antirretroviral. Poseen una eficacia similar, pero diferentes perfiles de toxicidad, NVP presenta mayor incidencia de erupciones cutáneas (rash), síndrome de Stevens-Johnson y hepatotoxicidad, mientras que EFV se asocia con toxicidad a nivel del sistema nervioso central (SNC) y con teratogenicidad, aunque también presenta incidencia de rash cutáneo [155].



**Figura 4.1.** Estructuras química de Efavirenz y Nevirapina.

EFV es utilizado en la práctica clínica bajo una dosis diaria de 600 mg debido a su larga  $t_{1/2}$  (entre 40 y 55 horas en estado estacionario). Es metabolizado principalmente por CYP2B6, con contribuciones menores de CYP3A4/5 y CYP2A6, dando lugar a metabolitos inactivos hidroxilados que luego son sometidos a glucuronidación para ser excretados. EFV también es sometido a N-glucuronidación directa mediada por UGT2B7, proceso que se hace significativo a mediano plazo bajo tratamiento [156–158]. EFV induce su propio metabolismo, tras una dosis única la  $t_{1/2}$  se encuentra entre 52 y 76 horas. Circula altamente unido a proteínas plasmáticas (99,5%) y se distribuye ampliamente. En estado estacionario las concentraciones en SNC superan a las plasmáticas libres [159]. Esto, sumado a otros estudios, sugiere que no es sustrato de transportadores de eflujo [160–163]. Al administrarse en ayunas como comprimidos su biodisponibilidad oral es

elevada pero incompleta, ya que al ser administrado en presencia de alimentos de alto contenido graso (1000 kcal, 500-600 correspondientes a grasas), tanto  $AUC_{\infty}$  como  $C_{MAX}$  aumentan en un 28% y 79% respectivamente [159]. La principal causa de este efecto es la baja solubilidad del EFV en solución acuosa a valores de pH menores que 7,5 (menor a 0,02 mg/mL) [164]. Esto lo ubica como un fármaco de clase II en la clasificación biofarmacéutica (baja solubilidad/alta permeabilidad). Debido a que los efectos adversos de EFV se asocian a elevadas concentraciones plasmáticas [165, 166], se prefiere administrar las dosis en condiciones de ayuno.

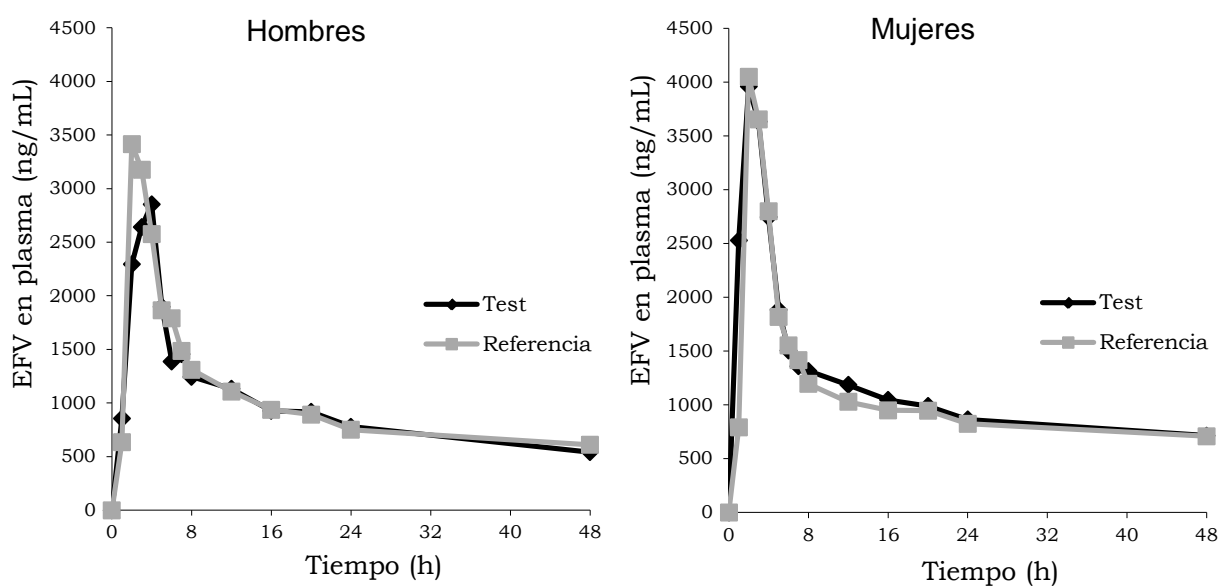
NVP también es una molécula altamente lipofílica y de bajo peso molecular, sin embargo al ser una base débil ( $pK_a=2,8$  para la base protonada) su baja solubilidad en medio acuoso a  $pH>4$  (0,1 mg/mL) aumenta significativamente a  $pH 1,5$  (1,9 mg/mL)[167]. Los comprimidos presentan una biodisponibilidad oral mayor al 90% luego de una dosis única administrada con o sin comidas [168–170]. La posología recomendada es de 200 mg administrados cada 12 horas, comenzando el tratamiento con 200 mg diarios por 14 días, ya que la NVP también induce su propio metabolismo, la  $t_{1/2}$  de 45 horas tras las dosis iniciales se reduce a 20 horas luego de 2 a 4 semanas [171]. En el organismo, la NVP se distribuye ampliamente, presentando un volumen de distribución mayor que el agua corporal total. Se ha observado una elevada penetración del fármaco en el SNC, siendo en estado estacionario la relación entre concentración en líquido cefalorraquídeo y concentración plasmática aproximadamente igual a la fracción de fármaco que circula libre (no unido a proteínas plasmáticas), la cual representa un 40% [172–174]. Esto va de la mano con estudios *in vitro* cuyos resultados indican que NVP no es sustrato de transportadores de eflujo [162, 163, 175]. La eliminación de NVP se da por metabolismo oxidativo mediado por CYP3A4 y CYP2B6, con posterior glucuronidación de metabolitos y excreción [176, 177]. No hay reportes de glucuronidación directa para NVP.

EFV y NVP presentan un comportamiento farmacocinético similar. Sus diferentes perfiles de solubilidad pH dependiente marcan diferencias a nivel de la absorción enteral. Este capítulo incluye el análisis realizado sobre datos resultantes de estudios de bioequivalencia llevados a cabo por el CEBIOBE, para medicamentos conteniendo EFV y medicamentos conteniendo NVP.

### **Estudio de bioequivalencia entre medicamentos conteniendo EFV**

14 voluntarios sanos, 6 hombres y 8 mujeres con pesos corporales medios de 90,7 y 63,9 kg respectivamente, completaron un estudio de

bioequivalencia promedio entre comprimidos conteniendo 600 mg de EFV. Se comparó un producto fabricado por un laboratorio nacional (Te), respecto al producto original Stocrin® (Re), propiedad del laboratorio Merck Sharp & Dohme. Una dosis única de 600 mg de cada producto fue administrada a cada voluntario, separadas por un período de lavado de 28 días. Para disminuir la variabilidad farmacocinética residual y la incidencia de efectos adversos se administró la dosis por la noche (21:00 horas) con 2 horas de ayuno. Por la noche el tono simpático se encuentra disminuido respecto a la mañana, provocando un menor gasto cardíaco y reduciendo la fracción de flujo sanguíneo destinada a zonas extra esplácnicas y renales. Estos cambios producirían una más lenta absorción de EFV por la noche, y una menor transferencia del fármaco hacia zonas extravasculares como el SNC donde provoca los principales efectos adversos [27]. La administración nocturna, además de perseguir el objetivo de reproducir la indicación posológica del fabricante (generalmente utilizada en la práctica clínica), intentó reducir  $C_{MAX}$  y reducir la variabilidad en la absorción, ya que las condiciones fisiológicas en la noche son más estables dado el reposo que llevan a cabo los voluntarios. El protocolo del ensayo clínico fue estudiado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química (UdelaR). Los voluntarios participantes cumplieron con los criterios de inclusión y firmaron un consentimiento informado. Se tomaron muestras de sangre hasta las 96 horas posdosis. Durante las primeras 24 horas, los voluntarios permanecieron internados en las instalaciones del CE BIOBE siguiendo un protocolo de alimentación estandarizado, para luego proseguir de modo ambulatorio.



**Figura 4.2.** Perfiles medios de EFV obtenidos para los productos Te y Re (600 mg) en 6 hombres y 8 mujeres hasta las 48 horas posdosis.

Las concentraciones de EFV en plasma fueron analizadas mediante HPLC-UV según una técnica desarrollada y validada por el Área Analítica del CEBIOBE. Los perfiles farmacocinéticos obtenidos en plasma sanguíneo para hombres y mujeres con ambos productos se muestran en la figura 4.2.

La tabla 4.1 resume los resultados del análisis farmacocinético aplicado para analizar la bioequivalencia entre los productos Te y Re. Dado que el  $AUC_T$  representó en promedio un 57% del  $AUC_\infty$ , ambos parámetros fueron incluidos. Mediante la tabla 4.2 se presentan las estimaciones realizadas para el resto de los parámetros farmacocinéticos.

	<b>Parámetro</b>	<b>Media Te<sup>a</sup></b>	<b>Media Re<sup>a</sup></b>	<b>Te/Re*</b>	<b>IC90%*</b>	<b>CV<sub>RES</sub>* (%)</b>
<b>TOTAL (N=14)</b>	AUC <sub>T</sub> (mg*h/L)	73,86	74,22	1,00	0,95-1,04	7,18
	AUC <sub>∞</sub> (mg*h/L)	134,3	143,6	0,94	0,85-1,03	14,0
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	3706	4154	0,89	0,74-1,07	27,6
	T <sub>MAX</sub> (h)	3,0	2,0	0,0	-1,0-1,0	2,0
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,02759	0,02912	0,95	0,77-1,16	31,2
<b>HOMBRES (N=6)</b>	AUC <sub>T</sub> (mg*h/L)	63,93	68,56	0,93	0,86-1,01	6,79
	AUC <sub>∞</sub> (mg*h/L)	117,1	123,1	0,95	0,85-1,06	9,03
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	3087	4141	0,75	0,57-0,98	22,3
	T <sub>MAX</sub> (h)	3,5	2,0	0,5	0,0-1,75	1,75
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,02637	0,03365	0,78	0,60-1,03	22,6
<b>MUJERES (N=8)</b>	AUC <sub>T</sub> (mg*h/L)	82,47	78,46	1,05	1,00-1,11	5,48
	AUC <sub>∞</sub> (mg*h/L)	150,9	159,7	0,94	0,79-1,13	19,0
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	4434	4156	1,07	0,84-1,36	25,2
	T <sub>MAX</sub> (h)	2,0	2,5	-0,5	-1,0-0,25	1,25
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,02945	0,02657	1,11	0,81-1,51	32,8

**Tabla 4.1.** Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo EFV realizado por el CEBIOBE. <sup>a</sup>Se informa la media geométrica de todos los parámetros excepto para T<sub>MAX</sub>, para el cual se informa la mediana.\*Para T<sub>MAX</sub> se informa como Te/Re la diferencia de medianas Te-Re, como IC90% el rango entre el 1er y 3er cuartil, y su amplitud como CV<sub>RES</sub>.

Si bien luego de administrados los productos Te y Re la cantidad de EFV absorbida resultó similar, no fue posible determinar bioequivalencia dado que el IC90% para C<sub>MAX</sub> quedó por fuera de la especificación. Tanto el

apartamiento del cociente  $T_e/R_e$  respecto a la unidad como la importante variabilidad residual mostrada por este parámetro condujeron a la situación de inconclusión. En el mismo sentido fue afectado  $C_{MAX}/AUC$ , demostrando que la diferencia entre marcas comerciales estuvo en la velocidad de ingreso del fármaco a la circulación sistémica.

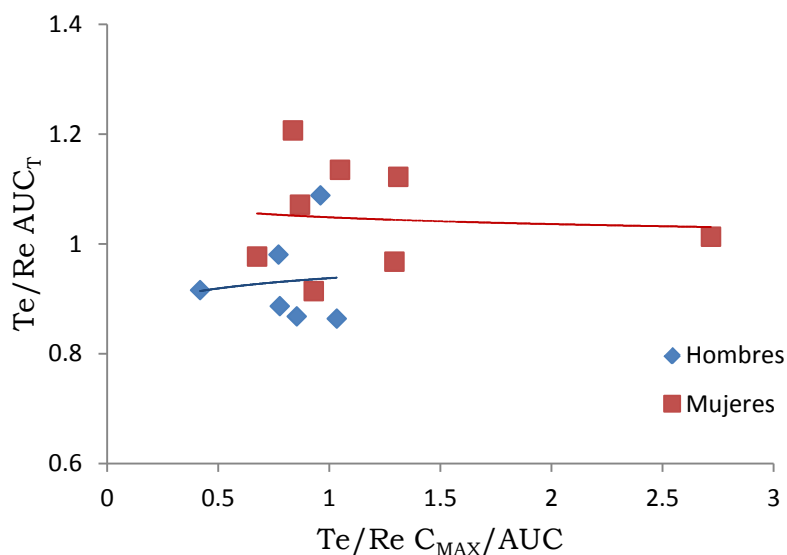
	$t_{1/2}$ (h)	CL/F (L/h/kg)	$V_D/F$ (L/kg)
Hombres (N=6)	81,7 (97,4%)	0,0761 (49,9%)	8,97 (59,2%)
Mujeres (N=8)	94,8 (51,9%)	0,0585 (44,0%)	8,00 (24,1%)
Total (N=14)	88,9 (71,1%)	0,0655 (28,9%)	8,40 (41,3%)

**Tabla 4.2.** Parámetros farmacocinéticos para EFV obtenidos tras análisis no compartimental de datos en 16 voluntarios sanos luego de una única dosis de 600 mg de productos Te y Re.

El análisis por sexo agrega información al respecto: la diferencia comentada se evidencia en voluntarios hombres, para los cuales el  $T_e/R_e$   $C_{MAX}$  fue significativamente menor a 1, el  $T_e/R_e$   $C_{MAX}/AUC$  fue de 0,78 y el  $T_{MAX}$  para el producto Te fue consistentemente mayor que para el Re. En mujeres las diferencias medias no se observaron, pero los cocientes  $T_e/R_e$  para  $C_{MAX}$  y  $C_{MAX}/AUC$  fueron mayores que 1, al contrario que lo observado en hombres. Las diferencias son evidentes en los perfiles farmacocinéticos medios obtenidos para EFV en hombres tras administrar una u otra marca comercial (figura 4.2). Los perfiles medios para mujeres muestran un rendimiento similar entre marcas comerciales, con un ingreso apenas más rápido para el producto Te. Nótese que si el estudio fuera repetido con 16 voluntarias mujeres, es probable que se arribe a la conclusión de bioequivalencia para estos productos.

Para EFV, la velocidad de ingreso tiene poco impacto en la cantidad absorbida. La figura 4.3 muestra la relación entre cocientes  $T_e/R_e$  de  $C_{MAX}/AUC$  y AUC, para la cual no se observa una correlación. A pesar de ser un fármaco de baja solubilidad y mostrar un ingreso relativamente lento, especialmente para hombres al recibir Te, EFV es absorbido en una amplia región del tracto intestinal. Al no ser sustrato de transportadores de eflujo, la cantidad de EFV disuelta a lo largo del intestino es suficiente para alcanzar condiciones de saturación del metabolismo presistémico (CYP2B6 se expresa tanto en hígado como en intestino [178]), aún para una baja velocidad de disolución. El aumento de biodisponibilidad al administrar EFV

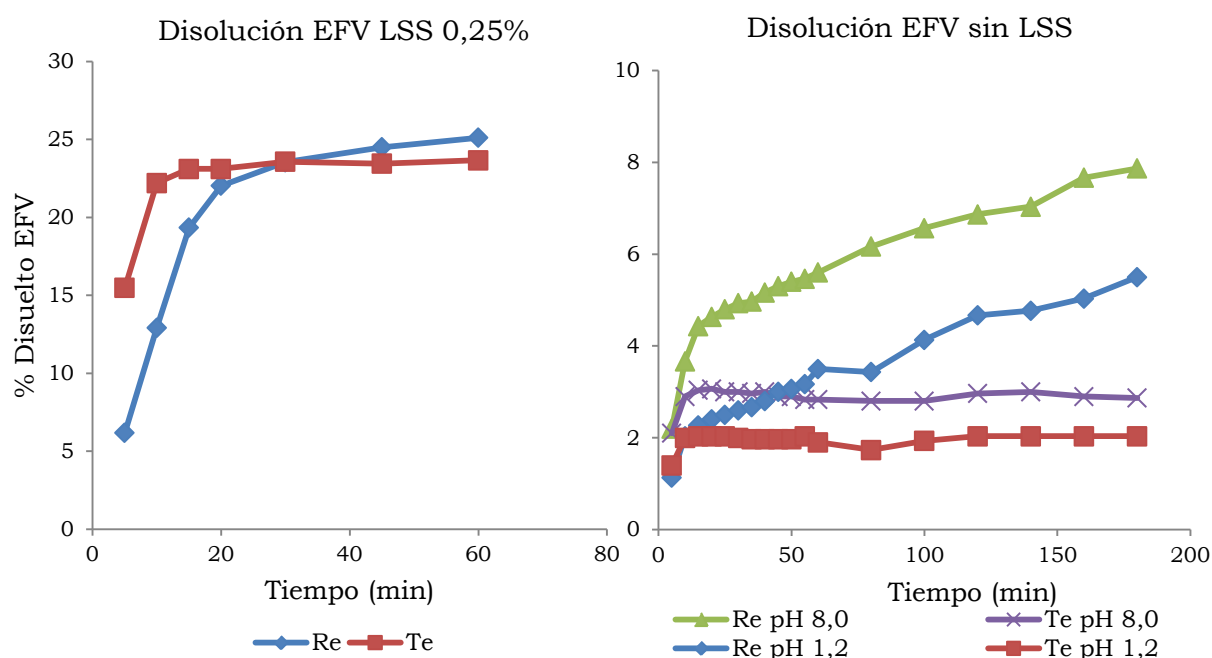
con comidas se debe a una mayor disolución del fármaco gracias a la presencia de tensoactivos, e indica que probablemente en condiciones de ayuno una fracción de la dosis atraviesa el tracto gastrointestinal sin llegar a absorberse. Esto no se observa como una interrupción de la absorción ya que sucede en zonas muy distales del intestino, a tiempos alejados de  $T_{MAX}$ .



**Figura 4.3.** Relación entre cocientes  $Te/Re AUC_T$  y  $C_{MAX}/AUC$  en 6 hombres y 8 mujeres.

Los diferentes rendimientos entre marcas comerciales se evidenciaron en voluntarios hombres probablemente debido a una diferente liberación y disolución de EFV en condiciones gastrointestinales. La farmacopea de Estados Unidos (USP) indica que el ensayo de disolución de comprimidos de EFV como control de calidad fisicoquímico debe realizarse en 1 L de laurilsulfato de sodio (LSS) al 2% con aparato II (paletas) a 50 rpm, exigiendo un porcentaje de EFV disuelto mayor a 80% de la dosis declarada en 30 minutos [179]. Panikumar *et al.* [164] realizaron ensayos de disolución de tres marcas comerciales de EFV en distintos medios de disolución. Bajo los medios propuestos por farmacopeas encontraron que se lograba una rápida y completa disolución de EFV sin discriminación alguna entre marcas comerciales, proponiendo entonces como medio biorrelevante LSS al 0,25% en fluido gástrico simulado (FGS), a pesar de que la solubilidad de EFV no cambiaba utilizando FGS o agua. En el CE BIOBE, se llevó a cabo un ensayo de disolución de los productos Te y Re (6 unidades de cada uno) en 900 mL de agua con LSS al 0,25% termostaticado a 37°C, con agitación por paletas a 75 rpm. Como muestra la figura 4.4 se observó una más rápida disolución para el producto Te. Se realizó otro ensayo de disolución quitando el LSS y ajustando el pH a 8,0 como únicos cambios. En este medio, si bien los porcentajes de EFV disueltos son bajos debido a su baja solubilidad, los perfiles acompañan a la absorción de fármaco observada en

voluntarios masculinos luego de la administración oral. La formulación del producto Re permite disolver hasta casi 3 veces más EFV que a la formulación de Te en 3 horas bajo una cinética de orden cero. Los perfiles medios de disolución incluidos en la figura 4.4 muestran claramente que el producto Re presenta en su formulación un excipiente que favorece la solubilización de EFV cuando el medio no presenta tensoactivos. Para el producto Te, el porcentaje de EFV disuelto permanece constante, igual a la concentración de saturación. Al incluir LSS las diferencias parecerían anularse (el ensayo en dicho medio se realizó hasta los 80 minutos). Si bien ambos productos se desintegran rápidamente, se observó para el Te una ventaja en este sentido bajo todos los medios ensayados, factor que explicaría la mayor velocidad de disolución observada en agua con LSS al 0,25%.



**Figura 4.4.** Perfiles de disolución de comprimidos de EFV en 900 mL de diferentes medios, a 37°C con agitación por paletas a 75 rpm.

¿Cómo explican estos resultados el ingreso de EFV *in vivo*? La rápida desintegración que presentan los productos en el estómago permite que la formulación sea reducida a pequeños fragmentos capaces de pasar a través del píloro hacia el duodeno, al tiempo que el fármaco es lentamente disuelto en los fluidos gastrointestinales. Ya en el intestino, debido a la alta permeabilidad que presenta EFV a través del epitelio intestinal, la dosis disuelta es rápidamente absorbida, impidiendo la saturación del fluido (condiciones *sink*) y por tanto la pérdida de biodisponibilidad. El fármaco es disuelto a lo largo del intestino, aprovechando una amplia ventana de absorción. Bajo estas condiciones, como se observó en el ensayo *in vitro*, el producto Re logra entregar al fármaco más rápido. En mujeres, la situación



es más parecida al ensayo en medio LSS 0,25%: el producto Te logra menor  $T_{MAX}$  y mayor  $C_{MAX}$  y  $C_{MAX}/AUC$ . Debe considerarse que la dosis fue administrada 2 horas después de una cena. Las condiciones gastrointestinales de hombres y mujeres en ese momento pueden haber sido lo suficientemente diferentes como para ofrecer diferentes entornos a la disolución de los productos. Mientras hombres presentaron condiciones parecidas al ayuno, en mujeres la presencia de tensoactivos y un más lento vaciado gástrico ofrecieron condiciones similares a una administración post-ingesta de comidas que ocultó el diferente rendimiento entre productos. A favor de esta hipótesis, el  $AUC \cdot kg$  estimado en mujeres fue un 30% mayor respecto a hombres, diferencia no significativa debido a la alta variabilidad interindividual.

Respecto a la disposición de EFV, no se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres. La única diferencia significativa asociada al sexo estuvo en una mayor variabilidad para  $V_D/F/kg$  estimada en hombres ( $p < 0,005$ ).

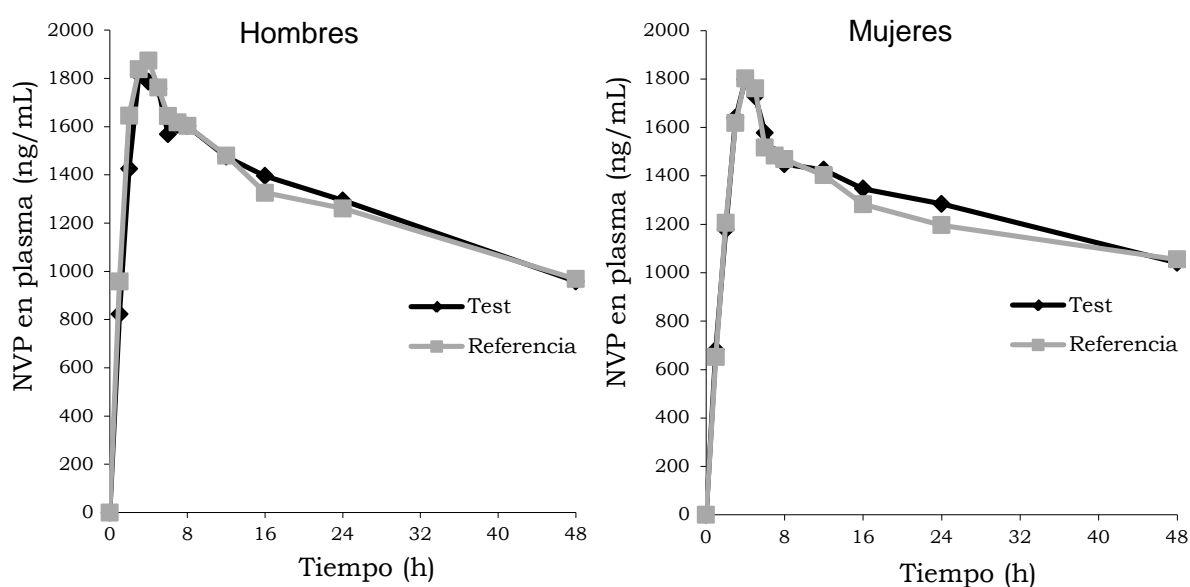
Las diferencias en velocidad de ingreso para EFV halladas en hombres, evidentes por las menores  $C_{MAX}$  resultantes para el producto Te, se reflejaron en una menor incidencia de efectos adversos. A pesar de que no se registraron efectos adversos severos, tras la administración del producto Re todos los voluntarios presentaron somnolencia en las primeras 4 horas posdosis (efecto adverso moderado), exceptuando un voluntario de sexo femenino que presentó la más baja  $C_{MAX}$  registrada en el estudio. Tras la administración del producto Te, mientras dicho efecto adverso se presentó en todos los voluntarios del sexo femenino, sólo apareció en la mitad de los sujetos hombres. Estos resultados muestran que un producto que libere EFV de modo más lento podría presentar una ventaja en la terapéutica al disminuir la incidencia de efectos adversos durante las primeras semanas de tratamiento, determinantes en la adherencia de los pacientes. La publicación de nuestro grupo de investigación [180] incluye un análisis más profundo al respecto.

### **Estudio de bioequivalencia entre medicamentos conteniendo NVP**

El CE BIOBE llevó a cabo un estudio de bioequivalencia promedio entre comprimidos conteniendo 200 mg de NVP. Un producto fabricado por un laboratorio nacional ( $T_n$ ) fue comparado con el producto original, Viramune® ( $R_n$ ), comercializado por el laboratorio Boehringer Ingelheim. Participaron 16 voluntarios, 6 hombres y 10 mujeres (pesos corporales medios: 81,0 y 71,7 kg respectivamente), los cuales recibieron un comprimido de cada producto separados por 28 días.

La administración se realizó 15 minutos después de la ingesta de un desayuno de moderado contenido graso. Luego los voluntarios permanecieron internados por un período de 24 horas en el cual siguieron un protocolo de alimentación estandarizado, para finalmente proseguir de modo ambulatorio hasta las 96 horas posdosis, tiempo en el que fue tomada la última muestra de sangre. Todos los sujetos participantes del estudio recibieron y firmaron un consentimiento informado, explicativo del protocolo que fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Química (UdelaR).

La figura 4.5 muestra los perfiles medios obtenidos para Tn y Rn en hombres y mujeres. No se registraron eventos adversos relacionables a NVP en ningún voluntario.



**Figura 4.5.** Perfiles medios de NVP obtenidos para los productos Tn y Rn (200 mg) en 6 hombres y 10 mujeres hasta las 48 horas posdosis.

Los resultados del análisis de bioequivalencia y las estimaciones para parámetros de disposición de NVP en hombres y mujeres son presentados en las tablas 4.3 y 4.4 respectivamente. Tanto para  $C_{MAX}$  como para los parámetros de AUC, el cociente Tn/Rn es cercano a 1 con IC90% comprendido dentro de la especificación de bioequivalencia para el total de voluntarios sanos. La variabilidad residual para todos los parámetros fue baja. No se observaron diferencias significativas para  $T_{MAX}$  entre productos. Estos resultados fueron verificados en ambos sexos por separado, comprobando que los productos Tn y Rn son bioequivalentes.

Al igual que para EFV, el cociente Tn/Rn AUC no mostró correlación significativa con el cociente Tn/Rn  $C_{MAX}/AUC$  (figura 4.6). NVP tampoco es sustrato de transportadores de eflujo, por lo tanto la zona de efectiva absorción en el tracto intestinal es también muy amplia, no hay

metabolismo presistémico significativo y por tanto la velocidad de ingreso no afecta la cantidad total absorbida. La disolución del fármaco en este caso estuvo favorecida por la presencia de alimentos en estómago gracias al enlentecimiento del vaciado gástrico, prolongando el tiempo de residencia de la dosis en un fluido con pH más favorable para la solubilización de NVP.

	<b>Parámetro</b>	<b>Media Tn<sup>a</sup></b>	<b>Media Rn<sup>a</sup></b>	<b>Tn/Rn*</b>	<b>IC90%*</b>	<b>CV<sub>RES</sub>* (%)</b>
<b>TOTAL (N=16)</b>	AUC <sub>T</sub> (mg*h/L)	96,41	95,59	1,01	0,98-1,04	5,18
	AUC <sub>∞</sub> (mg*h/L)	152,8	152,8	1,00	0,94-1,07	10,3
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	1798	1875	0,96	0,91-1,01	8,93
	T <sub>MAX</sub> (h)	4,0	4,0	0,5	-0,25-1,25	1,50
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,01176	0,01211	0,97	0,90-1,04	11,5
<b>HOMBRES (N=6)</b>	AUC <sub>T</sub> (mg*h/L)	94,14	93,28	1,01	0,94-1,09	5,94
	AUC <sub>∞</sub> (mg*h/L)	140,7	135,7	1,04	0,96-1,12	6,55
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	1812	1904	0,95	0,90-1,00	4,28
	T <sub>MAX</sub> (h)	3,5	2,0	1,5	-0,5-2,0	2,5
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,01292	0,01398	0,92	0,86-1,03	8,66
<b>MUJERES (N=10)</b>	AUC <sub>T</sub> (mg*h/L)	97,80	96,98	1,01	0,97-1,05	5,26
	AUC <sub>∞</sub> (mg*h/L)	160,6	163,5	0,98	0,89-1,09	12,2
	C <sub>MAX</sub> (ng/mL)	1789	1858	0,96	0,88-1,06	11,4
	T <sub>MAX</sub> (h)	4,0	4,0	0,0	0,0-1,0	1,0
	C <sub>MAX</sub> /AUC (h <sup>-1</sup> )	0,01111	0,01114	1,00	0,89-1,11	13,3

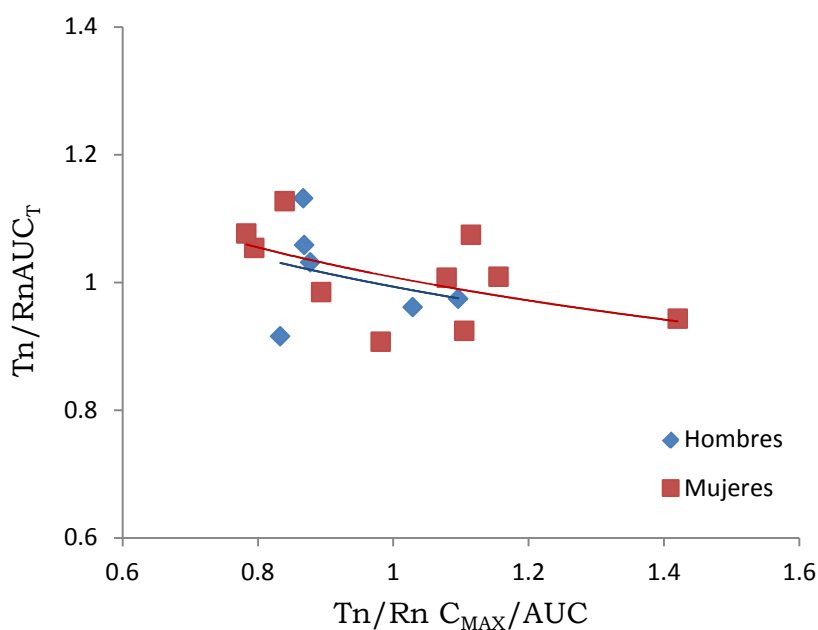
**Tabla 4.3.** Resumen de resultados de bioequivalencia entre comprimidos conteniendo NVP realizado por el CEBIOBE. <sup>a</sup>Se informa la media geométrica de todos los parámetros excepto para T<sub>MAX</sub>, para el cual se informa la mediana.\*Para T<sub>MAX</sub> se informa como Tn/Rn la diferencia de medianas Tn-Rn, como IC90% el rango entre el 1er y 3er cuartil, y su amplitud como CV<sub>RES</sub>.

La mayor solubilidad de NVP en medio ácido y la diferente entrega del contenido gástrico en hombres y mujeres dan lugar a una distinta velocidad de absorción para los sexos: la C<sub>MAX</sub> de NVP corregida por peso fue significativamente mayor para hombres, con una diferencia de 15% (p<0,01); C<sub>MAX</sub>/AUC fue 21% mayor en hombres, sin llegar a mostrar significancia estadística. Tanto un menor pH como un menor tiempo de residencia en estómago para hombres pueden ser causantes de esta diferencia. Incluso en hombres se logran diferenciar los productos (C<sub>MAX</sub> Rn > C<sub>MAX</sub> Tn), a pesar del

bajo número de sujetos. El producto Rn tendría entonces una mayor velocidad de disolución, diferencia que no se evidencia en mujeres. Esta diferente exposición máxima a NVP probablemente no tenga consecuencias a la hora de utilizar uno u otro producto en un tratamiento donde la actividad enzimática se encuentre inducida y los perfiles presenten menores  $C_{MAX}$ .

	$t_{1/2}$ (h)	CL/F (L/h/kg)	$V_D/F$ (L/kg)
Hombres (N=6)	56,6 (30,0%)	0,0181 (20,7%)	1,48 (11,4%)
Mujeres (N=10)	70,7 (37,2%)	0,0174 (34,8%)	1,78 (8,50%)
Total (N=16)	65,1 (36,0%)	0,0177 (29,8%)	1,66 (13,2%)

**Tabla 4.4.** Parámetros farmacocinéticos para NVP obtenidos tras análisis no compartimental de datos en 16 voluntarios sanos luego de una única dosis de 200 mg de productos Tn y Rn.



**Figura 4.6.** Relación entre cocientes Tn/Rn  $AUC_T$  y  $C_{MAX}/AUC$  en 6 hombres y 10 mujeres.

Por último, mujeres presentaron mayor variabilidad en la exposición a NVP, según se evidenció para las varianzas de CL/F/kg ( $p < 0,0001$ ).

## Conclusiones

Tanto EFV como NVP, al no ser sustratos de transportadores de eflujo, presentan en su disolución en fluidos gastrointestinales la única limitante

para la absorción oral tras una dosis única. En estado estacionario el metabolismo de primer paso podría ser limitante para EFV debido a la inducción enzimática y a su baja solubilidad. En este estudio se observó que la velocidad de disolución y el pasaje desde el estómago al duodeno regulan la velocidad de ingreso de ambos fármacos al organismo, sin impacto sobre la fracción de dosis finalmente absorbida. La administración de comidas previo a la dosis disminuye la variabilidad en la velocidad de absorción, como se observó para NVP. Al prolongar el tiempo de residencia de la formulación en el estómago y disminuir la velocidad de vaciado gástrico produce que la absorción sea más reproducible tanto entre individuos como entre ocasiones para un mismo individuo.

La absorción de EFV a la circulación sistémica mostró correlación con ensayos *in vitro* realizados en condiciones muy diferentes a las recomendadas por USP. El ensayo de disolución sin tensoactivos reflejó las condiciones gastrointestinales de hombres, mientras que al agregar 0,25% de LSS los perfiles de disolución correlacionaron con la absorción observada en mujeres dos horas después de ingerir alimentos. Las diferencias gastrointestinales hombre-mujer se hicieron evidentes en las condiciones del estudio de bioequivalencia.

El rápido ingreso de EFV a la circulación sistémica estuvo asociado a la aparición de efectos adversos. Para el producto Te, que tuvo menor velocidad de absorción en hombres, la incidencia fue menor.

La mayor velocidad de absorción estimada para NVP en hombres refleja diferencias fisiológicas respecto a las mujeres: tanto el menor pH del contenido estomacal como el más rápido vaciamiento gástrico pueden estar influyendo.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas asociadas al sexo en la disposición de EFV y NVP. Contrario a los reportes que indican una mayor actividad de CYP2B6 y CYP3A4 en mujeres, para ambos fármacos existió una tendencia hacia una mayor semivida en las voluntarias participantes del estudio. Quizás el amplio volumen de distribución y la baja extracción hepática que presentan tanto EFV como NVP sean las razones para que dichas diferencias no hayan sido observadas.

## **CAPITULO 5. Recirculación de nevirapina: farmacocinética poblacional mediante modelos no lineales de efectos mixtos**

---

La investigación presentada en el presente capítulo dio lugar a la publicación del artículo científico N° IV.

### **Introducción: modelos no lineales de efectos mixtos aplicados al análisis farmacocinético poblacional**

Durante la primer parte de la presente tesis se realizó un análisis farmacocinético poblacional utilizando modelos lineales de efectos mixtos (ANOVA) y el método en dos etapas (TS), principalmente para evaluar los parámetros farmacocinéticos de cada principio activo.

El método TS consiste en una primera etapa durante la cual se estiman parámetros individuales voluntario a voluntario, ya sea mediante un análisis no compartimental o asumiendo determinado modelo farmacocinético. En una segunda etapa, los efectos fijos son estimados combinando los valores individuales (a través de la media o mediana según la distribución correspondiente) y los efectos aleatorios (variabilidad interindividual) mediante la estimación de dispersión de datos (típicamente mediante la varianza-covarianza). Este método tiene como grandes ventajas su simplicidad y su rápida aplicación, y es probablemente uno de los métodos más aplicados para analizar datos. Sin embargo tiene algunas limitaciones que pueden tener mayor o menor impacto según los datos disponibles y los objetivos del análisis.

Supongamos que se pretenden estimar parámetros farmacocinéticos para un principio activo aplicando un modelo farmacocinético determinado por una cantidad de parámetros igual a  $P$ , utilizando datos de una población de sujetos con una cantidad de muestras plasmáticas igual a  $n_i$ , que puede diferir entre sujetos. Para cada sujeto por separado se estiman efectos fijos  $\theta_p$  y efectos aleatorios  $\omega_p^2$ . Un conjunto de sujetos pueden presentar un número de datos insuficiente: a medida que  $n_i$  se acerca a  $P$  la estimación de parámetros se hace más rígida en el sentido de que no será posible elegir con qué datos se quiere estimar cada parámetro, y cuando  $n_i$  es menor que  $P$  ya no será posible aplicar el modelo farmacocinético seleccionado para obtener los parámetros individuales, por lo que se deberá descartar dicha información. Adicionalmente, los datos obtenidos en cada sujeto pueden diferir significativamente en cuanto a calidad informativa de los procesos farmacocinéticos. Es evidente que el error residual en el ajuste del modelo ( $\varepsilon_{il}$ ) será diferente sujeto a sujeto, y que también el error en la estimación de cada parámetro  $P$  puede diferir sujeto a sujeto. Al combinar los parámetros

obtenidos en cada sujeto  $\theta_{pi}$  para estimar  $\theta_p$ , el error en la estimación de cada parámetro es descartado. Parámetros estimados con cierta imprecisión son tratados en la segunda etapa como si fueran variables medidas de forma exacta, lo cual puede sesgar la estimación de  $\theta_p$ . La variabilidad interindividual  $\omega_p^2$  determinada en la segunda etapa presentara una sobreestimación, ya que a menos que la variabilidad interindividual y la variabilidad en el error de estimación del parámetro posean correlación negativa,  $\omega_p^2$  tendrá como mínimo valor a la suma de varianzas de cada fuente. Distintos autores han reportado las desventajas del método TS, a la vez que existen varias modificaciones destinadas a corregir estas limitaciones [181–185]. Debe considerarse que cuando los datos farmacocinéticos son obtenidos a partir de un ensayo clínico protocolizado, en donde las fuentes de variabilidad están minimizadas, la cantidad de muestras es igual por voluntario y es obtenida en función de los parámetros a estimar, las desventajas del método TS son considerablemente reducidas. La mayor limitación se encuentra al analizar datos provenientes de pacientes ambulatorios, donde la variabilidad farmacocinética es mucho mayor y la cantidad de datos es limitada.

A principio de la década de 1980, Lewis Sheiner y Stuart Beal introdujeron la utilización de modelos no lineales mixtos (NLME) al análisis farmacocinético poblacional, creando el software NONMEM (*Nonlinear mixed effects model*) [186]. A lo largo de los años esta metodología se ha establecido como estándar a nivel mundial, formando la base de la farmacometría (farmacología cuantitativa), aplicada en el desarrollo de fármacos, farmacocinética clínica, análisis de progresión de enfermedades, diseño de ensayos clínicos, etc. Si bien no es el objetivo de la presente tesis ahondar en los fundamentos de esta metodología, ha sido utilizada como herramienta en el análisis farmacocinético contenido en los siguientes capítulos por lo que se resumirá brevemente. Para mayor información referirse a Bonate P.[187, 188], Ette *et al.*[4, 189, 190] y Pillai *et al.*[191, 192].

El enfoque de los NLME se basa en que la respuesta PK-PD que presenta un individuo a un fármaco está determinada por un conjunto de parámetros que presentan una cierta distribución en la población. Existe una respuesta PK-PD poblacional determinada por la interacción medicamento-organismo y por el efecto de determinadas covariables, la cual podemos explicar en base a modelos estructurales (determinados por los efectos fijos) y estocásticos (efectos aleatorios). Tanto la tendencia media como los diferentes niveles de variabilidad de dicha respuesta son cuantificables analizando al conjunto de sujetos como una unidad. El análisis se realiza entonces en una única etapa, combinando los datos disponibles de todos los sujetos, estimando efectos fijos y efectos aleatorios de manera simultánea.

La principal ventaja respecto al método TS es que al combinar los set de datos de diferentes sujetos, la calidad informativa aumenta significativamente. Por ejemplo, aquellos sujetos con mayor información respecto a la absorción tendrán más influencia en la estimación de los parámetros que expliquen dicho proceso, lo mismo pasará con datos de sujetos que contengan observaciones de mayor calidad para estimar parámetros de eliminación. Ningún dato es descartado: sujetos para los cuales fueron tomadas pocas muestras pueden ser incluidos en el análisis, que permitirá obtener parámetros poblacionales con menor sesgo respecto al TS y estimar parámetros individuales aún con pocas observaciones.

Otra ventaja es que al no sobreestimar la variabilidad interindividual, el método posee mayor potencia en la identificación de covariables significativas.

El modelo farmacocinético poblacional se compone de un modelo estructural y un modelo estocástico de estructura jerárquica (variabilidad interindividual – variabilidad residual). Básicamente está dado por las siguientes ecuaciones:

$$y_{ij} = f(\theta_{ip}, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\theta_{ip} = g(\theta_p, x_i) + \eta_{ip} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $y_{ij}$  es la observación para el sujeto  $i$  a tiempo  $j$ ,  $f(\theta_{ip}, x_{ij})$  es una función que describe el valor esperado de la observación de acuerdo a ciertos parámetros farmacocinéticos individuales  $\theta_{ip}$  (CL,  $V_D$ ,  $k_A$ , etc.) y covariables  $x_{ij}$  ( $i$ : sexo, edad, etc.;  $j$ : hora de administración, dosis), y  $\varepsilon_{ij}$  es la variabilidad residual entre la respuesta observada y la estimación tal que:

$$\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2 v(\theta_i, x_{ij}, \xi)) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Siendo  $\sigma^2$  una constante y  $v(\theta_{ip}, x_{ij})$  un modelo que relaciona dicho valor con parámetros farmacocinéticos, covariables y otros factores  $\xi$  que únicamente estén presentes en la varianza residual (por ejemplo un factor relacionado al método analítico, cuando se analiza de modo conjunto datos provenientes de distintos laboratorios). A su vez, cada  $\theta_{ip}$  se relaciona con el valor poblacional  $\theta_p$  y un conjunto de covariables  $x_i$  (edad, peso, sexo, etc.) mediante cierto modelo  $g$  (Ecuación 2). El apartamiento entre  $g(\theta_p, x_i)$  y  $\theta_{ip}$  corresponde a la variabilidad interindividual no explicada por el modelo:

$$\eta_{ip} \sim N(0, \omega_p^2) \quad (\text{Ecuación 4})$$

El modelo estructural está representado por  $f(\theta_{ip}, x_{ij})$  y  $g(\theta_p, x_i)$ , mientras que  $\varepsilon_{ij}$  y  $\eta_{ip}$  forman parte del modelo estocástico.



Los parámetros poblacionales ( $\theta_p, \omega_p^2, \sigma^2$ ) son cuantificados como estimadores de máxima verosimilitud (MLE), analizando la probabilidad de los datos condicional al modelo estructural-estocástico establecido. Siendo  $L_i(Y_i|x_i, \theta_p, C_i)$  la verosimilitud para un set  $Y$  de datos del individuo  $i$  dados los parámetros poblacionales  $\theta_p$  del modelo, las covariables  $x_i$  y la matriz individual de varianza-covarianza  $C_i$ , para encontrar los estimadores de máxima verosimilitud en dicho individuo el software minimiza una función objetivo (OFV<sub>i</sub>) igual a  $-2\log[L_i(Y_i|x_i, \theta, C_i)]$ . La sumatoria de las OFV<sub>i</sub> obtenidas en el conjunto de individuos es igual a la función objetivo poblacional (OFV), aproximable a una distribución chi cuadrado ( $X^2$ ). La función de verosimilitud poblacional puede ser aproximada en NONMEM por diferentes métodos de estimación, separables en paramétricos y no paramétricos, según se asuma o no una cierta distribución para los efectos aleatorios. Dentro de los métodos paramétricos aplicados a NLME, el más utilizado, y aplicado para los análisis contenidos en la presente tesis es la estimación condicional de primer orden (FOCE). Las suposiciones asociadas a la aplicación de estos métodos fueron mencionadas en el Capítulo 1: independencia de errores residuales (observación-predicción), distribución normal de errores residuales con varianza  $\sigma^2$ , independencia de desvíos interindividuales ( $\eta_i$ ) y distribución normal de los mismos con varianza  $\omega^2$ . Bajo la utilización del método FOCE, los residuales ponderados obtenidos son denominados CWRES (residuales condicionales ponderados).

Los parámetros individuales son obtenidos mediante estimación bayesiana máxima a posteriori (MAP), se utilizan en la búsqueda de covariables durante el desarrollo del modelo y en la individualización de dosis cuando se aplica un modelo validado.

Además de la OFV, se utilizan diferentes herramientas para diagnosticar la bondad del ajuste y la validez del modelo durante el desarrollo del mismo. Para los análisis contenidos en este trabajo se aplicaron las siguientes:

- Herramientas gráficas:
  - CWRES *vs.* variable independiente (tiempo).
  - CWRES *vs.* predicciones poblacionales del modelo.
  - Predicciones individuales *vs.* observaciones.
  - Predicciones poblacionales *vs.* observaciones.
  - Histogramas para CWRES y para  $\eta_i$ .
  - Predicciones individuales y observaciones *vs.* tiempo.
  - VPC (*visual predictive check*). Se simulan perfiles farmacocinéticos en base al modelo obtenido y se compara gráficamente la distribución de predicciones con la distribución

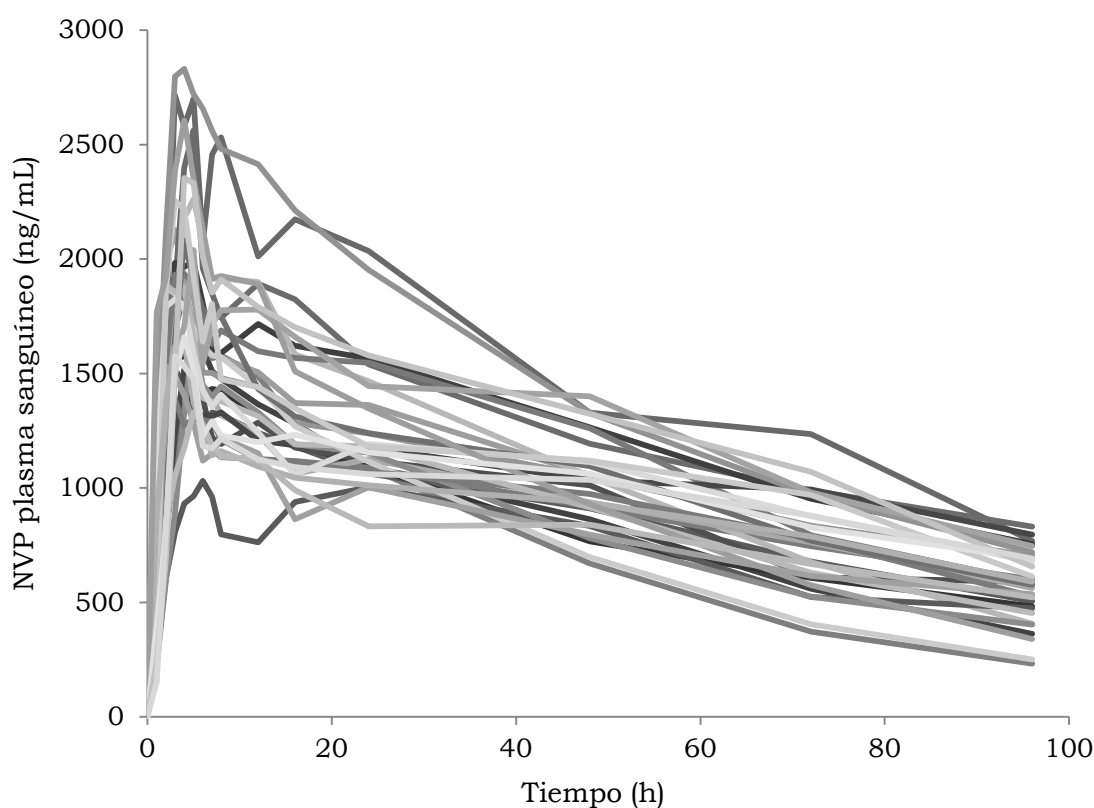
de observaciones permitiendo comparar tanto efectos fijos como aleatorios.

- Herramientas numéricas:
  - LRT (*likelihood ratio test*). Para comparar dos modelos anidados A y B, donde el modelo B se obtiene añadiendo parámetros al modelo A, la diferencia obtenida en OFV ( $\Delta\text{OFV}=\text{OFV}_A-\text{OFV}_B$ ) se considera significativa si es mayor al valor crítico obtenido para la distribución  $X^2$  con grados de libertad igual a  $p_B-p_A$ , siendo  $p$  el número de parámetros presente en cada modelo.
  - AIC (*Akaike information criteria*). Para comparar modelos no anidados con diferente número de parámetros,  $\text{AIC}=\text{OFV}+2*p$ . Se elige el modelo con menor valor de AIC. Este criterio penaliza al modelo por el número de parámetros.
  - Precisión de parámetros: NONMEM calcula el error estándar en la estimación de cada parámetro al aplicar un cierto modelo a un conjunto de datos, para obtener un IC95% para el valor poblacional esperado. Alternativamente se utiliza el *Bootstrap* no paramétrico [193], método bajo el cual los  $N$  sujetos que componen la muestra son muestreados repetidamente con reposición, creando  $M$  muestras de  $N$  sujetos. El modelo obtenido es ajustado a cada muestra por separado, obteniendo  $M$  estimaciones de cada parámetro. El IC95% no paramétrico para cada parámetro se obtiene con los cuantiles 0,025 y 0,975 de la distribución de estimaciones en las  $M$  muestras. El número de muestras depende de la complejidad del modelo, como mínimo se deben utilizar 100.
  - ETABAR: se realiza un test de hipótesis evaluando si el valor medio de los estimadores individuales bayesianos de un parámetro difiere significativamente de cero. Un resultado significativo es considerado como indicador de una mal especificación en el modelo.
  - *Shrinkage*[194]: la estimación de parámetros a posteriori puede presentar ciertos desvíos de acuerdo a la naturaleza de los datos. Cuando la variabilidad interindividual es mucho mayor a la variabilidad residual, la estimación estará fuertemente influenciada por los datos individuales, aun cuando estos sean insuficientes o poco informativos. Este fenómeno se conoce como  $\varepsilon$ -*shrinkage*. En el caso opuesto, la estimación estará condicionada por la distribución prior, y los parámetros individuales se “pegaran” al valor poblacional, causando  $\eta$ -*shrinkage*. Ambos parámetros son cuantificados como

porcentajes y deben ser tenidos en cuenta al interpretar los resultados de un modelo.

### **Análisis farmacocinético poblacional de NVP incluyendo descripción de múltiples picos.**

Los perfiles individuales de concentraciones plasmáticas de nevirapina (NVP) obtenidos tras el estudio de bioequivalencia presentado en el Capítulo 4 mostraron múltiples picos de concentración a tiempos posteriores que  $T_{MAX}$ . La figura 5.1 muestra un gráfico de espaguetis con las concentraciones observadas en los 16 voluntarios tras la administración de 200 mg de cada marca comercial.



**Figura 5.1.** Gráfico de espaguetis mostrando las concentraciones plasmáticas de NVP observadas en 16 voluntarios (10 mujeres, 6 hombres) tras una dosis única de 200 mg, administrada en 2 ocasiones (una por producto) con un período de lavado de 28 días.

El aumento de concentraciones plasmáticas de NVP tras administración oral a tiempos posdosis alejados del período de absorción ha sido observado previamente para NVP por otros investigadores en ensayos clínicos [170, 195, 196]. Lamson *et al.* observaron incluso aumento en las concentraciones plasmáticas horas después de la administración intravenosa bolo de NVP [169]. Pese a no obtener evidencias concluyentes, la mayoría de los autores relacionaron el fenómeno a recirculación enterohepática del fármaco, es

decir, excreción hepatobiliar con acumulación de NVP en vesícula biliar y reabsorción del fármaco posterior al vertido de bilis en la luz del duodeno.

Si bien varios modelos farmacocinéticos poblacionales de NVP han sido publicados [196–201], ninguno de ellos incluye el mecanismo de reabsorción (o recirculación) dentro del modelo estructural, en muchos casos debido a que no se contaba con los datos necesarios. La descripción farmacocinética de este proceso es importante para entender la disposición del fármaco. La recirculación provoca principalmente un aumento en la semivida de eliminación, un modelo que desprece este mecanismo conducirá a una subestimación del valor de CL total, de mayor o menor impacto dependiendo de la fracción de fármaco biodisponible sometida al proceso. Mejorar la estimación de parámetros farmacocinéticos puede aumentar la potencia en la descripción de covariables significativas. Sin embargo, probablemente no sea este el impacto de mayor importancia. El frecuente ingreso de un principio activo a la circulación sistémica afecta la relación entre su concentración plasmática y su concentración en espacios extravasculares [202, 203]. Si se analizan las concentraciones arteriales (A) y venosas (V) de un fármaco mediante el cociente A/V, mientras el fármaco ingresa al organismo se obtiene un  $A/V > 1$ . Este cociente va disminuyendo a medida que la cantidad de fármaco en el sitio de absorción disminuye, tendiendo asintóticamente a un valor  $A/V < 1$  [204]. Frecuentes reingresos de fármaco afectarán al cociente A/V aumentando la concentración arterial. Para moléculas de rápida distribución desde la sangre a tejidos y fluidos extravasculares irrigados por sangre arterial, la recirculación generará picos de concentración en dichos espacios, lo cual puede ser relacionado con determinadas respuestas farmacodinámicas. Por último, entender los mecanismos de disposición permite explicar interacciones farmacocinéticas, como las observadas para fármacos vinculados a recirculación enterohepática.

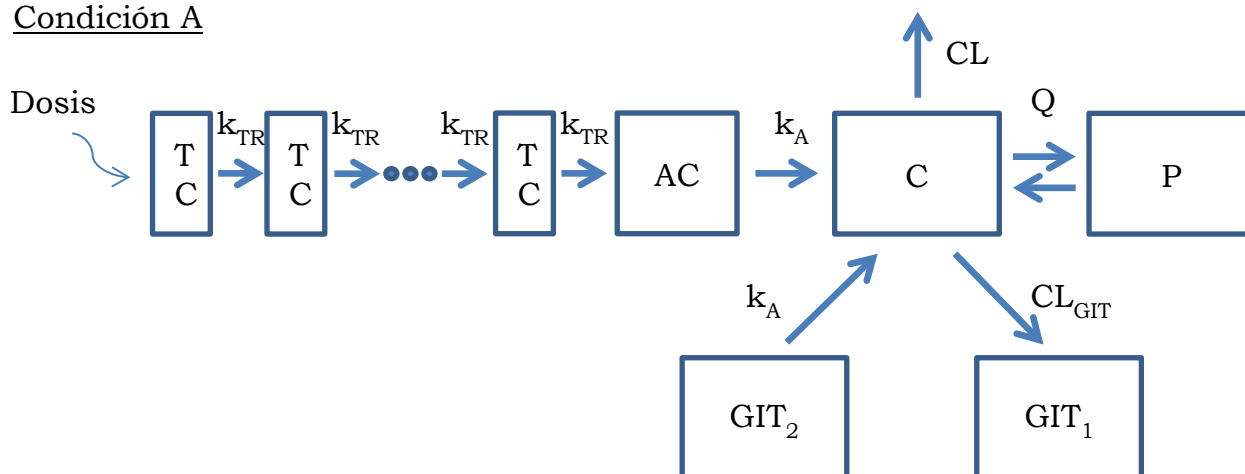
El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar, a partir de los datos disponibles para NVP, un modelo farmacocinético que permitiera la descripción de su reingreso a la circulación sistémica y la cuantificación de parámetros vinculados al proceso, de un modo coherente con los mecanismos fisiológicos que provocan la recirculación. Ya que los sujetos presentan distinta información farmacocinética respecto a este proceso, el análisis combinado mediante NLME aumenta la potencia en su descripción.

Para realizar el análisis se utilizó el software NONMEM® 7.3.0 (ICON Development Solutions, Hanover, MD, Estados Unidos). El desarrollo del modelo fue conducido con las herramientas de *Pearl-Speaks-NONMEM* (PsN) 3.6.2 [205], y Xpose (paquete gráfico escrito en lenguaje R) [206], utilizando la interfaz Pirana 2.7.1 [207].

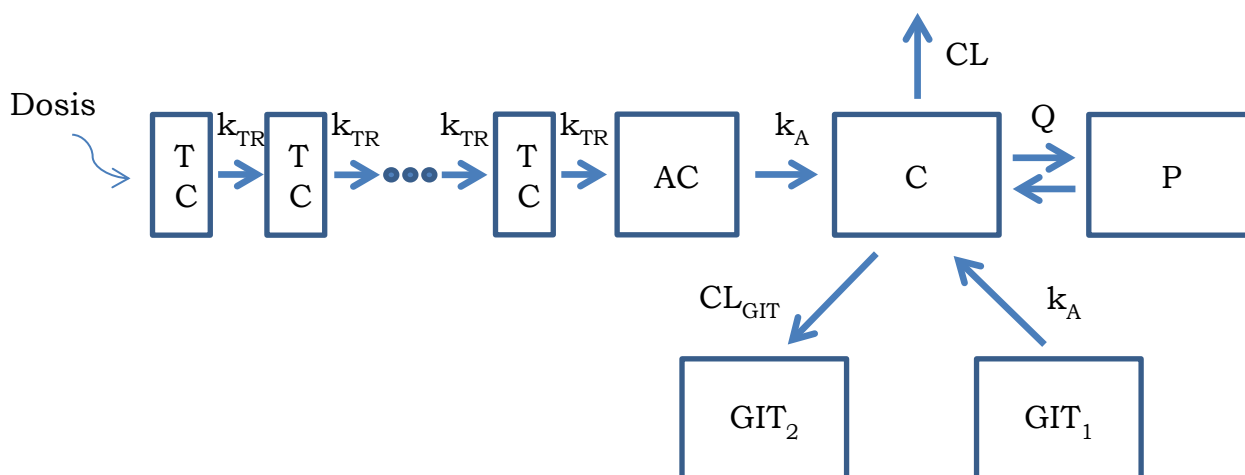
### Modelo farmacocinético estructural

La construcción del modelo se realizó en varias etapas. En cada etapa el avance del modelo en cuanto a la descripción de datos fue evaluado por las técnicas de diagnóstico mencionadas anteriormente. Inicialmente, el modelo básico mamilar fue explorado, asumiendo para todas las transferencias de fármaco una cinética de primer orden. Luego, se hizo foco en el proceso de absorción, el cual al contar con muestras de un estudio de bioequivalencia pudo ser descrito con mayor detalle que los modelos anteriormente publicados. Finalmente, la estructura correspondiente a la recirculación de NVP fue incorporada. El modelo final se muestra en la figura 5.2, es detallado en NONMEM mediante ecuaciones diferenciales con el balance de masa de NVP para cada compartimiento. Una extracción del código NONMEM para el modelo se incluye como anexo al final del capítulo.

#### Condición A



#### Condición B



**Figura 5.2.** Modelo farmacocinético para describir concentraciones de NVP tras dosis única de 200 mg.

Como se observa en la figura, el modelo básico mamilar seleccionado fue bicompartimental, con un compartimento central (C) que incorpora al plasma sanguíneo y órganos extravasculares de rápido equilibrio en cuanto

a concentración de NVP, y un compartimiento periférico (P) en el cual se incluyen tejidos extravasculares hacia donde NVP es transferida más lentamente, conformando un espacio farmacocinético distinguible del compartimiento C. La transferencia entre ambos es evaluada mediante el *clearance* de distribución ( $Q$ ), dado  $Q=k_{CP}V_C=k_{PC}V_P$ , donde  $k_{CP}$  y  $k_{PC}$  son las constantes de velocidad de primer orden de transferencia de NVP entre los compartimientos C y P, y  $V_C$ ,  $V_P$  los volúmenes de distribución de cada compartimiento. La eliminación de NVP ocurre desde el compartimiento C, con constante de velocidad  $k_{C0}$  tal que  $CL=k_{C0}V_C$ . El modelo bicompartimental fue más significativo que el monocompartimental, por presentar menor valor de AIC: 5019 versus 5127.

La absorción fue modelada con compartimientos de tránsito, modelo publicado por Savic *et al.*[208]. Mediante el mismo, se incluyen  $n$  compartimientos de tránsito (TC) antes del compartimiento de absorción (AC). La dosis es depositada a tiempo cero en el primer TC, desde el cual la masa es transferida hasta el compartimiento AC mediante procesos de primer orden con constante  $k_{tr}$ . Luego, el fármaco ingresa al plasma (C) según la constante de velocidad de primer orden  $k_A$ . Mediante el modelo se estiman como parámetros  $n$  y MTT, siendo este último el tiempo medio de residencia en los  $n$  compartimientos TC,  $MTT=(n+1)/k_{tr}$ . Este modelo es incluido en el sistema de ecuaciones diferenciales y se caracteriza por describir el ingreso de fármaco de un modo fisiológicamente plausible y por ser más flexible computacionalmente para incorporar latencias en el ingreso de fármaco al compartimiento C. Los parámetros  $n$  y MTT pueden asociarse a la fase biofarmacéutica de liberación y disolución de los comprimidos, mientras que  $k_A$  representaría la transferencia de NVP ya disuelta desde la zona más propicia para la absorción hacia C. La inclusión de estos compartimientos al modelo redujo el AIC a 4918, es decir, 99 unidades menor respecto al modelo bicompartimental con ingreso directo de primer orden desde un compartimiento de absorción con  $n=0$ .

Finalmente, se incorporó la estructura de recirculación. Se asume que NVP es secretada tal mediante un proceso de primer orden con constante de velocidad  $k_{DS}$  desde el compartimiento C a un compartimiento GIT (tracto gastrointestinal) en donde se acumula. Esta transferencia es cuantificada mediante el *clearance* de secreción  $CL_{GIT}$ , tal que  $CL_{GIT}=k_{DS}V_C$ . Transcurrido un determinado tiempo (MTIME), la cantidad de NVP acumulada en GIT comienza a reingresar al compartimiento C en una transferencia de primer orden con constante de velocidad  $k_A$ . Numéricamente, para no interrumpir la secreción de fármaco desde C a GIT y mantener las transferencias en un único sentido, el compartimiento GIT es dividido en dos compartimientos,  $GIT_1$  y  $GIT_2$ , y dos condiciones son establecidas para el modelo: condición A,

en la cual NVP es secretada desde C a GIT<sub>1</sub> y reabsorbida desde GIT<sub>2</sub>; y condición B, donde NVP es secretada desde C a GIT<sub>2</sub> y reabsorbida desde GIT<sub>1</sub>. La alternancia entre condiciones provoca la recirculación. Fisiológicamente, este modelo tiene sentido al asumir instantáneo el pasaje de la masa de NVP acumulada en cierto sector del aparato gastrointestinal hacia el sitio de absorción. El intercambio entre el compartimiento C y los compartimientos GIT debe ser unidireccional para permitir acumulación de NVP y reingreso provocando picos secundarios como los observados en la figura 5.1.

El cambio entre condiciones es modelado en NONMEM mediante la herramienta MTIME, que permite introducir  $x$  modificaciones en las ecuaciones diferenciales a determinados tiempos MTIME <sub>$x$</sub> , estimados como efectos fijos dentro del modelo. La cantidad de intercambios entre condiciones ( $x$ ) fue evaluada iterativamente con LRT. Finalmente, 4 eventos fueron incluidos (MTIME<sub>1</sub>, MTIME<sub>2</sub>, MTIME<sub>3</sub>, MTIME<sub>4</sub>), a lo largo de las 96 horas posdosis. Esto obedece a la información contenida en las observaciones, las cuales fueron realizadas con mayor frecuencia en las primeras horas posdosis. El AIC fue reducido a 4849 tras el agregado de esta estructura.

Los parámetros de disposición CL, CL<sub>GIT</sub> y V<sub>C</sub> fueron escalados respecto al peso corporal de cada sujeto (kg <sub>$i$</sub> ) de acuerdo a  $\theta_{ip} = \theta_p * \left(\frac{kg_i}{70}\right)^s$ , a modo de centrar el valor medio poblacional a un individuo de 70 kg. El factor  $s$  utilizado para los parámetros de CL fue de 0,75, mientras que para el V<sub>C</sub> se utilizó un factor de 1. Esta relación alométrica es recomendada por Holford [209], entre otros autores, y fue previamente verificada permitiendo un  $s$  variable.

### Modelo estocástico

La presencia de variabilidad interindividual (BSV) e interocasión (BOV) fue analizada para todos los parámetros, al poseer datos de dos ocasiones (período I y período II) para cada individuo. El componente de variabilidad no fue incluido cuando BSV y/o BOV mostraron tendencia a cero para un parámetro dado. Finalmente, la BOV fue significativa para los parámetros k<sub>A</sub>, MTT, CL<sub>GIT</sub>, V<sub>C</sub> y CL, mientras que BSV fue estimable para CL, CL<sub>GIT</sub>, V<sub>C</sub> y V<sub>P</sub>. La inclusión de variabilidad en cada parámetro se realizó según:

$$\theta_{ip} = \theta_p * \exp(\eta_i + \kappa_l). \quad (\text{Ecuación 5})$$

La variabilidad residual fue incluida mediante un modelo dependiente del tiempo, ya que se registró mayor variabilidad en las observaciones cercanas a la administración. Para todos los tiempos posdosis se incluyó un componente de error proporcional a la concentración ( $\varepsilon_{1ij}$ ), mientras que un

componente de error aditivo ( $\varepsilon_{2ij}$ ) fue añadido a tiempos menores que 3 horas posdosis. La relación entre el conjunto de observaciones ( $y_{ij}$ ), las predicciones en base al modelo ( $C_{ij}$ ) y el error residual fue entonces:

$$y_{ij} = C_{ij} * (1 + \varepsilon_{1ij}) + \varepsilon_{2ij} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Con  $\varepsilon_{2ij}$  nulo para todo tiempo mayor a 3 horas. Se estimaron los valores medios para cada componente.

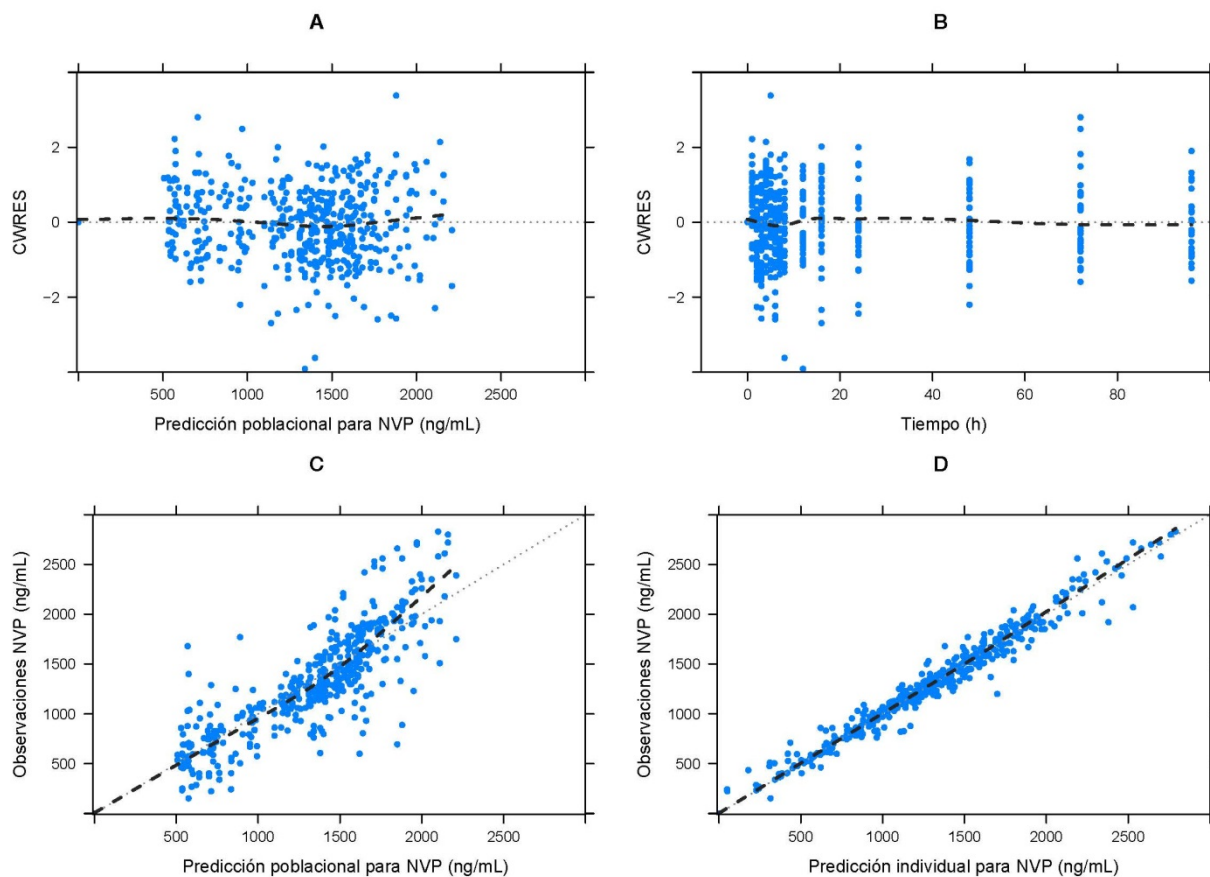
### Covariables

El efecto de factores demográficos y ambientales sobre los parámetros farmacocinéticos fue evaluado mediante el método de inclusión paso a paso y eliminación hacia atrás: se incluye una covariable como un efecto fijo en el modelo y se evalúa su significancia en la mejora del ajuste de acuerdo al LRT con  $\alpha$  igual a 0,05. Las covariables significativas permanecen en el modelo hasta llegar a un modelo completo final, a partir del cual se comienza a eliminar covariables una a una, evaluando su significancia de acuerdo al LRT con  $\alpha$  igual a 0,01. Gráficamente se evalúa la correlación entre covariables y se seleccionan aquellas a evaluar. La importancia del impacto farmacocinético de la covariable también es evaluada a la hora de incluirla al modelo final. Los factores evaluados fueron sexo, peso, índice de masa corporal, tratamiento anticonceptivo, producto administrado y consumo de xantinas. Sin embargo, en el modelo final ningún factor fue considerado de significación en los parámetros farmacocinéticos de NVP.

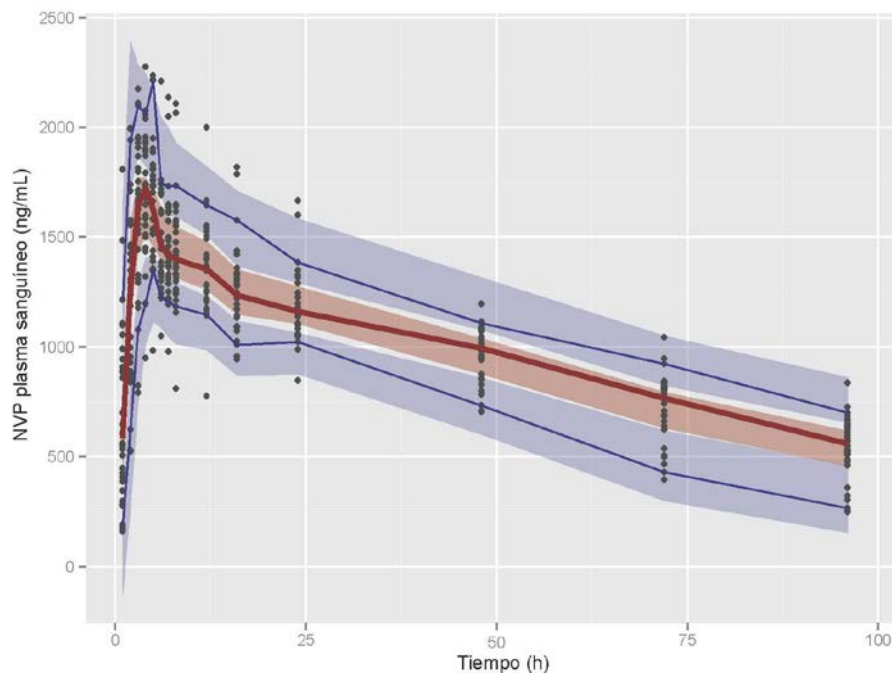
### Resultados

Las figuras 5.3 y 5.4 muestran respectivamente los gráficos básicos de bondad de ajuste y el VPC obtenidos mediante el modelo descripto. En la tabla 5.1 se resumen los resultados estimados para cada parámetro. El ajuste a los datos mejoró significativamente comparado con un modelo similar sin la estructura de recirculación. Los gráficos de la figura 5.3 muestran el adecuado ajuste mediante la correlación de observaciones y predicciones y la distribución aleatoria de residuales entorno a cero, tanto a lo largo del tiempo como respecto a las estimaciones de la variable dependiente. El VPC muestra en base a simulaciones que la distribución de datos observados fue contemplada por el modelo farmacocinético. Tanto el  $\varepsilon$ -*shrinkage* como el  $\eta$ -*shrinkage* presentaron valores adecuados, respaldando la estimación de parámetros a posteriori y los gráficos de ajuste individual. El test ETABAR indicó para todas las etas una distribución en torno a cero. El rendimiento del modelo propuesto fue adecuado computacionalmente, permitiendo la estimación de los parámetros farmacocinéticos con una precisión aceptable, a excepción de  $n$  que mostró mucha dependencia con los datos (ver *bootstrap* en tabla 5.1).





**Figura 5.2.** Gráficos de bondad de ajuste para el modelo farmacocinético de recirculación de NVP: A- CWRES *vs.* Predicciones poblacionales; B-CWRES *vs.* Tiempo; C-Observaciones *vs.* Predicciones poblacionales; y D-Observaciones *vs.* Predicciones individuales. Se muestra la línea de tendencia en negro y la línea de identidad en gris.



**Figura 5.2.** VPC para el modelo final mostrando observaciones de NVP (círculos negros), los percentiles 5to (línea inferior azul), 50avo (línea roja) y 95avo (línea superior azul) de las observaciones, y los IC95% simulados para cada percentil (zonas sombreadas).

Parámetro	Estimación final modelo	Resultados <i>bootstrap</i>		
		Mediana	IC95%	CV(%) <sup>b</sup>
$k_A$ (h <sup>-1</sup> )	0,677	0,677	0,488-0,968	17,2
MTT (h)	0,665	0,665	0,453-0,905	19,1
$n$	1,67	1,57	0,471-4,72	87,8
$V_C$ (L) <sup>a</sup>	60,4	61,4	48,2-75,5	11,4
$V_P$ (L)	63,1	64,2	46,4-86,0	15,4
Q (L/h)	19,3	18,9	14,5-25,0	13,9
CL (L/h) <sup>a</sup>	1,07	1,06	0,848-1,26	11,5
CL <sub>GIT</sub> (L/h) <sup>a</sup>	1,14	1,16	0,594-1,90	28,5
MTIME 1 (h)	7,83	7,83	7,65-11,0	12,6
MTIME 2 (h)	18,1	18,2	17,2-20,0	4,09
MTIME 3 (h)	41,5	41,4	39,4-44,1	3,17
MTIME 4 (h)	71,6	71,6	71,4-71,7	0,0923
BSV CL (%)	39,9	40,5	18,3-67,3	50,6
BSV CL <sub>GIT</sub> (%)	34,6	41,1	12,5-74,8	74,0
BSV $V_C$ (%)	17,5	15,7	5,49-25,0	59,8
BSV $V_P$ (%)	20,5	20,5	11,9-29,3	43,4
BSV $n$ (%)	82,0	66,9	0,700-193	161
BOV CL (%)	8,40	8,5	0,775-15,6	80,5
BOV CL <sub>GIT</sub> (%)	26,0	21,8	0,256-42,8	95,5
BOV $V_C$ (%)	9,10	8,56	5,61-12,9	41,4
BOV $k_A$ (%)	36,6	36,3	24,5-47,2	30,6
BOV MTT (%)	75,3	71,9	47,0-111	36,1
Error residual aditivo (ng/mL)	200	203	128-265	16,6
Error residual proporcional (%)	5,99	5,93	4,90-6,91	8,60

**Tabla 5.1.** Estimaciones de parámetros farmacocinéticos para NVP según el modelo propuesto. Los valores de *clearance* y volúmenes informados son en realidad aparentes ya que se desconoce la biodisponibilidad de las formulaciones ensayadas. Se muestra la estimación final de NONMEM y el resultado del *bootstrap* no paramétrico realizado con 200 muestras. <sup>a</sup>CL, CL<sub>GIT</sub> y  $V_C$  son estimadores típicos para un individuo con peso corporal igual a 70 Kg. <sup>b</sup>El CV es informado suponiendo distribución normal de los parámetros.

La estimación de los parámetros de disposición fue coherente con los resultados obtenidos tras el análisis no compartimental y con datos previamente publicados. Como era esperado, al incluir la recirculación se obtuvo un *clearance* total (CL+CL<sub>GIT</sub>) 78% superior al valor estimado en el capítulo 4 y 47% superior al valor reportado por Lamson *et al.* para dosis

única [169]. Tanto para CL como para  $CL_{GIT}$  se detectó una considerable BSV. Probablemente debido al número de sujetos disponibles no fue posible hallar covariables significativas para el *clearance*. En el caso de  $CL_{GIT}$ , la razón puede encontrarse en la elevada BOV. Para ambos parámetros se observaron tendencias en cuanto al sexo, con mayor CL para hombres y mayor  $CL_{GIT}$  en mujeres, en ambos casos sin significancia estadística. Zhou *et al.* [196] reportaron una diferencia significativa asociada al sexo en el CL de NVP en el mismo sentido que la tendencia aquí observada (3,97 L/h *vs.* 3,02 L/h para hombres y mujeres respectivamente, en estado estacionario). En cuanto a la absorción de NVP, se detectó una elevada variabilidad intraindividual (BOV) en  $k_A$  y MTT, no explicada por la administración de diferentes productos (test y referencia). La magnitud de esta variabilidad determinó que la BSV fuera despreciable para estos parámetros, sin embargo lo contrario sucedió para  $n$ , parámetro marcado por una importante BSV.

Dos eventos de recirculación fueron incluidos dentro de las primeras 24 horas, mientras que otros dos fueron estimados para las 41,5 y 71,6 horas. Estos valores reflejan tiempos medios para el comienzo de la reabsorción de NVP. Debido a la escasez de muestras a partir de las 24 horas posdosis, sólo un reingreso diario de fármaco es incluido para los días 2 y 3. Estos procesos comprenderían la reabsorción media de fármaco necesaria para explicar las observaciones a las 48, 72 y 96 horas posdosis de acuerdo a los parámetros de disposición estimados. Los primeros dos eventos, al estar descritos por mayor cantidad de datos, tienen mayor impacto en la estimación de  $CL_{GIT}$ .

Considerando todos los voluntarios, el  $CL_{GIT}$  comprende un 51,6% de la salida total de NVP desde el compartimiento C ( $CL_{GIT}+CL$ ), lo cual significa que dicha proporción de fármaco biodisponible es sometida al proceso de recirculación. Es muy poco probable que esta magnitud este asociada a un proceso de recirculación enterohepática como plantean varios autores, principalmente por dos razones: a) la transferencia hepatobiliar para NVP como tal estaría limitada ya que no es sustrato de transportadores de eflujo expresados en canalículos biliares; b) la excreción hepatobiliar podría ser significativa para derivados hidróxido de NVP que luego son sometidos a glucuronidación. Su desconjugación a nivel intestinal originaría derivados hidróxido de NVP y no NVP como tal.

Un mecanismo que podría explicar el fenómeno de recirculación para NVP sería la secreción hacia el estómago y la reabsorción desde el intestino. Este proceso ha sido descrito en la disposición de fenoperidina y fentanilo, fármacos básicos con  $pK_a$  de 7,7 y 8,4 respectivamente [210]. En 1957, Shore *et al.* [211] utilizando perros mostraron cómo fármacos con  $pK_a$  comprendidos entre 1,4 y 10,3 eran secretados hacia el fluido gástrico luego de administración intravenosa, y estimaron la relación (R) entre concentración gástrica y concentración plasmática libre de fármaco a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$R = \frac{(1+10^{(pKa-pHg)})}{(1+10^{(pKa-pHp)})} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Siendo pHg y pHp los valores de pH gástrico y plasmático, respectivamente. Para NVP (pKa=2,8), si se considera un pHg igual a 1,2 y un pHp igual a 7,4, el valor de R obtenido es de 40,8. El pHg utilizado corresponde al pH medio del fluido secretado hacia la luz estomacal, aproximado de acuerdo al pH del contenido gástrico en ayunas [212]. Teniendo en cuenta que la concentración media de NVP observada para el conjunto de sujetos en el intervalo de 96 horas fue de 1020 ng/mL, la concentración libre (40%) puede ser estimada en 408 ng/mL. La concentración media de NVP en fluido gástrico sería entonces aproximadamente 16650 ng/mL. En un día, alrededor de 1,5 L son secretados hacia la luz estomacal, por lo cual en 96 horas la cantidad media de NVP secretada es estimable en 100 mg, un 50% de la dosis administrada. Esta proporción se aproxima al valor estimado mediante el modelo farmacocinético poblacional.

El proceso de recirculación gastrointestinal podría entonces explicar los múltiples picos observados en los perfiles de NVP. El fármaco sería acumulado en el fluido gástrico, donde posee una solubilidad significativamente mayor respecto a la solubilidad en plasma sanguíneo, para luego llegar al duodeno tras las periódicas aperturas del píloro. Con la ingesta de comidas se favorece este proceso debido a la intensa secreción de jugo gástrico estimulada, provocando luego un reingreso de fármaco observado mediante el aumento de la concentración plasmática. La elevada fracción libre de NVP y el escaso metabolismo presistémico contribuyen a la magnitud de este proceso. Este mecanismo puede estar presente en la disposición de fármacos con similares características, principalmente bases débiles con baja solubilidad en agua.

Clínicamente, la relevancia de este proceso puede estar relacionada con los efectos adversos observados para NVP en cerebro, piel e hígado. La incidencia no se ha podido correlacionar con concentraciones plasmáticas [213]. Es posible que periódicos incrementos en el cociente A/V conduzcan a una mayor concentración de NVP en espacios extravasculares. A su vez, dada la cantidad de fármaco que sufre recirculación, la interrupción del proceso podría ser una herramienta muy útil en casos de intoxicación, principalmente debido a su elevada  $t_{1/2}$ . Administrando por ejemplo carbón activado o colestiramina por vía oral se incrementaría el CL de NVP al doble ya que la fracción secretada con el jugo gástrico sería finalmente excretada con las heces.

Si bien sería esperable para este proceso que hombres presenten mayor fracción de NVP recirculante debido a la mayor cantidad de ácido clorhídrico que secretan con el jugo gástrico, la tendencia observada en los datos fue opuesta. Como hipótesis, se debe considerar que mujeres presentan una mayor distribución regional del gasto cardíaco, es decir que una mayor fracción de NVP estaría disponible para ser transferida al estómago, factor que podría tener mayor impacto en la recirculación de NVP que la diferente cantidad de ácido secretado.

## Conclusiones

Los perfiles farmacocinéticos de NVP obtenidos tras una dosis única en voluntarios sanos fueron analizados mediante un modelo poblacional incorporando la recirculación. Con este modelo se mejoró la descripción de las observaciones, cuantificando los parámetros vinculados a la recirculación además de otros parámetros de absorción y disposición del fármaco.

De acuerdo a las estimaciones del modelo NVP es extensamente secretada y reabsorbida, fenómeno que provoca múltiples picos en las concentraciones plasmáticas. Es probable que la secreción ocurra hacia la luz estomacal debido a la mayor solubilidad que presenta la molécula en medio ácido, mecanismo que podría estar presente en fármacos con similares propiedades fisicoquímicas.

No se encontraron diferencias significativas asociadas al sexo en la respuesta farmacocinética de NVP.

El modelo farmacocinético desarrollado a partir de los datos de NVP es coherente con un proceso fisiológico de recirculación, pudiendo ser aplicado al análisis de otros principios activos.

### **Anexo - Código NONMEM del modelo farmacocinético utilizado, implementación de recirculación de fármaco. Extracción de las partes esenciales.**

Se incluye una extracción de las partes esenciales del código para modelar la recirculación. No se incluyen las ecuaciones para modelar los compartimientos de tránsito en la absorción, que se pueden encontrar en el artículo de Savic *et al.*[208], ni las ecuaciones para incluir la BOV, publicadas por Karlsson y Sheiner [214].

---

```

$MODEL
NCOMPARTMENTS=5
COMP = (DEPOT, DEFDOSE)
COMP = (CENTRAL, DEFOBS)
COMP = (PERIPHERAL)
COMP = (GIT1)
COMP = (GIT2)

$PK
CL = THETA(1) *(WT/70)**.75*EXP(ETA(1))
VC = THETA(2) *(WT/70)*EXP(ETA(2))
VP = THETA(3)*EXP(ETA(3))
CLGIT = THETA(4) *(WT/70)**.75*EXP(ETA(4))
Q = THETA(5)
KA = THETA(6)
MTIME(1) = THETA(7)
MTIME(2) = THETA(8)

```

$MTIME(3) = THETA(9)$   
 $MTIME(4) = THETA(10)$   
 $KCO = CL/VC$   
 $KCP = Q/VC$   
 $KPC = Q/VP$   
 $KDS = CLGIT/VC$

§DES

$KMCA = 1 - MPAST(1) + MPAST(2) - MPAST(3) + MPAST(4)$  ;Llave para prender/apagar condición A

$KMCB = MPAST(1) - MPAST(2) + MPAST(3) - MPAST(4)$  ;Llave para prender/apagar condición B

$DADT(1) = -KA * A(1)$

$DADT(2) = KA * A(1) - (KCO + KDS + KCP) * A(2) + KPC * A(3) + KMCB * KA * A(4) + KMCA * KA * A(5)$

$DADT(3) = KCP * A(2) - KPC * A(3)$

$DADT(4) = KMCA * KDS * A(2) - KMCB * KA * A(4)$

$DADT(5) = KMCB * KDS * A(2) - KMCA * KA * A(5)$

§ERROR

IPRED= F

ADD=0

IF(TIME<3) ADD=THETA(11)\*\*2

W=SQRT(ADD+THETA(12)\*\*2\*F\*F)

Y=IPRED+W

-----

$MTIME(i)$ , incluido como un parámetro farmacocinético, define el inicio de la *i-ésima* reabsorción.  $MPAST(i)$  es una variable discreta que toma un valor nulo hasta que se alcanza  $MTIME(i)$ , y vale 1 para tiempos posteriores.

$KMCA$  y  $KMCB$  son llaves definidas por el código para cambiar la condición del modelo entre A y B. Cuando  $KMCA$  vale 1 (ON),  $KMCB$  vale 0 (OFF) y viceversa.

La siguiente tabla muestra como la condición del modelo es alternada mediante las llaves  $KMCA$  y  $KMCB$  a lo largo del tiempo:

Lapso	MPAST(1)	MPAST(2)	MPAST(3)	MPAST(4)	KMCA	KMCB	Condición del modelo
0 – MTIME(1)	0	0	0	0	ON	OFF	A
MTIME(1)- MTIME(2)	1	0	0	0	OFF	ON	B
MTIME(2)- MTIME(3)	1	1	0	0	ON	OFF	A
MTIME(3)- MTIME(4)	1	1	1	0	OFF	ON	B
MTIME(4)- INFINITO	1	1	1	1	ON	OFF	A

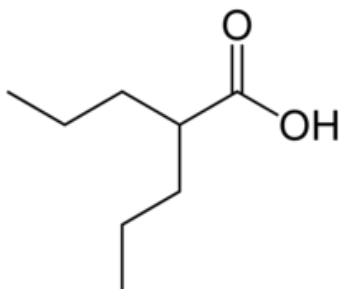
## CAPITULO 6. Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética del ácido valproico

---

La investigación presentada en el presente capítulo dio lugar a la publicación del artículo científico N° II.

### Introducción

El ácido valproico (VPA) o ácido 2-propilpentanoico (figura 6.1), es un ácido débil ( $pK_a=4,8$ ) estructuralmente similar al GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico), con propiedades anticonvulsivantes a través de varios mecanismos de acción. Es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tipos de epilepsia, aunque también es indicado para tratar ciertos trastornos psiquiátricos y la migraña. Ha sido comercializado bajo diferentes presentaciones, siendo la más utilizada el divalproato sódico introducido por Laboratorios Abbott mediante el producto Valcote® (también Depakote®) [215, 216]. Con la presentación más utilizada, Valcote® comprimidos de liberación retardada (con recubrimiento gastrorresistente), se disminuye la absorción del principio activo en el estómago y así la incidencia de efectos adversos gastrointestinales como náuseas y vómitos [217]. El perfil de toxicidad de VPA presenta como reacciones más severas la teratogenia, la hiperamonemia asociada a un déficit de carnitina que el mismo fármaco provoca y la hepatotoxicidad, la cual puede ser aguda o crónica, asociada al impedimento en funciones mitocondriales [218–220].



**Figura 6.1.** Estructura química del Ácido Valproico.

Tras administración oral de comprimidos de liberación retardada de Valcote® la biodisponibilidad de VPA puede considerarse completa. El divalproato sódico tiene elevada solubilidad en agua (fácilmente soluble) [221], por lo que en fluidos intestinales se disuelve rápidamente desde los comprimidos gastrorresistentes. El ingreso hacia la circulación sistémica se completa poco tiempo después gracias a la elevada permeabilidad del fármaco. La presentación de liberación prolongada (Valcote-ER®) muestra una biodisponibilidad incompleta, de aproximadamente 75% respecto a los comprimidos con recubrimiento entérico [222–224], lo cual ha sido asociado a una significativa disminución de la permeabilidad en zonas distales del

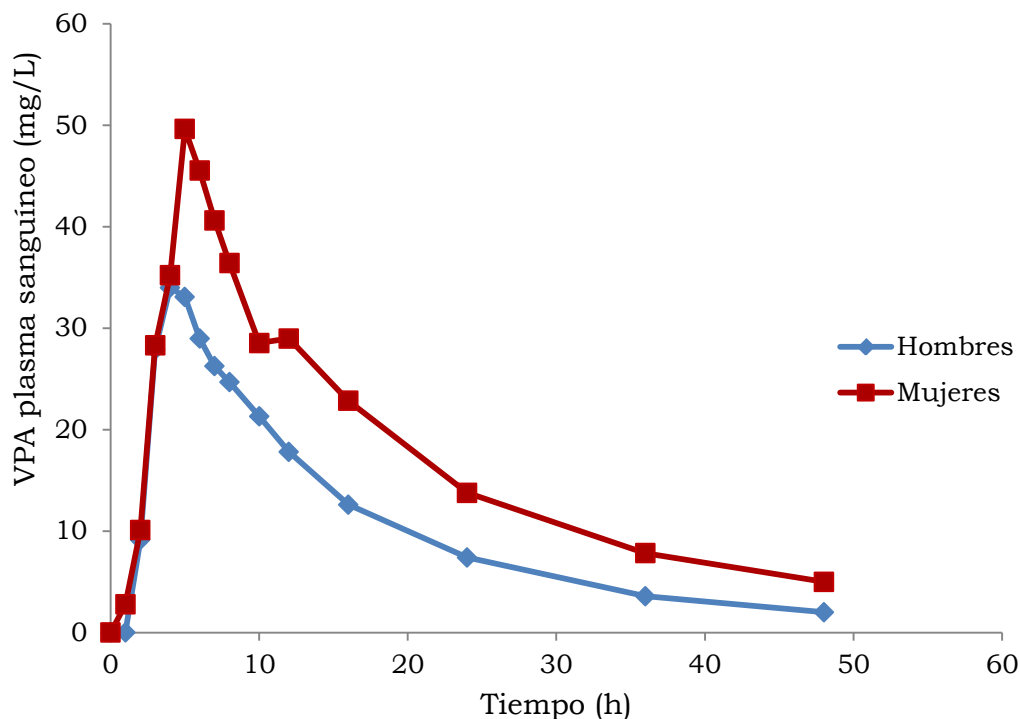
intestino debido a la ionización de VPA. Su distribución se caracteriza por una elevada y saturable unión a proteínas plasmáticas: un incremento en la fracción libre de VPA de 7,5% a 22% fue referenciado al pasar de 50 a 150 mg/L en plasma sanguíneo [225]. La eliminación ocurre casi enteramente por metabolismo hepático, menos del 3% de la dosis es recolectada en forma incambiada en orina. Existen 3 rutas principales para la biotransformación de VPA: conjugación con ácido glucurónico a través de UGT1A6 (40%),  $\beta$ -oxidación mitocondrial (40%) y  $\omega$ -oxidación extramitocondrial a través de complejos CYP450: CYP2C9, CYP2A6 y CYP2B6 (20%)[218]. El metabolito conjugado de VPA (VPAG) es excretado por vía hepatobiliar, proceso que ha sido asociado a la significativa recirculación enterohepática observada en ratas, debido a la formación de VPA en intestino catalizada por  $\beta$ -glucuronidasa bacteriana [226–229]. El VPA es sustrato de transportadores de eflujo, aunque los datos bibliográficos no son concluyentes respecto al transportador involucrado [74, 230–234]. Para VPAG también se ha reportado un significativo transporte de eflujo, probablemente asociado a un transportador de la familia MRP [235].

En el CE BIOBE se realizó un estudio de bioequivalencia promedio entre una formulación de liberación prolongada de divalproato de sodio producida por un laboratorio nacional y Valcote® comprimidos gastroresistentes. 14 voluntarios sanos (7 hombres y 7 mujeres) participaron del estudio luego de firmar un consentimiento informado con detalles del protocolo aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Química, UdelaR. Los pesos medios corporales (IC95%) fueron de 79,0 (9,0) y 59,0 (7,7) kg para hombres y mujeres respectivamente. Dos voluntarias mujeres se encontraban tomando anticonceptivos orales compuestos por etinilestradiol y drospirenona (ACO). Cada voluntario recibió una dosis equivalente a 500 mg de VPA de cada producto luego de realizar 8 horas de ayuno. Las administraciones fueron separadas por un período de lavado de 7 días. Se tomaron muestras sanguíneas hasta las 48 horas posdosis. En cada período los voluntarios permanecieron internados por 24 horas sometidos a un protocolo de alimentación estandarizado, con ingestas 4, 8, 12 y 24 horas luego de recibido el medicamento. Las concentraciones fueron analizadas en plasma sanguíneo mediante HPLC-UV, de acuerdo a una técnica validada adaptada de Amini *et al.* [236].

Únicamente las observaciones obtenidas tras administración de Valcote® fueron tomadas para realizar un análisis farmacocinético poblacional, aplicando ambos métodos TS y NLME. La razón para utilizar únicamente estos datos fue el conocido rendimiento de esta formulación, cuya biodisponibilidad puede asumirse completa. La figura 6.2 muestra los



perfiles medios de concentraciones plasmáticas de VPA obtenidos en hombres y mujeres.



**Figura 6.2.** Perfiles medios de VPA en plasma sanguíneo obtenidos en 7 hombres y 7 mujeres tras administración de una dosis única de Valcote® comprimidos de liberación retardada equivalente a 500 mg de VPA.

Varios estudios poblacionales sobre VPA han sido publicados [237–241], todos ellos utilizando datos de poca densidad obtenidos en pacientes ambulatorios con concentraciones de VPA en estado estacionario. Respecto al sexo, únicamente Yukawa *et al.* encontraron diferencias significativas en cuanto al CL de VPA, estimándolo mayor en hombres.

### **Análisis no compartimental poblacional mediante método TS**

La tabla 6.1 resume las estimaciones realizadas para tendencias típicas y de dispersión de parámetros farmacocinéticos determinados mediante análisis no compartimental. Se incluyen los parámetros para hombres y mujeres. La  $t_{1/2}$  fue estimada con las muestras obtenidas 12 horas posdosis. El  $AUC_T$  correspondió en promedio a un 91% del  $AUC_{\infty}$ .

Como puede observarse en la figura 6.2 y la tabla 6.1, se registró un significativo  $T_0$  producto del recubrimiento gastroresistente que presenta la formulación, sin marcadas diferencias entre voluntarios masculinos y femeninos. Luego de iniciada la absorción de VPA, la misma ocurre rápidamente, reflejando rápida disolución y permeabilidad del fármaco. Si bien se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a exposición máxima ( $C_{MAX}$ ) y total ( $AUC_T$ ) a VPA, las mismas

desaparecen cuando se considera el peso corporal, correspondiéndose con lo observado para CL/F/kg. La BSV para este último parámetro, mayor en mujeres, no permitió detectar diferencias significativas a pesar de la clara tendencia en las estimaciones, presentando hombres un valor medio más del 20% superior al observado en mujeres. Sin embargo, si las mujeres bajo terapia con ACO son retiradas para la comparación, el CL/F/kg medio para mujeres baja más del 10% y la diferencia respecto a hombres se hace significativa ( $p < 0,05$ ). La estimación individual de CL/F/kg para las voluntarias bajo terapia anticonceptiva se acercó al valor medio observado para voluntarios hombres (0,0133 L/h/kg). El aumento del *clearance* de VPA en estado estacionario en mujeres comedicadas con ACO fue previamente descrito por Galimberti *et al.* [242], quienes encontraron un aumento del 21,5% respecto a mujeres en monoterapia de VPA y lo relacionaron a un efecto inductivo del etinilestradiol sobre la glucuronidación del principio activo, efecto observado también para la eliminación de lamotrigina [243, 244].

	<b>T<sub>0</sub></b> <b>(h)</b>	<b>T<sub>MAX</sub></b> <b>(h)</b>	<b>C<sub>MAX</sub></b> <b>(mg/L)</b>	<b>AUC<sub>T</sub></b> <b>(mg*h/L)</b>	<b>t<sub>1/2</sub></b> <b>(h)</b>	<b>CL/F</b> <b>(L/h/kg)</b>	<b>V<sub>D</sub>/F</b> <b>(L/kg)</b>
Hombres (N=7)	2 (1,0)	2 (0,5)	35,0 (18,5%)	492 (11,7%)	11,4 (42,3%)	0,0120 (10,0%)	0,197 (42,7%)
Mujeres (N=7)	2 (1,5)	2 (1,5)	54,6 (37,2%)	789 (24,9%)	14,2 (19,5%)	0,00962 (29,7%)	0,197 (15,7%)
Total (N=14)	2 (1,0)	2 (1,0)	43,7** (30,1%)	623** (32,0%)	12,7 (31,8%)	0,0107 (27,1%)	0,197 (28,8%)

**Tabla 6.1.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos para VPA, expresados como media (CV), excepto para T<sub>0</sub> y T<sub>MAX</sub> presentados como mediana (rango intercuartílico). \*\*Diferencias significativas entre hombres y mujeres ( $p < 0,01$ ).

El perfil medio para mujeres revela un claro pico secundario de VPA alrededor de las 10 horas posdosis, donde la fase de absorción puede asumirse completa. Si bien para hombres no se observó este evento en la misma gráfica, los perfiles individuales también mostraron picos secundarios a similares tiempos posdosis. El promediado de valores de concentración suavizó el perfil medio ocultando la presencia de recirculación de VPA en este subgrupo.

### **Análisis compartimental poblacional mediante NLME**

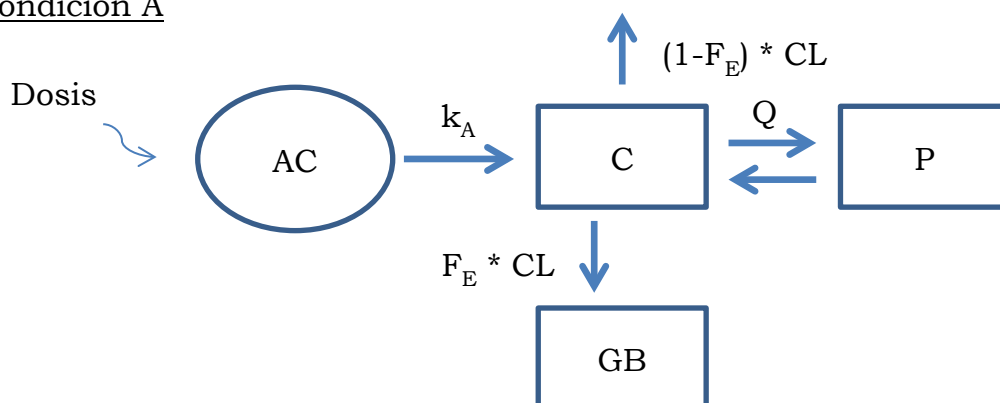
Para ahondar en la descripción de los datos observados y obtener más información acerca de las diferencias observadas entre hombres y mujeres sin terapia anticonceptiva, se desarrolló un modelo farmacocinético poblacional para VPA incluyendo la recirculación enterohepática. A

diferencia del modelo aplicado para nevirapina, en este caso se incluyó un único evento de recirculación ya que los niveles de VPA en plasma sanguíneo y su rápida eliminación no permitieron observar más de un pico secundario.

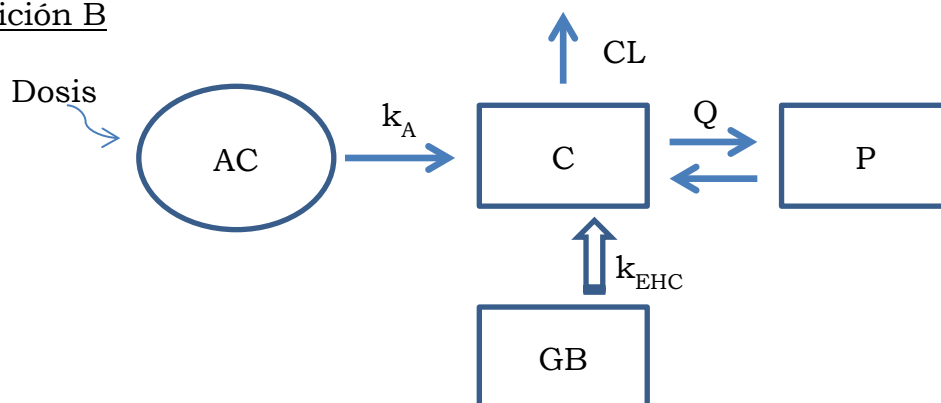
Los datos fueron analizados utilizando NONMEM 6.0, con asistencia de las herramientas de PsN 3.5.3 y la interfaz gráfica Pirana 2.6.1 [205, 207, 245].

La figura 6.3 muestra el modelo estructural desarrollado. El ingreso de VPA fue modelado de acuerdo a una cinética de primer orden con tiempo de latencia ( $T_0$ ) desde un compartimiento de absorción (AC). La disposición fue caracterizada por un modelo bicompartimental con un compartimiento central (C) y uno periférico (P), con eliminación desde C de acuerdo a una cinética de primer orden. Un compartimiento extra fue agregado para considerar la presencia de la vesícula biliar (GB) hacia donde el VPA es secretado desde C. En la condición A del modelo el VPA es acumulado en GB. A tiempo  $T_{EHC}$ , el modelo pasa a la condición B, y la cantidad de fármaco acumulada en GB reingresa a C de acuerdo a un proceso de primer orden caracterizado por la constante de velocidad  $k_{EHC}$ .

#### Condición A



#### Condición B



**Figura 6.3.** Modelo farmacocinético estructural para describir la respuesta farmacocinética a VPA tras una dosis única. La condición A ocurre para todo tiempo menor a  $T_{EHC}$ , mientras que para tiempos mayores rige la condición B.

Este modelo presentó el menor valor de AIC respecto a otros modelos estructurales ensayados: monocompartimental con recirculación y monocompartimental y bicompartimental sin recirculación enterohepática.

Para la implementación del mismo las siguientes suposiciones fueron realizadas:

- Todas las transferencias de fármaco siguen un proceso cinético de primer orden.
- La fracción de VPA biodisponible que es secretada hacia la bilis, descargada hacia el duodeno y reabsorbida hacia la circulación sistémica es cuantificada como una fracción del *clearance* total:  $F_E$ . Esta fracción es responsable del aumento en las concentraciones plasmáticas de VPA que origina un pico secundario.
- VPA es la entidad recirculante. La fracción de VPAG secretada con la bilis hacia el duodeno, convertida en VPA en la luz intestinal y reabsorbida como tal es considerada dentro de  $F_E$ .
- La reabsorción de VPA se cuantifica con una constante de velocidad ( $k_{EHC}$ ) diferente a la constante de absorción ( $k_A$ ), ya que se aplican a distintos procesos. La  $k_A$  consideran liberación y disolución de VPA desde el medicamento administrado y su permeación hacia la circulación sistémica. Con  $k_{EHC}$  se cuantifica el reingreso de VPA disuelto en sales biliares y su posible formación previa a partir de VPAG en intestino.
- Existe un único evento de reabsorción. Al pasar a la condición B, el VPA acumulado en GB reingresa al compartimiento C. Sin embargo el CL total permanece incambiado: la transferencia de fármaco hacia la bilis sigue siendo considerada dentro de este término.
- La transferencia de VPA y VPAG desde la vesícula biliar hacia el intestino es considerada inmediata, por lo que no se incluye en el modelo.

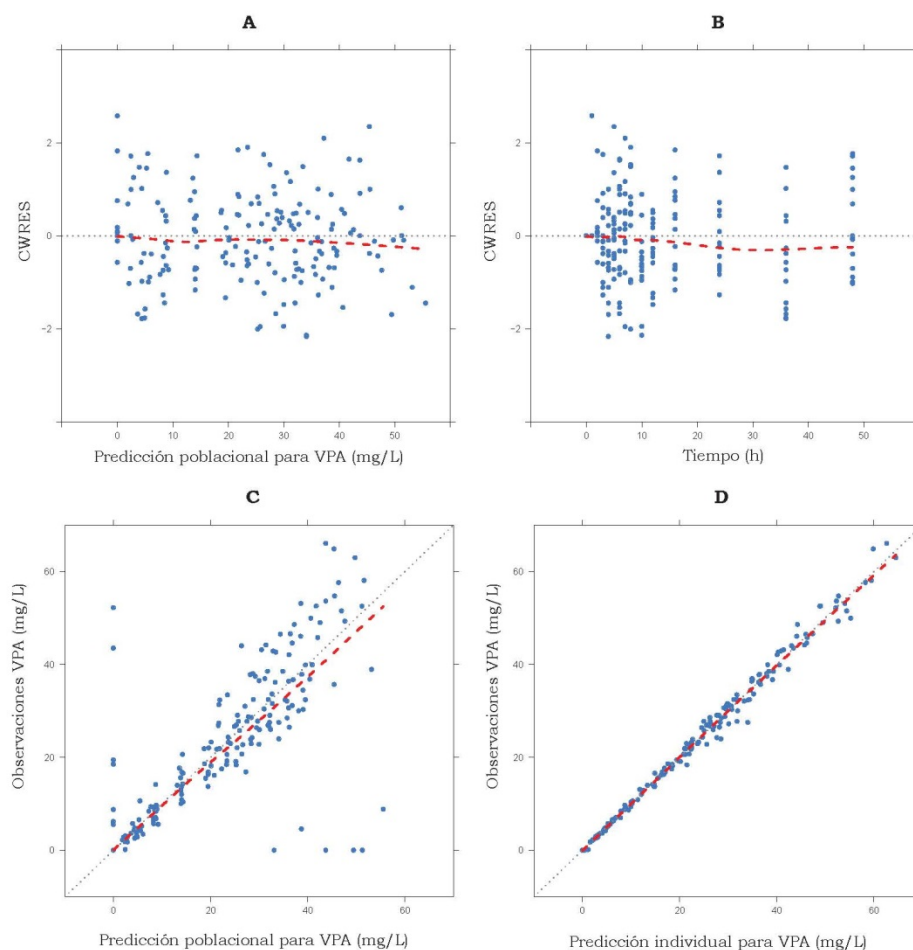
Este mecanismo de recirculación enterohepática conserva las características fisiológicas en cuanto a que en ningún momento hay una transferencia bidireccional entre el plasma y el sitio donde el VPA es acumulado. Los efectos fijos estimados fueron tiempo de latencia ( $T_0$ ), constante de velocidad de absorción ( $k_A$ ),  $Q$  (*clearance* de distribución), volumen de los compartimientos central y periférico ( $V_C$  y  $V_P$  respectivamente), *clearance* total de salida de VPA desde el plasma sanguíneo ( $CL=k_{CO} \cdot V_C$ ), fracción de VPA reabsorbida ( $F_E$ ), tiempo de inicio de reabsorción ( $T_{EHC}$ ) y constante de velocidad de reabsorción ( $k_{EHC}$ ). La variabilidad residual fue descrita con un modelo proporcional:

$$y_{ij} = C_{ij} * (1 + \varepsilon_{ij}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

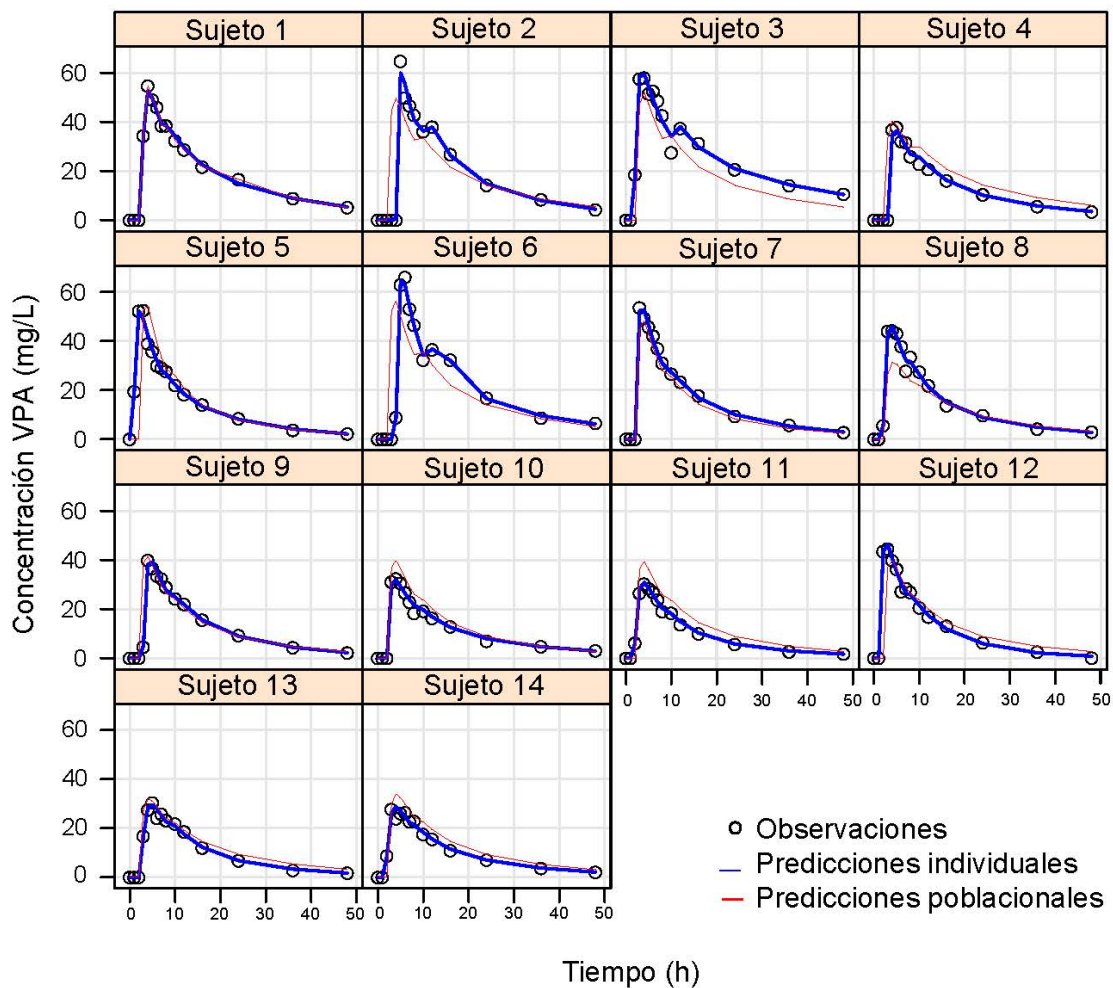
Donde  $y_{ij}$  es la concentración observada de VPA a tiempo  $j$  en el individuo  $i$ ,  $C_{ij}$  la concentración estimada mediante el modelo estructural y  $\varepsilon_{ij}$  es el error residual, normalmente distribuido entorno a cero con varianza  $\sigma^2$ . La variabilidad interindividual (BSV) fue incluida para todos los efectos fijos de acuerdo a un modelo exponencial.

Finalmente, se realizó una búsqueda de covariables sobre los efectos fijos. Peso corporal, sexo, tratamiento con ACO, altura e IMC fueron evaluados. Se utilizó el método de inclusión paso a paso y eliminación hacia atrás explicado en el capítulo 5, acompañado de diagnósticos gráficos.

Las figuras 6.4 y 6.5 muestran respectivamente los gráficos básicos de bondad de ajuste y los ajustes individuales obtenidos mediante el modelo farmacocinético desarrollado. La tabla 6.2 resume los resultados finales para los efectos fijos y aleatorios con la inclusión de covariables significativas.



**Figura 6.4.** Gráficos de bondad de ajuste para el modelo farmacocinético de recirculación de VPA: A- CWRES *vs.* Predicciones poblacionales; B-CWRES *vs.* Tiempo; C-Observaciones *vs.* Predicciones poblacionales; y D-Observaciones *vs.* Predicciones individuales. Se muestra la línea de tendencia en rojo y la línea de identidad en gris.



**Figura 6.5.** Ajustes individuales a las observaciones de VPA en plasma sanguíneo mediante el modelo farmacocinético poblacional incluyendo recirculación enterohepática.

Las figuras 6.4 y 6.5 muestran la buena descripción que se obtuvo para las observaciones de VPA mediante el modelo farmacocinético propuesto. El comienzo de la recirculación fue estimado con una media de 8,27 horas, consistente con la ingesta de comidas realizada 8 horas posdosis (merienda). La ingesta de comida correspondiente al almuerzo (4 horas posdosis) coincide con el  $T_{MAX}$ , por lo que no es diferenciable de la absorción de VPA.

Los efectos fijos fueron obtenidos con muy buena precisión, mientras que si bien se registra un mayor CV para la estimación de efectos aleatorios las magnitudes se encuentran dentro de lo aceptable, lo que respalda el rendimiento del modelo aplicado a las observaciones. El error residual proporcional estimado fue de baja magnitud. Una significativa magnitud de la BSV para  $k_A$  fue explicada por el peso corporal (BW), al igual que para  $V_C$ . En este último caso el efecto del BW fue normalizado para un sujeto de 70 kg. No se incluyó un parámetro de BW para el CL.

Parámetro	Estimación final modelo	Resultados <i>bootstrap</i>		
		Mediana	IC95%	CV(%) <sup>a</sup>
$k_A$ (h <sup>-1</sup> ) = $\theta_1 - \theta_2 \cdot BW$	$\theta_1 = 2,91$	2,91	2,83-2,99	1,22
	$\theta_2 = 0,0184$	0,0184	0,0165-0,0203	2,16
$k_{EHC}$ (h <sup>-1</sup> ) = $\theta_3$	$\theta_3 = 1,20$	1,15	0,890-1,51	12,8
$V_C$ (L) = $\theta_4 - \theta_5 \cdot (BW/70)$	$\theta_4 = 9,60$	9,62	9,47-9,73	2,96
	$\theta_5 = 0,134$	0,137	0,0905-0,177	21,6
$V_P$ (L) = $\theta_6$	$\theta_6 = 4,95$	4,88	4,76-5,14	3,28
$Q$ (L/h) = $\theta_7$	$\theta_7 = 0,559$	0,562	0,501-0,617	4,75
$CL$ (L/h) = $\theta_8 \cdot S + \theta_9 \cdot (1-S)$	$\theta_8 = 0,581$	0,591	0,485-0,677	5,33
	$\theta_9 = 0,900$	0,856	0,854-0,946	3,49
$F_E = \theta_{10} \cdot S + \theta_{11} \cdot (1-S)$	$\theta_{10} = 0,462$	0,465	0,358-0,566	14,9
	$\theta_{11} = 0,218$	0,196	0,118-0,318	13,6
$T_0$ (h) = $\theta_{12} \cdot S + \theta_{13} \cdot (1-S)$	$\theta_{12} = 2,21$	2,20	2,08-2,33	7,86
	$\theta_{13} = 2,00$	2,00	1,83-2,17	1,01
$T_{EHC}$ (h) = $\theta_{14}$	$\theta_{14} = 8,27$	8,26	8,01-8,53	1,15
BSV $k_A$ (%)	24,4	24,7	19,1-24,8	13,8
BSV $k_{EHC}$ (%)	38,7	36,3	33,7-72,2	55,6
BSV $V_C$ (%)	21,2	21,4	17,3-22,3	9,41
BSV $V_P$ (%)	23,9	24,3	24,2-35,3	30,9
BSV $Q$ (%)	16,0	16,1	15,6-16,3	5,77
BSV $CL$ (%)	21,2	21,5	16,0-21,5	11,8
BSV $F_E$ (%)	41,1	42,9	39,0-43,2	12,6
BSV $T_0$ (%)	37,7	39,9	33,1-41,2	10,8
BSV $T_{EHC}$ (%)	18,9	18,8	18,5-19,7	10,6
Error residual proporcional ( $\sigma^2$ )	0,00524	0,0542	0,0494-0,0554	3,87

**Tabla 6.2.** . Estimaciones de parámetros farmacocinéticos para VPA según el modelo propuesto. Los valores de *clearance* y volúmenes informados son en realidad aparentes ya que se desconoce la biodisponibilidad de la formulación ensayada. Se muestra la estimación final de NONMEM y el resultado del *bootstrap* no paramétrico realizado con 100 muestras. S es igual a cero para hombres y mujeres bajo terapia ACO (hombres<sup>#</sup>) e igual a 1 para mujeres sin comedición. <sup>a</sup>El CV es informado suponiendo distribución normal de los parámetros.

Los resultados obtenidos mediante el NLME permitieron, al igual que con el análisis TS, encontrar diferencias significativas en CL y  $F_E$  asociadas al sexo y al tratamiento con ACO en mujeres, pero sin la necesidad de descartar resultados. Adicionalmente, pequeñas pero significativas diferencias provocadas por las mismas covariables fueron estimadas en  $T_0$  mediante el modelo farmacocinético poblacional. Mujeres sin tratamiento ACO mostraron menor CL, mayor  $F_E$  y mayor  $T_0$  respecto a hombres y a mujeres

recibiendo ACO. El efecto de ACO sobre la farmacocinética de VPA en mujeres provocó un apartamiento en los parámetros mencionados hacia valores similares a los observados para hombres. Por esto, a fin de simplificar el modelo de covariables, hombres y mujeres recibiendo ACO fueron incluidos en un mismo subgrupo (hombres<sup>#</sup>, S=0).

Las estimaciones para CL de VPA no difirieron entre métodos NLME y TS. La principal ventaja del análisis NLME pasó por la estimación de los parámetros asociados a recirculación enterohepática. Una significativa fracción de VPA biodisponible sometida a este proceso fue estimada, con medias de 46,2% y 21,8% para mujeres y hombres<sup>#</sup>, respectivamente.

Es necesario analizar si la formación de VPAG puede ser totalmente responsable de la recirculación enterohepática de VPA. La fracción de fármaco eliminada por esta ruta, informada por Silva *et al.* [218] como un 40%, es coherente con los resultados observados para mujeres sin ACO. Court *et al.* [246] demostraron que hombres presentan una expresión 50% mayor en UGT1A6 respecto a mujeres en microsomas hepáticos. Miners *et al.* [247] analizando el metabolismo de paracetamol en hombres, mujeres y mujeres bajo terapia ACO, encontraron diferencias en el CL con iguales tendencias que las aquí reportadas, asociadas principalmente a la glucuronidación, donde UGT1A6 participa significativamente. Sin embargo, la  $F_E$  de VPA no fue mayor en hombres<sup>#</sup>, al contrario, mujeres sin ACO presentaron una  $F_E$  más de 2 veces superior. Adicionalmente, el 100% del VPAG formado debería ser reabsorbido en mujeres sin ACO para reflejar la  $F_E$  estimada, lo cual es muy poco probable. Debe considerarse que en la zona del intestino donde ocurre la desconjugación catalizada por enzimas bacterianas la absorción de VPA se encuentra limitada por su importante ionización, como se ha observado en la incompleta biodisponibilidad resultante con formulaciones de liberación prolongada. En concreto, al contrario de lo reportado por la bibliografía, nuestros resultados sugieren que VPAG no sería la principal entidad vinculada a la recirculación enterohepática de VPA.

Como hipótesis alternativa, la recirculación de VPA podría estar explicada por secreción hepatobiliar del fármaco como tal hacia el intestino, desde donde sería luego reabsorbido. Watkins y Klaassen [248] cuantificaron en ratas la concentración total de VPA en bilis y en plasma, observando una relación bilis/plasma de 1,6, lo cual sugiere acumulación de VPA a nivel biliar. En línea con esto, los parámetros  $F_E$  y CL presentaron una correlación negativa, es decir que en sujetos donde una mayor fracción de VPA fue secretada y reabsorbida, la eliminación del fármaco por otras vías ocurrió a menor tasa. Esto tiene sentido ya que la excreción hepatobiliar



retira al VPA del hepatocito hacia una zona donde el metabolismo no es significativo, eludiendo la biotransformación y conduciendo a un menor CL.

Si bien el transporte de eflujo de VPA no ha sido descrito en cuanto a identificación de proteínas responsables, la transferencia hepatobiliar del fármaco podría explicarse mediante este proceso. Algunos autores referencian que los transportadores MRP están vinculados al eflujo de VPA. Se han observado en ratas diferencias en expresión hepática de esta familia de transportadores asociadas al sexo, presentando las hembras mayor magnitud [91]. Si esta diferencia estuviese presente en humanos, podría explicar la mayor recirculación observada en mujeres resultante de una mayor transferencia hepatobiliar activa.

Alternativamente, podría considerarse la glucuronidación de VPA como un proceso enzimático saturable a concentraciones obtenidas luego de administrar una dosis de 500 mg. La mayor expresión de UGT1A6 en hombres y su inducción debido a ACO evitaría la saturación de este proceso, aumentando el CL no relacionado con la recirculación. En mujeres, la saturación de la glucuronidación de VPA en hepatocitos favorecería su transferencia hacia la bilis aumentando la  $F_E$  y reduciendo el CL de biotransformación.

El efecto de los ACO podría estar relacionado a modulación hormonal, debido a la influencia de las hormonas en la expresión de enzimas y transportadores a nivel hepático [7-9]. Mujeres tomando ACO mostraron parámetros farmacocinéticos para VPA similares a hombres, incluso para el inicio de la absorción ( $T_0$ ). No se debe descartar de cualquier manera un efecto directo de los principios activos de ACO: ya sea induciendo UGT1A6 o inhibiendo competitivamente el eflujo hepatobiliar de VPA, a pesar de que no hemos encontrado reportes bibliográficos al respecto.

Finalmente, otra hipótesis puede ser elaborada considerando la acumulación de VPA en un fluido de mayor pH respecto al plasma sanguíneo que luego es vertidos al duodeno, como el jugo pancreático (pH~8,4). La secreción diaria media de este fluido hacia el duodeno es de aproximadamente 2,5 L [247]. Asumiendo equilibrio de VPA libre (5%, de acuerdo a la exposición media observada y la tendencia en UPP observada por Dutta *et al.* [225]) entre plasma y jugo pancreático y estimando la relación entre concentraciones totales tal como se realizó en el capítulo 5 para nevirapina con pH plasmático igual a 7,4, se obtiene que un 19% de la dosis administrada podría estar siendo secretada y reabsorbida en un circuito páncreas-intestino-circulación sistémica. Sumando la acumulación en bilis de acuerdo a la relación mencionada anteriormente (VPA bilis/VPA plasma = 1,6) y considerando una secreción biliar diaria de 0,8 L [44] se

obtiene una recirculación total de 31%, similar a la estimada promediando hombres<sup>#</sup> y mujeres. La diferencia entre estos subgrupos estaría dada por la mayor secreción de bicarbonato en mujeres, regulada por estrógenos [39]. Si el pH del jugo pancreático de mujeres y hombres<sup>#</sup> fuese de 8,7 y 8,1 respectivamente, la estimación de VPA recirculante sería entonces de 41 y 26% respectivamente. La diferente distribución de flujo sanguíneo en la zona esplácnica podría hacer más significativa esta diferencia.

Las hipótesis aquí planteadas respecto a los mecanismos detrás de la recirculación de VPA y sus diferencias asociadas al sexo deberán ser confirmadas en ensayos posteriores, obteniendo mayor información respecto a las transferencias desde plasma hacia jugo pancreático y bilis del principio activo. Los procesos propuestos podrían coexistir aportando fracciones a la magnitud total de fármaco recirculante.

Las diferencias en cuanto a recirculación enterohepática de VPA podrían tener implicancias clínicas. Como fue explicado para nevirapina en el capítulo anterior, periódicos reingresos de fármaco aumentan la relación entre concentración extravascular y plasmática. Padowski *et al.* [202, 250] analizaron este fenómeno justamente con VPA, concluyendo que la recirculación enterohepática aumenta el ingreso del fármaco al sistema nervioso central (SNC). El VPA ejerce su acción a nivel del SNC, por lo que este mecanismo podría tener mucho impacto en la respuesta farmacodinámica. Además, la recirculación enterohepática promueve una mayor exposición hepática-intestinal al fármaco, promoviendo quizás la incidencia de efectos adversos.

### **Datos de monitoreo terapéutico de medicamentos**

Complementando el análisis realizado sobre los datos experimentales obtenidos en voluntarios sanos, se tomaron datos provenientes de pacientes bajo terapia con VPA cuyos niveles en plasma sanguíneo fueron determinados a predosis (Cpre) en la Unidad de Monitoreo de Medicamentos del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” (UdelaR). Únicamente fueron incluidos datos experimentales de pacientes con VPA como único fármaco anticonvulsivante, de edades comprendidas entre 20 y 60 años, que presentaran una posología dividida en administraciones de una misma dosis cada 8 horas (posologías de intervalos irregulares y de 12 horas fueron excluidas). Los datos de 17 mujeres y 8 hombres se muestran en la tabla 6.3.

Hombres y mujeres reciben similares dosis (cociente hombres respecto a mujeres de 0,92), sin embargo las Cpre muestran un apartamiento mayor (cociente hombres respecto a mujeres de 0,75).

	<b>Dosis VPA (mg/kg)</b>	<b>Cpre VPA (mg/L)</b>
Hombres (N=8)	19,65 (10,35)	46,75 (11,31)
Mujeres (N=17)	21,40 (4,965)	62,50 (36,95)

**Tabla 6.3** Concentración a predosis (Cpre) para pacientes bajo terapia con VPA. Datos presentados como media (desviación estándar)

Se requeriría un mayor número de pacientes para determinar estadísticamente la significación de esta diferencia, sin embargo la tendencia observada acompaña a las conclusiones obtenidas tras analizar la farmacocinética del VPA en dosis única en voluntarios sanos: hombres presentarían un mayor CL que mujeres.

### **Conclusiones**

Ambos análisis farmacocinéticos, TS y NLME, aplicados a las observaciones de VPA en plasma sanguíneo de voluntarios sanos coincidieron en la conclusión de diferencias en CL asociadas al sexo y a la coadministración de ACO. Mujeres sin tratamiento ACO presentan significativamente menor CL para VPA respecto a hombres#. El modelo farmacocinético poblacional permitió determinar la magnitud de VPA sometida a recirculación enterohepática, añadiendo información para el análisis de las causas detrás de las diferencias observadas. Se observó en este análisis una fracción de VPA sometida a recirculación más de 2 veces mayor en mujeres sin ACO, lo cual estaría relacionado a las diferencias observadas en CL. El sexo y la terapia con ACO, por lo tanto, tienen un significativo impacto en la farmacocinética del VPA de acuerdo a los resultados obtenidos. Ambas covariables deberían ser tenidas en cuenta en la dosificación, especialmente en el caso de mujeres bajo terapia con VPA que inicien un tratamiento ACO. La diferencia hallada mediante la aplicación del modelo de recirculación a voluntarios sanos se muestra como una tendencia en las observaciones realizadas en pacientes bajo monoterapia anticonvulsivante con VPA.

El modelo farmacocinético presentado en este capítulo para describir la recirculación es coherente con el proceso fisiológico de recirculación enterohepática y mostró un buen rendimiento en la estimación de parámetros. Fue desarrollado en una versión de NONMEM anterior a la utilizada para el modelo de nevirapina descrito en el capítulo 5. La aplicación del modelo de recirculación en NONMEM 6 es más compleja y

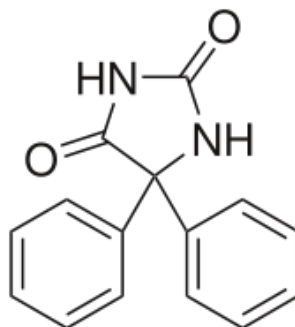
demandante computacionalmente, razón por la cual no fue detallada en el presente capítulo.

## CAPITULO 7. Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de fenitoína

---

### Introducción

Fenitoína (DFH) es un anticonvulsivante de primera línea utilizado ampliamente en el tratamiento y profilaxis de crisis convulsivas y distintos tipos de epilepsia. Se trata de un fármaco ampliamente estudiado en farmacocinética debido a su cinética no-lineal producida por un CL concentración dependiente. Más de un 95% de la dosis biodisponible es metabolizada a nivel hepático. La biotransformación es mediada principalmente por CYP2C9, con menor contribución de CYP2C19 [251]. Ambos complejos se encuentran mayormente expresados en hígado [252]. A su vez, DFH es transportado activamente por Pgp y por proteínas MRP [253, 254].



**Figura 7.1.** Estructura química de Fenitoína.

La respuesta farmacocinética de DFH ha sido estimada adecuadamente utilizando la cinética de Michaelis-Menten como modelo matemático para describir la eliminación, considerando capacidad enzimática limitada a concentraciones terapéuticas [182, 255, 256]. Sin embargo, algunas inconsistencias con este marco teórico han sido observadas y reportadas. Rojanasthien *et al.* [257] observaron una exposición lineal al fármaco frente a administraciones únicas orales de dosis de entre 100 y 300 mg. Jung *et al.* [258] también reportaron linealidad para  $C_{MAX}$  DFH tras dosis únicas orales comprendidas entre 400 y 1600 mg en seis voluntarios sanos. Tanaka *et al.* [259] publicaron un modelo poblacional considerando cinética lineal tras observar proporcionalidad para  $C_{MAX}$  tras dosis únicas. Finalmente, se ha referenciado que DFH es inductor de CYP2C9 [260], por lo que la capacidad de biotransformación limitada observada en tratamientos prolongados debería también observarse tras dosis únicas.

En nuestro grupo de investigación ha surgido una hipótesis alternativa para explicar la cinética no-lineal de DFH [67, 261]. La misma se basa en la disminución del CL de modo concentración dependiente secundaria a la

inducción de la secreción de fármaco desde la sangre hacia el intestino, desde donde es posteriormente reabsorbido. Similar a lo que fue postulado para el Ácido Valproico, la excreción hepato-biliar de DFH disminuye el CL sistémico. Esto ocurrirá para todo fármaco que presente un *clearance* hepático significativamente mayor al intestinal. En este marco, la inducción de los transportadores que median dicha secreción provocará una disminución del CL intra-individual. Estudios realizados en ratas han confirmado la inducción de Pgp y MRP2 mediada por DFH [262]. La recirculación de DFH mediante excreción hacia intestino y reabsorción, originando picos secundarios en los perfiles plasmáticos, también ha sido reportada por varios autores tanto tras dosis orales como intravenosas [263, 264]. La misma podría originarse a nivel del páncreas y del hígado, mediada por los transportadores mencionados durante la formación de jugo pancreático y bilis respectivamente. La inducción de transportadores por DFH presenta una concentración umbral: se evidencia cuando se mantienen niveles superiores y se revierte con niveles inferiores de fármaco. Esta dependencia con las concentraciones locales de fármaco se mantiene también para concentraciones inductoras: mayores niveles de fármaco en un tejido provocan en dicho sitio un mayor grado de inducción. Así, cuando concentraciones inductoras son mantenidas a nivel hepático, el CL del fármaco disminuye, aumentando la magnitud sometida a recirculación.

El mecanismo propuesto estaría asociado también a la resistencia observada para tratamientos farmacológicos, fenómeno que se observa en aproximadamente el 30% de pacientes con epilepsia [265]. Una de las hipótesis más aceptadas para explicar este fenómeno se basa en la inducción de transportadores de eflujo en el sistema nervioso central, tanto en focos epilépticos como en la barrera hematoencefálica. Esta inducción, promovida tanto por fármacos como por las propias crisis convulsivas, disminuye el ingreso de principios activos a su sitio de acción y por lo tanto a pesar de administrar mayores dosis y observar mayores concentraciones plasmáticas no se obtiene la respuesta farmacodinámica deseada.

DFH presenta buena biodisponibilidad luego de ser administrada por vía oral como comprimidos o cápsulas. Es un fármaco lipofílico (coeficiente de partición octanol/agua,  $\log P=2,47$ ) y débilmente ácido ( $pK_a=8,3$ ), por lo que su solubilidad en medio acuoso es altamente dependiente del pH. Su limitada solubilidad en medio ácido provoca una dependencia de la biodisponibilidad con la dosis administrada, lo cual puede ser evitado fraccionando la dosis [258].

El CEBIOBE realizó un ensayo clínico para comparar la disposición de DFH en voluntarios sanos en estado estacionario bajo dos tratamientos con igual velocidad media de ingreso de fármaco pero diferente frecuencia de

administración de dosis: A) 600 mg/72 horas por vía oral; y B) 100 mg/12 horas por vía oral. Este ensayo, titulado: “Ensayo clínico para demostrar la inducción de transportadores de membrana en la respuesta farmacocinética no lineal y en el desarrollo de tolerancia a la respuesta antiepiléptica durante tratamientos crónicos con fenitoína”, se llevó a cabo como un Proyecto de Iniciación a la Investigación, financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República (responsables: Silvana Alvariza, Manuel Ibarra). Se pretendía comparar la respuesta farmacocinética de DFH resultante de cada tratamiento. El tratamiento B, de modo similar que un tratamiento convencional, consiste en frecuentes administraciones destinadas a reducir la oscilación de concentraciones plasmáticas. Bajo la hipótesis planteada, este tratamiento mantendría concentraciones de DFH inductoras conduciendo a un menor CL medio. El tratamiento A, a modo alternativo, pretendía conseguir perfiles plasmáticos altamente oscilantes con el fin de provocar largos lapsos de concentraciones no inductoras y por lo tanto un CL medio mayor.

Asimismo, implementando ambos tratamientos sobre hombres y mujeres, se pretendía analizar del impacto del sexo en la farmacocinética de DFH, particularmente en cuanto a la recirculación mediada por transportadores. En este capítulo se presentarán algunos de los resultados obtenidos en el ensayo clínico, ya que un análisis completo escapa a los objetivos de la presente tesis.

### **Diseño y realización del ensayo clínico**

El ensayo clínico fue diseñado con 2 períodos (i y ii) donde los tratamientos A y B fueron administrados de acuerdo a una secuencia aleatoriamente asignada, cruzada y compensada. Cada período consistió en 10 días de administración de DFH de acuerdo a cada tratamiento, y estuvieron separados por 5 días de lavado. Las dosis fueron administradas en todos los casos con un vaso de agua, 100 mL por cada 100 mg de DFH. Para el tratamiento A, la dosis de 600 mg fue fraccionada en tres administraciones de 200 mg separadas por 2 horas, de manera de evitar una limitación en la biodisponibilidad. La primera administración de 200 mg se fijó a la hora 8:00, 30 minutos después de que los voluntarios recibieran el desayuno. Este esquema de dosificación fue repetido los días 1, 3, 7 y 10. Para el tratamiento B, las administraciones fueron a las 8 y a las 20 horas de cada día (1 al 10), 30 minutos después de ingerir desayuno y cena respectivamente.

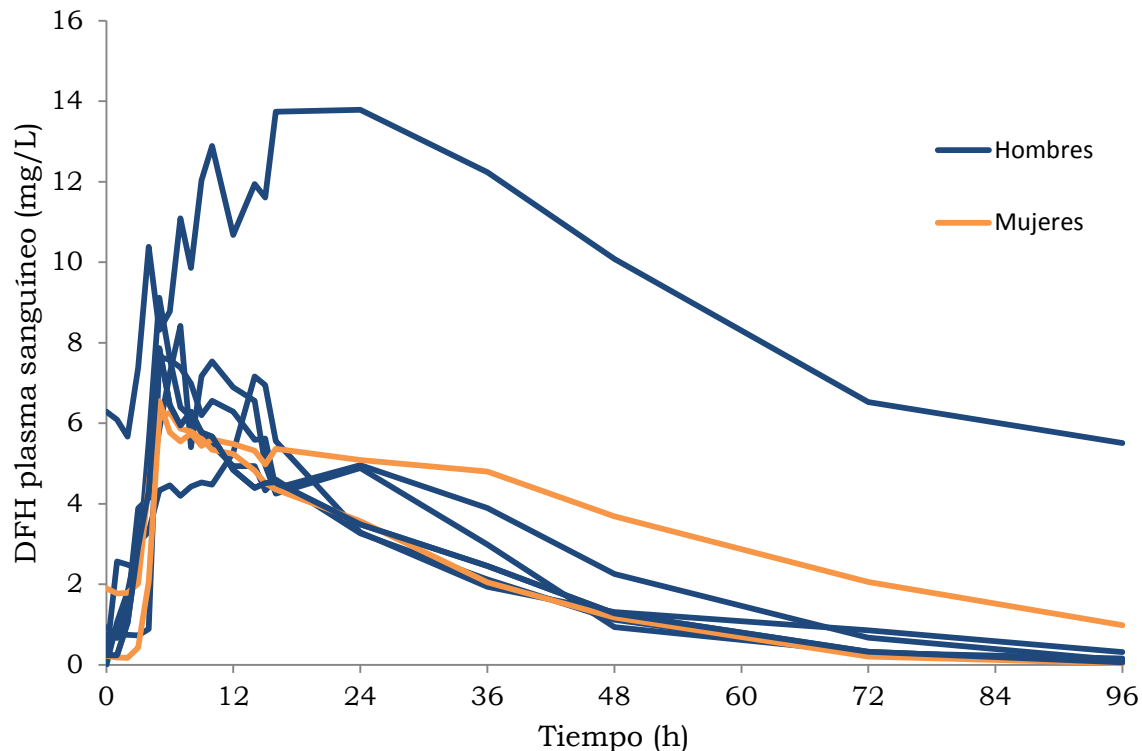
Los voluntarios participantes del ensayo fueron internados por 24 horas los días 1 y 10 de cada período, en donde fueron extraídas muestras de sangre y saliva. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de

Química (UdelaR), y los voluntarios participantes firmaron un consentimiento informado antes de participar del mismo. Las concentraciones plasmáticas y salivales para DFH y uno de los principales metabolitos, p-hidroxifenilhidantoína (p-HPPH), fueron determinadas mediante HPLC-UV de acuerdo a una técnica desarrollada y validada en el CEBIOBE.

El estudio fue llevado a cabo en dos fases (I y II), cada una con 6 voluntarios sanos (3 hombres y 3 mujeres). En la fase I se utilizó el producto Epanutin® (EP, Laboratorio Pfizer), cápsulas conteniendo DFH sódica equivalente a 100 mg de DFH. Para la fase II, debido a que el producto fue retirado del mercado local, se utilizó Comitoína® (CT, Laboratorios Roemmers) comprimidos conteniendo DFH sódica equivalente a 100 mg de DFH.

## Resultados

Durante la fase I del ensayo clínico, 4 voluntarios sanos (3 mujeres y 1 hombre) presentaron fiebre y rash cutáneo asociados a la administración de DFH en el período i. Esto obligó la exclusión de dichos voluntarios para el período ii. Únicamente dos voluntarios de sexo masculino completaron esta fase (tratamientos A y B). El hombre excluido completó el tratamiento A. Las 3 mujeres participantes completaron únicamente el tratamiento B.

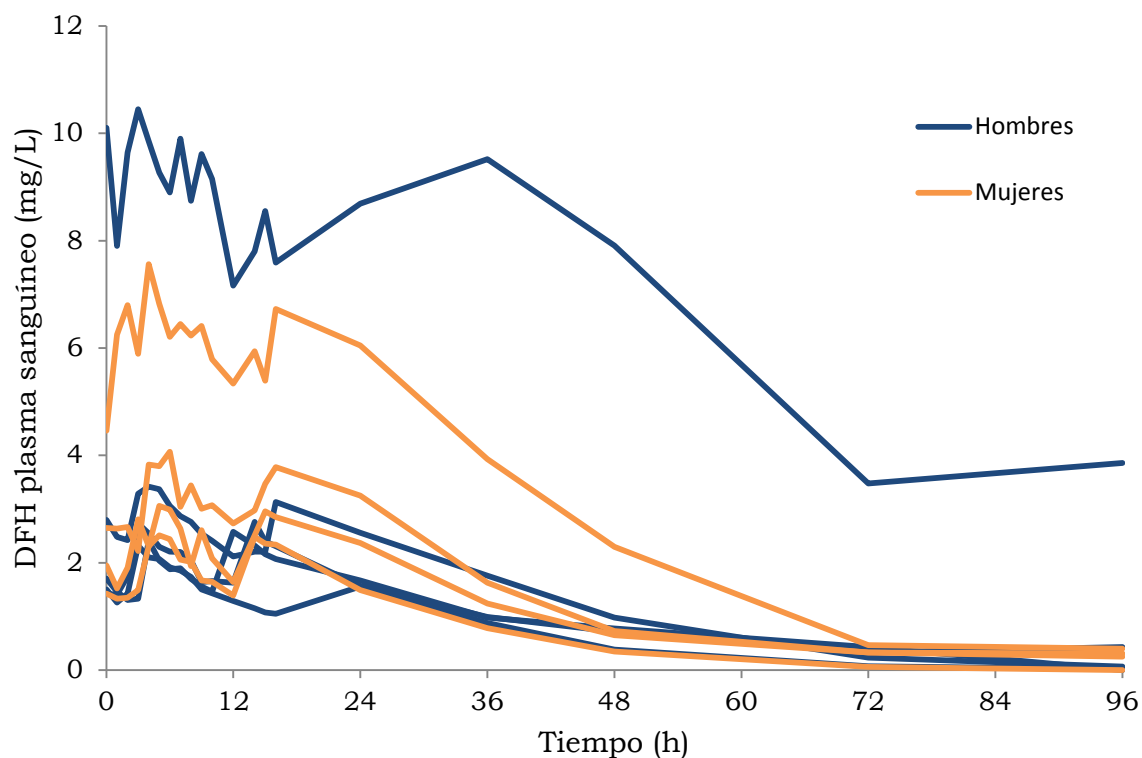


**Figura 7.2.** Perfiles farmacocinéticos de DFH en plasma sanguíneo obtenidos tras 10 días de mantenimiento del tratamiento A (600 mg cada 72 horas), para seis voluntarios masculinos y dos femeninos.



Durante la fase II, se registró el mismo evento adverso obligando a excluir a dos voluntarias mujeres, una de las cuales completó el tratamiento A, mientras que la otra no completó ningún tratamiento.

Las figuras 7.2 y 7.3 muestran los perfiles de concentraciones medias obtenidos a partir del día 10 para el tratamiento A y el tratamiento B respectivamente, identificando el sexo de cada voluntario.



**Figura 7.3.** Perfiles farmacocinéticos de DFH en plasma sanguíneo obtenidos tras 10 días de mantenimiento del tratamiento B (100 mg cada 12 horas), para cinco voluntarios masculinos y cuatro femeninos. La última dosis de DFH es administrada a las 12 horas.

En las tablas 7.1 y 7.2 se resumen los principales parámetros farmacocinéticos determinados mediante análisis no compartimental de concentraciones plasmáticas para cada voluntario participante del tratamiento A y B respectivamente.

La cinética no-lineal para DFH fue observada en tanto que el CL/F medio para el tratamiento A fue menor al obtenido mediante el tratamiento B: 0,035 L/h/kg *vs.* 0,054 L/h/kg respectivamente. Si se toman únicamente aquellos voluntarios que completaron ambos tratamientos, las diferencias fueron significativas obteniéndose una mayor  $C_{ss}$  plasmática para DFH ( $p < 0,01$ ) y p-HPPH ( $p < 0,05$ ) tras el tratamiento A. Este resultado en CL, contrario a lo esperado, se explicaría dentro de la hipótesis planteada debido a una mayor inducción de transportadores de eflujo a nivel hepatobiliar para el tratamiento A provocada por mayores concentraciones espásticas

de DFH fruto de la mayor dosis administrada. Múltiples picos en los perfiles plasmáticos fueron evidentes para ambos tratamientos. Si bien la absorción de DFH puede prolongarse significativamente en el tiempo luego de una administración oral, aumentos en la concentración plasmática para tiempos superiores a 24 horas posdosis indican la alta probabilidad de que un proceso de recirculación este teniendo lugar.

Voluntario	Epanutin (Fase I)			Comitoína (Fase II)				
	1 EP	2 EP	3 EP	1 CT	2 CT	3 CT	5 CT	6 CT
Sexo	M	M	M	M	M	M	F	F
Css (mg/L)	10,6	2,90	2,52	2,53	3,34	2,50	4,11	2,31
C <sub>MAX</sub> (mg/L)	13,8	8,42	7,16	7,86	7,65	9,12	6,55	6,28
CL/F (L/h/kg)	0,0105	0,0358	0,0381	0,0392	0,0390	0,0387	0,0349	0,0414
t <sub>1/2</sub> (h)	44,0	11,0	25,0	12,4	13,0	12,0	29,4	10,0
Css p-HPPH (mg/L)	0,0630	0,130	0,125	0,0661	0,0480	0,0720	0,0796	0,0686
CM (%)	0,597	4,48	4,96	2,61	1,44	2,88	1,94	2,97

**Tabla 7.1.** Parámetros farmacocinéticos de estado estacionario obtenidos para voluntarios sanos mediante tratamiento A con DFH (600 mg cada 72 horas). Todos los parámetros corresponden a DFH excepto la concentración media para p-HPPH. Css: concentración media de estado estacionario (AUC<sub>72/72</sub>). CM: cociente metabólico (100\*C<sub>ss</sub> p-HPPH/C<sub>ss</sub> DFH).

Voluntario	Epanutin (Fase I)					Comitoína (Fase II)			
	1 EP	3 EP	4 EP	5 EP	6 EP	1 CT	2 CT	3 CT	6 CT
Sexo	M	M	F	F	F	M	M	M	F
Css (mg/L)	7,5	1,600	4,600	1,700	1,900	1,840	3,340	1,480	1,9
C <sub>MAX</sub> (mg/L)	10,5	2,73	7,56	3,06	4,07	2,41	3,42	2,32	2,5
CL/F (L/h/kg)	0,0147	0,0649	0,0209	0,0810	0,0817	0,0539	0,03898	0,0655	0,0642
t <sub>1/2</sub> (h)	35,4	17,0	12,0	10,0	9,0	26,0	16,0	11,0	12,0
Css p-HPPH (mg/L)	0,0640	0,070	0,138	0,088	0,1180	0,0415	0,0505	0,0615	0,0543
CM (%)	0,853	4,38	3,00	5,18	6,21	2,26	1,51	4,16	2,84

**Tabla 7.2.** Parámetros farmacocinéticos de estado estacionario obtenidos para voluntarios sanos mediante tratamiento B con DFH (100 mg cada 12 horas). Todos los parámetros corresponden a DFH excepto la concentración media para p-HPPH. Css: concentración media de estado estacionario (AUC<sub>24/24</sub>). CM: cociente metabólico (100\*C<sub>ss</sub> p-HPPH/C<sub>ss</sub> DFH). C<sub>MAX</sub> corresponde a la concentración máxima para DFH registrada durante las primeras 12 horas posdosis.

Debido al reducido número final de voluntarios y a que el tratamiento afectó la disposición de DFH, el impacto del sexo no puede ser evaluado estadísticamente con los datos disponibles. Los valores individuales indican que no habría diferencias en el CL/F de DFH ni en el cociente metabólico (CM) entre hombres y mujeres.

Si bien el número de voluntarios es muy reducido, la aparición de rash cutáneo se dio principalmente en mujeres (5 de 6). Esta observación estaría en concordancia con lo planteado por Alvestad *et. al.* [266], mujeres en edad

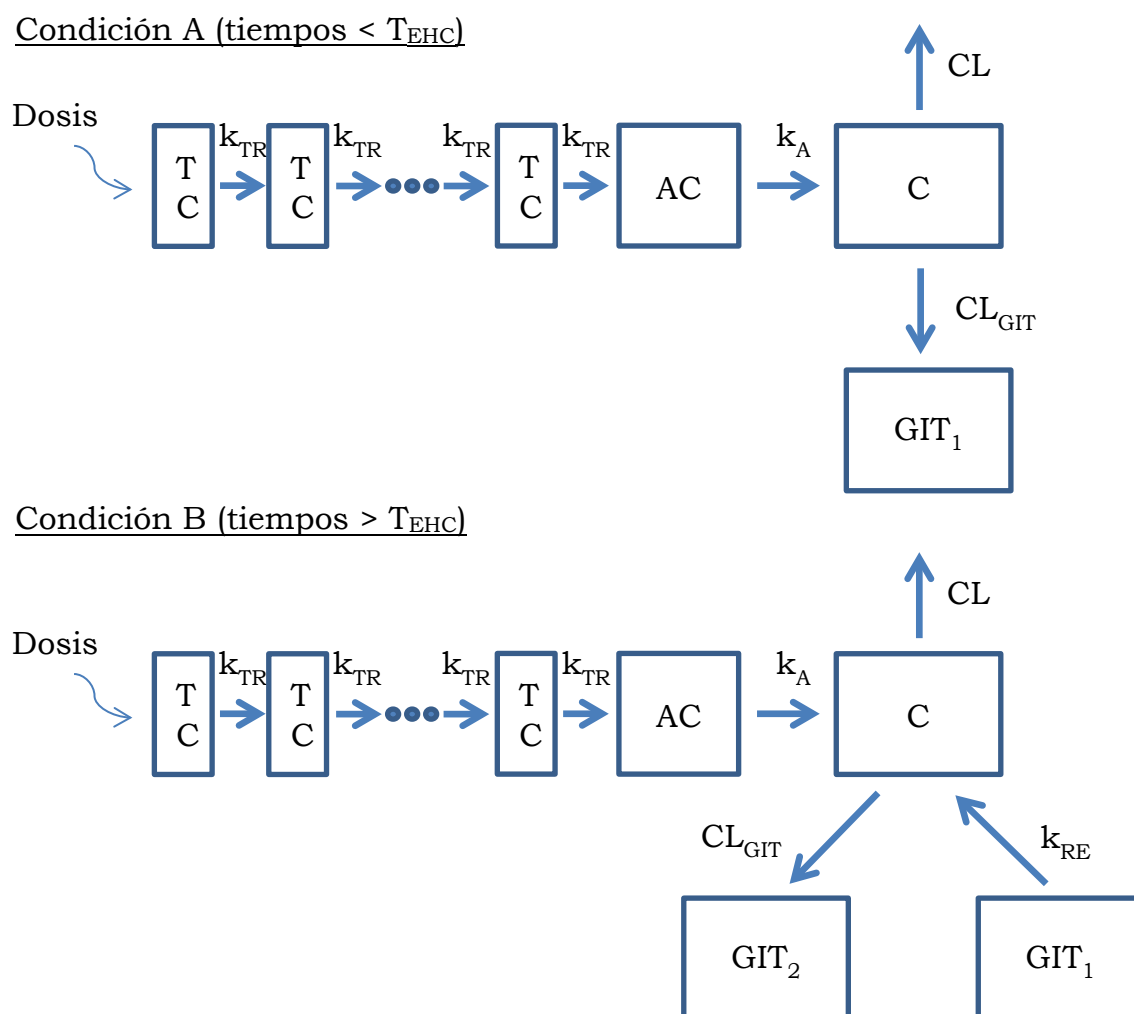
fértil están más predispuestas que hombres y mujeres posmenopáusicas a sufrir reacciones de hipersensibilidad secundarias a varios anticonvulsivantes. La mayor predisposición está dada por una contribución directa de estrógenos a formar las entidades reactivas y porque los mismos a su vez estimulan la respuesta inmune [267]. Otros factores estarían también vinculados al desarrollo de este efecto adverso pero su discusión escapa al alcance de este capítulo. Para un análisis más extenso tanto de este aspecto como de la respuesta farmacocinética a DFH referirse a la Tesis de Doctorado en Química de Silvana Alvariza [261].

### **Estimación de la magnitud de DFH vinculada a recirculación**

A modo de estimar la magnitud del proceso de recirculación de DFH, los perfiles plasmáticos obtenidos para el tratamiento A (figura 7.2) fueron analizados mediante un modelo no lineal de efectos mixtos similar al planteado en el capítulo 5 para nevirapina. Se tomaron únicamente estas observaciones (8 voluntarios) ya que permitían incluir un evento de recirculación alrededor de las 24 horas posdosis, separando el proceso de reingreso de fármaco de una posible absorción retardada de fragmentos de forma farmacéutica retenidos en el estómago. Para el tratamiento B, los perfiles de estado estacionario (figura 7.3) presentan administración a horas 0 y 12, y si bien se observan incrementos en las concentraciones plasmáticas alrededor de las 24 horas, podrían explicarse por ingresos de fármaco relacionados a la segunda administración.

El modelo farmacocinético utilizado se ilustra en la figura 7.4. En este caso, al igual que ha sido planteado por otros autores, se utilizó un modelo monocompartimental para describir la distribución de DFH en el organismo, con un compartimiento central (C) desde el cual la eliminación fue asumida de primer orden. Esta suposición fue realizada luego de verificar que la inclusión de una eliminación concentración dependiente de acuerdo a Michaelis-Menten no provocaba un superior ajuste a los datos. El ingreso de fármaco fue modelado de acuerdo a compartimientos de tránsito (TC), con transferencias de primer orden según la constante  $k_{TR}$  desde el primer TC hasta el compartimiento de absorción. Desde allí, el ingreso de primer orden a C está dado por la constante de absorción  $k_A$ . Los parámetros farmacocinéticos de absorción estimados son el número de compartimientos de tránsito ( $n$ ), el tiempo medio de residencia en todos los TC (MTT) y  $k_A$ . Los compartimientos  $GIT_1$  y  $GIT_2$  son utilizados para incluir la recirculación de DFH, su participación como sitios de acumulación (bilis/jugo pancreático) y sitios de entrega de fármaco (luz intestinal) es alternada de acuerdo a las condiciones A y B. La secreción de fármaco hacia el sitio de acumulación es modelada como una transferencia de primer orden con *clearance*  $CL_{GIT}$ .

Finalmente, el reingreso de fármaco desde GIT es considerado con una constante de primer orden  $k_{RE}$ .

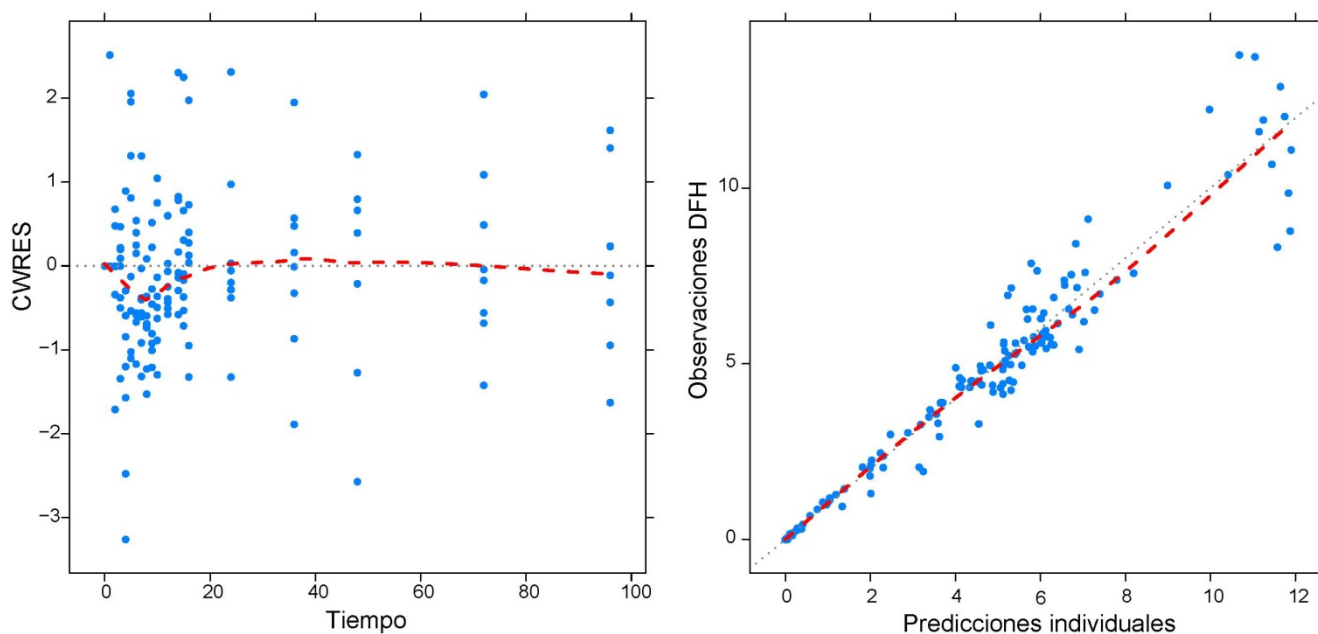


**Figura 7.4.** Modelo farmacocinético para DFH aplicado al tratamiento A (600 mg cada 72 horas).

Variabilidad interindividual (BSV) fue incluida para  $CL$ ,  $CL_{GIT}$ ,  $V_c$ ,  $k_A$  y  $MTT$ , mientras que el error residual fue incorporado mediante un modelo proporcional.

Este modelo presentó en general un adecuado ajuste a las observaciones, como se muestra en las figuras 7.5 y 7.6. Para los voluntarios 1 y 3 no se logró una buena descripción de los perfiles plasmáticos. En ambos casos se observa una prolongada absorción de DFH. El voluntario 3 presenta un ingreso lento de fármaco hasta las 10 horas donde un abrupto incremento en las concentraciones plasmáticas produce un  $T_{MAX}$  de 14 horas posdosis. Esto puede deberse a fragmentos de formulación que permanecen en estómago o primeras porciones del intestino y se disuelven con la ingesta de la cena, sumado a la posible recirculación que para ese momento no es

considerada por el modelo. Para el voluntario 1, el ingreso de fármaco parece ser más rápido ya que se observan rápidos aumentos en las concentraciones luego de cada administración de 200 mg (las tres fracciones de la dosis total). A partir de las 15 horas posdosis se registra un aumento abrupto que produce el  $T_{MAX}$  a las 24 horas. Considerando que este voluntario presentó el menor  $CL/F$ , es posible que el modelo este subestimando su  $CL_{GIT}$ , y que la magnitud recirculante sea lo suficientemente grande como para explicar el sostenimiento de concentraciones entre las 24 y 48 horas y la lenta eliminación sistémica. La tabla 7.3 muestra los resultados para la muestra de 8 voluntarios.

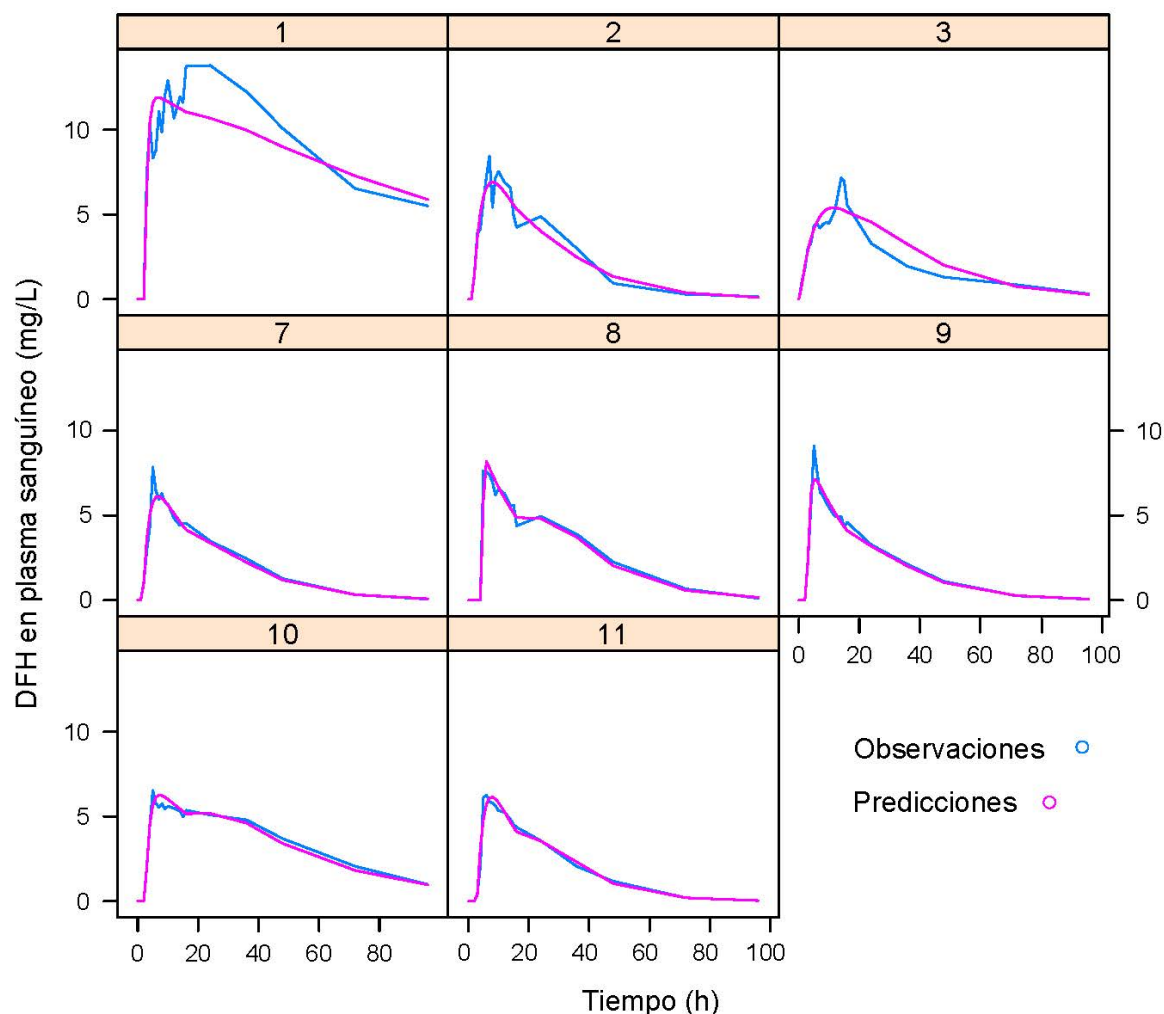


**Figura 7.5.** Gráficos de bondad de ajuste del modelo de recirculación de DFH a las observaciones del tratamiento A. Se muestran los residuales (CWRES) respecto al tiempo y las observaciones respecto a las predicciones individuales.

El modelo de absorción con compartimientos de tránsito permitió describir el ingreso de los 600 mg en tres fracciones de 200 mg. El número de compartimientos de tránsito fue fijado en 200 luego de evaluar iterativamente distintos valores.

Los parámetros farmacocinéticos mostraron una elevada variabilidad interindividual. El  $CL$  estimado es similar al obtenido por Tanaka *et al.* [259] quienes modelaron la eliminación de DFH de acuerdo a una cinética de primer orden en voluntarios sanos arribando a un valor de 1,61 L/h para un voluntario típico de 60 kg. El  $CL_{GIT}$  para el total de voluntarios representó un 43,6% del *clearance* total ( $CL+CL_{GIT}$ ), por lo que una importante magnitud de la dosis biodisponible sufre recirculación de acuerdo al modelo propuesto. El evento incluido, estimado para 21,5 horas posdosis,

representaría varios procesos de reingreso que se dan a tiempos posteriores y que explican el mantenimiento (o aumento) de las concentraciones de DFH.



**Figura 7.6.** Predicciones individuales para los perfiles plasmáticos de DFH obtenidos en estado estacionario de 600 mg cada 72 horas. La última administración se registra a las 4 horas (última fracción de 400 mg). Las voluntarias mujeres corresponden a los números 10 y 11.

El AIC obtenido para este modelo fue de 7,97. El modelo análogo pero sin recirculación de DFH obtiene para los mismos datos un AIC de 37,2, reflejando la significativa mejora en la descripción de datos que se obtiene al incluir este proceso. Finalmente, el modelo análogo, sin recirculación y modelando la eliminación de acuerdo a una cinética de Michaelis-Menten obtiene un AIC de 12,6, también con peor resultado. Para este modelo los valores de  $V_{MAX}$  y  $K_m$  estimados fueron de 18,2 mg/h 5,09 mg/L.

Los resultados presentados en este análisis demuestran que el mecanismo de recirculación de DFH puede explicar los perfiles plasmáticos obtenidos de similar o mejor manera que la teoría de capacidad enzimática limitada. La

auto-inducción de la recirculación, como hipótesis alternativa a la saturación del metabolismo, explicaría la cinética no-lineal de DFH observada en la práctica, resolviendo las inconsistencias reportadas en la literatura científica.

<b>Parámetro</b>	<b>Tendencia media</b>	<b>BSV (%)</b>
$k_A$ ( $h^{-1}$ )	0,775	176
MTT (h)	1,90	91,2
$n$	200	-
$V_C$ (L) <sup>a</sup>	61,1	16,6
CL (L/h) <sup>a</sup>	1,22	128
CL <sub>GIT</sub> (L/h) <sup>a</sup>	0,942	104
$k_{RE}$ ( $h^{-1}$ )	0,261	-
T <sub>EHC</sub> (h)	21,5	-
Error residual proporcional (%)	15,5	-

**Tabla 7.3.** Estimaciones de parámetros farmacocinéticos para DFH según el modelo propuesto. Los valores de *clearance* y volúmenes informados son en realidad aparentes ya que se desconoce la biodisponibilidad de las formulaciones ensayadas. <sup>a</sup>CL, CL<sub>GIT</sub> y  $V_C$  son estimadores típicos para un individuo con peso corporal igual a 70 Kg.

Respecto al sexo, las dos mujeres analizadas con este modelo (voluntarios 10 y 11) presentaron valores de CL<sub>GIT</sub> superiores a la media (1,8 y 2,2 L/h respectivamente).

## Conclusiones

La farmacocinética no-lineal que presenta DFH, atribuida a una capacidad de metabolización limitada a concentraciones terapéuticas, podría estar relacionada al proceso de recirculación mediado por transportadores de eflujo que son inducidos por el fármaco de modo concentración-local dependiente. Una significativa fracción de DFH, 43,6%, fue estimada como participante del proceso de recirculación en estado estacionario de un tratamiento de 600 mg administrados cada 72 horas.

No fue posible realizar un análisis estadístico del impacto del sexo sobre la absorción y disposición de DFH debido a que varios voluntarios debieron ser excluidos del ensayo clínico. Se registró una elevada incidencia de rash cutáneo, evento adverso asociado a DFH, especialmente para mujeres (5 en 6 respecto a 1 en 6 para hombres). Esto podría estar relacionado a la estimulación del sistema inmune mediada por estrógenos y a una

contribución directa de estradiol en la formación de la entidad reactiva que desencadena la reacción dérmica.



## **CAPITULO 8. Influencia del sexo en la respuesta farmacocinética de los medicamentos: conclusiones generales.**

---

La investigación realizada en la presente tesis agrega evidencias respecto al impacto del sexo en la absorción y disposición de principios activos. Dentro del sistema en el cual se produce la respuesta farmacocinética, formado por la interacción organismo-medicamento, el sexo introduce una dualidad para el primer componente que debe ser considerada a la hora de analizar e interpretar resultados.

Debido a sus diferencias fisiológicas, hombres y mujeres presentan distinto entorno para el desempeño biofarmacéutico de un medicamento administrado por vía oral. De acuerdo a las características del producto, del principio activo y de las condiciones de administración, la influencia de dichas diferencias en la biodisponibilidad puede hacerse evidente. Esta temática fue abordada en los capítulos 2 a 4 haciendo énfasis sobre su impacto en la bioequivalencia promedio.

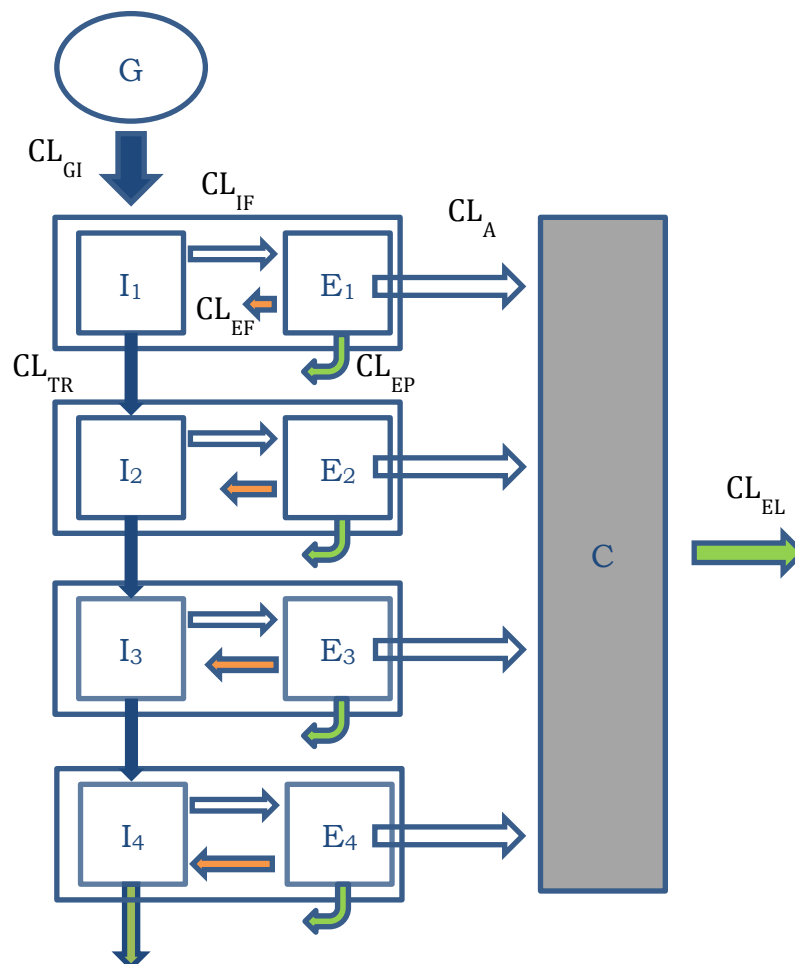
La disposición de principios activos también puede verse afectada por el sexo. En este sentido se analizaron observaciones para nevirapina (capítulo 5) y ácido valproico (capítulo 6) mediante modelos no lineales de efectos mixtos introduciendo un proceso de disposición muchas veces desestimado, la recirculación. Los datos permitieron desarrollar un modelo farmacocinético fisiológicamente coherente que puede ser aplicado al análisis de este fenómeno en la respuesta de otros principios activos.

Este capítulo agrupa las conclusiones obtenidas para las dos principales áreas abordadas, incluyendo consideraciones generales que pueden ser extrapoladas para otros principios activos de acuerdo a características fisicoquímicas.

### **Sexo y bioequivalencia promedio**

La principal desventaja de la bioequivalencia promedio reside en que las inferencias son realizadas en base a parámetros medios de la muestra de sujetos. Aun siendo representativa de la población en estudio, el promediado de datos puede esconder significativas diferencias entre subgrupos conduciendo a resultados de menor valor predictivo. Por esto, se debe tener especial cuidado con aquellas covariables que, fraccionando a la población, produzcan efectos opuestos sobre el cociente T/R. El sexo de los sujetos determina características gastrointestinales con alta probabilidad de tener significancia en la biodisponibilidad oral, por lo que es una covariable

altamente relevante en estudios de bioequivalencia. El análisis de la respuesta farmacocinética en hombres y mujeres por separado aumenta el valor informativo de las observaciones al considerar las diferencias fisiológicas que pueden provocar cada respuesta.



**Figura 8.1.** Modelo farmacocinético ilustrando la absorción oral de principios activos. Las flechas verdes corresponden a eliminación de fármaco, las naranjas a transporte activo de eflujo con cinética saturable, las blancas a transferencias pasivas con cinética de primer orden y las azules a transferencias de la forma farmacéutica a lo largo del tracto gastrointestinal. El mismo es dividido en un compartimento gástrico (G), y 4 micro-modelos bicompartimentales incluyendo lumen intestinal (I) y enterocitos+hepatocitos (E). El plasma y los órganos interiores son comprendidos en el compartimento C, desde donde ocurre la eliminación sistémica con *clearance*  $CL_{EL}$ .

El modelo de la figura 8.1 pretende hacer énfasis en distintos procesos vinculados a la absorción oral: 1) *clearance* de ingreso de fármaco (disuelto) a la primer porción del intestino ( $CL_{GI}$ ), considerando ingreso de fármaco ya disuelto desde el estómago y disolución en intestino desde fragmentos de medicamento que puedan atravesar el píloro; 2) ingreso a las células que se interponen entre el medio externo y medio interno que podemos llamar influjo ( $CL_{IF}$ ), aun cuando no necesariamente esté mediado por

transportador de membrana; 3) expresión diferencial del transporte de eflujo a lo largo del intestino, dividiendo el mismo en 4 zonas (micro-modelos bicompartimentales) en donde la actividad, marcada por el *clearance*  $CL_{EF}$ , aumenta de la zona 1 a la 4; 4) eliminación presistémica, con *clearance*  $CL_{EP}$ , representando el conjunto de procesos de biotransformación que tienen lugar antes de que el fármaco arribe a la circulación sistémica (eliminación en enterocito y hepatocito es incluida en  $CL_{EP}$  a fin de simplificar el modelo); 5) *clearance* de tránsito a lo largo de la luz intestinal ( $CL_{TR}$ ) ;y 6) ingreso de fármaco a la circulación sistémica con velocidad proporcional a la concentración del mismo en el compartimiento E ( $C_E$ ), dado el *clearance* ( $CL_A$ ) constante que supone esta cinética.

En este modelo, la fracción de dosis biodisponible (F) está dada por:

$$F = F_A * F_{EP}$$

Siendo  $F_A=(1-E_A)$ , donde  $E_A$  corresponde a la fracción de fármaco no disuelta más la fracción de fármaco disuelta pero excretada con las heces y  $F_{EP}=(1-E_{EP})$ , donde  $E_{EP}$  corresponde a la fracción biotransformada a nivel presistémico (enterocito e hígado).

Debido a la naturaleza saturable de los procesos enzimáticos, las concentraciones provocadas post-administración en los compartimientos I y E son determinantes en la magnitud de  $E_{EP}$  para fármacos sustratos de enzimas y transportadores de eflujo a nivel hepático e intestinal. Siendo  $K_{mEP}$  la concentración de fármaco en E ( $C_E$ ) a la cual la velocidad de eliminación presistémica es la mitad de la velocidad máxima del proceso, se diferencian dos situaciones:

- $C_E \gg K_{mEP}$ : la velocidad de eliminación presistémica sigue una cinética de orden cero, compitiendo con la velocidad de absorción de primer orden ( $CL_A$  constante) de un modo que podría desprejarse, en virtud del descenso hiperbólico que experimenta el  $CL_{EP}$ , y por tanto  $F_{EP} \sim 1$ .
- $C_E \sim K_{mEP}$ : la velocidad de eliminación presistémica sigue una cinética de primer orden, compitiendo con la absorción de un modo apreciable y por tanto  $F_{EP} < 1$ .

Es evidente la importancia de  $C_E$  en el destino de la dosis administrada. Esta concentración es función de los siguientes factores: transporte de eflujo,  $CL_{GI}$  y  $F_A$ .

La división del tracto gastrointestinal en fragmentos bicompartimentales es realizada para dimensionar el efecto del aumento en la expresión y actividad de Pgp hacia zonas distales. Se toma este transportador como referencia ya que su expresión se encuentra bien documentada y es concordante con los

resultados obtenidos. Los transportadores de eflujo trabajan de modo cooperativo con los complejos enzimáticos presentes en enterocitos al disminuir  $C_E$  y prolongar el tiempo de residencia del fármaco sustrato en la luz intestinal mediante múltiples ciclos de ingreso-eflujo. Una mayor velocidad de eflujo disminuye progresivamente entonces la absorción de sustratos a lo largo del intestino, pudiéndose asociar a menores magnitudes de  $F$ . A la vez, una mayor velocidad de tránsito a lo largo del intestino (proceso expresado mediante  $CL_{TR}$ ) conduce a una más rápida progresión de la dosis hacia zonas de mayor  $CL_{EF}$ , y consecuentemente a una menor  $F_A$ .

Por supuesto que la actividad del transportador es también susceptible de saturación, y probablemente por esto no tengan un alto impacto en la biodisponibilidad aquellos transportadores expresados mayormente en zonas proximales al píloro, como MRP2. Sin embargo la presencia de eflujo a lo largo del intestino tiene finalmente un gran impacto sobre la velocidad de absorción aparente al aumentar significativamente la capacidad de eliminación presistémica y enlentecer tanto los procesos de eliminación como de ingreso de fármaco. Principios activos que no son sustratos de transportadores de eflujo generalmente poseen  $F \sim 1$ . Esto fue observado para efavirenz (EFV) y nevirapina (NVP).

Los resultados de los diferentes ensayos realizados en esta tesis, sumados a reportes bibliográficos, permiten concluir las siguientes diferencias hombre-mujer en cuanto a fisiología gastrointestinal:

**A. pH gástrico: Hombres < Mujeres.** Observado con:

- i. Ritonavir (RTV): las leves diferencias observadas *in vitro* a pH 4,5 se reflejaron *in vivo* para mujeres, tanto en ayunas como bajo presencia de alimentos. En condiciones de ayuno, esta diferencia tuvo impacto en la biodisponibilidad de Lopinavir (LPV). No fue así bajo presencia de alimentos ya que la solubilidad de ambos activos estaría significativamente aumentada. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos para RTV en mujeres bajo condiciones de ayuno son coherentes con un ingreso lento al torrente circulatorio, limitado por la solubilidad del activo en fluidos gastrointestinales. En hombres, la interrupción de la absorción en perfiles plasmáticos más agudos, dada la mayor velocidad de disolución de RTV, se reflejó en una  $C_{MAX}$  más variable.
- ii. NVP: la mayor  $C_{MAX}$  para hombres fue reflejo de una mayor velocidad de disolución en estómago para este fármaco débilmente básico.

**B.  $CL_{GI}$ : Hombres>Mujeres.** Hombres presentan menor tiempo de vaciado gástrico respecto a mujeres. Característica acentuada en condiciones de ayuno. Observado con:

- i. Ciclosporina A (CyA): en la mayor cantidad biodisponible registrada en hombres luego de recibir CyA bajo solución oral, y en los diferentes  $T_{MAX}$  observados para cápsulas de gelatina blanda Test y Referencia en el estudio del CEBIOBE, correlacionados con los tiempos de apertura de cada producto.
- ii. Ácido Valproico (VPA): en el menor tiempo de latencia obtenido para la formulación Referencia de liberación retardada.

**C.  $CL_{TR}$ : Hombres>Mujeres.** Observado con:

- i. EFV: las diferentes condiciones poscomida generaron una diferente absorción de EFV desde los productos Test y Referencia en hombres, pero no en mujeres. Luego de una ingesta de alimentos, los hombres vuelven más rápidamente a condiciones de ayuno gracias a un mayor peristaltismo intestinal.
- ii. LPV/r: el más rápido tránsito intestinal en hombres pudo ser la causa de la mayor variabilidad registrada en el estudio CEBIOBE para los parámetros farmacocinéticos de LPV y RTV, y para la mayor variabilidad observada en el estudio en ayunas para RTV en  $C_{MAX}$ , donde hombres llevarían la dosis más rápidamente hacia zonas de limitada absorción, ya sea por el mayor pH (que disminuirá  $CL_{IF}$ ) como por el aumento de  $CL_{EF}$ .

Generalmente, dar la dosis tras una ingesta de alimentos reducirá las diferencias hombre-mujer para el pH gástrico y para el tiempo de residencia en estómago, emparejando y reduciendo el  $CL_{GI}$ . Además, para fármacos de baja solubilidad en medio acuoso (clase BCS II y IV), aumentará significativamente la  $F_A$ , debido a la secreción biliar, promoviendo un aumento de disolución y eventualmente la saturación de transportadores y enzimas.

Bajo el modelo de la figura 8.1, podrían describirse algunas situaciones para las cuales sea esperable una diferente biodisponibilidad entre sexos. Fármacos sustratos de Pgp con un significativo metabolismo presistémico presentarán una mayor dependencia de  $F$  con  $CL_{GI}$ ,  $CL_{TR}$  y con la velocidad de disolución. Cuando la disolución es elevada, el impacto de  $CL_{GI}$  y  $CL_{TR}$  será menor ya que  $C_E \gg K_{MEP}$ . En este caso las diferencias hombre-mujer podrían obtenerse en velocidad de ingreso, impactando en  $C_{MAX}$  y  $C_{MAX}/AUC$ . Con reducida disolución, la biodisponibilidad estará favorecida con menor  $CL_{TR}$ . Diferentes velocidades de disolución en hombres y mujeres se originarían por los valores de pH gástrico y volumen de fluidos (mayor en

hombres). Para bioequivalencia, los productos que difieran en su perfil de disolución de acuerdo al pH del medio podrán presentar diferentes biodisponibilidades en hombres y mujeres. Los fármacos de clase II y IV en BCS son probablemente los más sensibles a estas diferencias.

Fármacos que no son sustratos de Pgp presentaran biodisponibilidad menos dependientes de la velocidad de disolución, del  $CL_{GI}$  y del  $CL_{TR}$ . Diferencias entre hombres y mujeres solo serían en base a la velocidad de absorción, y no a cantidad absorbida. Estos fármacos generalmente son de clase I y III BCS. Bases débiles probablemente se disuelvan más rápidamente en hombres, como NVP, donde se observó un  $C_{MAX}$  significativamente mayor para este subgrupo. Ácidos débiles serían afectados por  $CL_{TR}$  si la absorción se prolonga en el intestino, ya que el  $CL_{IF}$  irá disminuyendo debido a la ionización por el aumento en el pH. Esto debería considerarse para formulaciones de liberación prolongada, donde el mayor  $CL_{TR}$  de hombres podría disminuir la cantidad biodisponible.

Para los ensayos de bioequivalencia, los perfiles de disolución *in vitro* obtenidos en medios biorrelevantes son fundamentales para predecir el posible resultado global y por sexo. Aún para fármacos de baja solubilidad, realizar el ensayo de disolución previo al ensayo *in vivo* aportará información muy relevante, por lo que es recomendable su implementación.

Las diferencias hombre-mujer pueden introducir una interacción en la discriminación de productos farmacéuticos en ensayos de bioequivalencia. En esta tesis fue observado para LPV en ayunas y RTV bajo presencia de alimentos administrados como LPV/r, para CyA tras administración de cápsulas de gelatina blanda bajo presencia de alimentos y para EFV administrado 2 horas luego de una cena. Este efecto debe ser analizado en todos los estudios de bioequivalencia promedio para aumentar la potencia del ensayo: la bioequivalencia debería ser comprobada tanto en hombres como en mujeres. Para esto, en el diseño del ensayo clínico deben introducirse las siguientes consideraciones:

- i. La muestra de voluntarios debe ser representativa de la población. Hombres y mujeres deben ser reclutados en cantidades aproximadamente iguales, y preferentemente en número par para realizar el ANOVA compensado intra-sexo y obtener estimadores de tendencia media y variabilidad en cada sexo y para cada producto.
- ii. Las secuencias de administración deben estar compensadas intra-sexo. Para el ensayo de CyA soluciones orales, el análisis de bioequivalencia por sexo estuvo imposibilitado por la descompensación estadística. Puede haber un efecto del período

en el estudio de bioequivalencia específicamente para mujeres, debido al ciclo hormonal y su efecto sobre la fisiología. La compensación de secuencias intra-sexo aumentará la probabilidad de que ambos productos sean afectados de modo similar.

- iii. La realización del ensayo en condiciones de ayuno o bajo presencia de alimentos debe mantenerse en la indicación de prescripción, ya que puede acentuar u ocultar diferencias entre hombres y mujeres.

Finalmente, son muchos los ejemplos donde el sexo femenino no es incluido en estudios de bioequivalencia bajo la hipótesis de que conlleva a una mayor variabilidad residual en los parámetros farmacocinéticos globales. Si se realiza un análisis de la variabilidad residual por parámetros en 9 estudios de bioequivalencia presentados, las siguientes diferencias significativas y tendencias fueron observadas:

- AUC
  - LPV y RTV poscomida: tendencia para una mayor variabilidad residual en hombres.
  - CyA poscomida (cápsulas de gelatina blanda): mayor variabilidad residual en hombres.
  - EFV en ayunas: tendencia para una mayor variabilidad residual en mujeres.
  - NVP poscomida: mayor variabilidad residual en mujeres.
- $C_{MAX}$ 
  - RTV en ayunas: mayor variabilidad en hombres.
  - CyA en ayunas (estudio CEBIOBE): tendencia para una mayor variabilidad residual en mujeres.
  - CyA poscomida: mayor variabilidad residual en hombres.
  - NVP poscomida: mayor variabilidad residual en mujeres.
- $C_{MAX}/AUC$ 
  - RTV poscomida: mayor variabilidad en hombres.
  - CyA cápsulas de gelatina blanda: mayor variabilidad en hombres, tanto en ayunas como poscomida. Estudios realizados en Canadá.
  - NVP poscomida: mayor variabilidad en mujeres.

De esto se desprende que no necesariamente se debe esperar mayor variabilidad de la respuesta farmacocinética en mujeres. Para fármacos sustratos CYP3A4 y Pgp, en general una mayor variabilidad fue encontrada para el sexo masculino, tanto en velocidad de ingreso como en exposición total.

## **Sexo y disposición de fármacos**

Las siguientes diferencias fueron encontradas:

- CyA: mayor semivida de eliminación en mujeres. Probablemente debido a un mayor volumen de distribución. Esta diferencia podría estar presente en fármacos altamente lipofílicos.
- VPA: menor CL en mujeres y mayor recirculación enterohepática. Mujeres bajo terapia oral anticonceptiva (etinilestradiol y drospirenona) muestran un aumento en CL y disminución de la cantidad recirculante, acercando estos parámetros a los observados en hombres.

El efecto de una mayor distribución de flujo sanguíneo hacia la región esplácnica en mujeres puede haber estado presente en la disposición de VPA, provocando mayor recirculación, y de NVP, emparejando las diferencias que habría en la cantidad secretada dada la mayor secreción de ácido clorhídrico en hombres.

Para fármacos sustratos de CYP3A4 y Pgp, las diferencias en la expresión de cada proteína (hombres menor expresión CYP3A4 y mayor Pgp) compensarían los efectos individuales sobre la disposición, ya que no se observaron diferencias significativas para CyA ni LPV/r en este sentido.

## **Recirculación de fármacos**

Durante la presente tesis se analizó el proceso de recirculación de fármacos como fenómeno de disposición significativo dentro de la respuesta farmacocinética. Determinadas características de un principio activo pueden provocar que sea secretado desde el plasma hacia un sitio de acumulación, para ser posteriormente transferido al intestino, desde donde será reabsorbido hacia la circulación sistémica. Es muy probable que la secreción hacia el intestino por diversas rutas se encuentre en una gran cantidad de fármacos, pero que para muchos la reabsorción no sea significativa debido a un alto metabolismo intestinal, que a bajas concentraciones no estaría saturado pudiendo contribuir a la eliminación sistémica. Las posibles rutas son: secreción hepatobiliar (recirculación enterohepática), secreción hacia el fluido gástrico (importante para fármacos básicos) y secreción hacia el jugo pancreático (fármacos ácidos). En el primer y tercer caso, la secreción estaría favorecida por transportadores de eflujo (para sustratos), pudiendo aparecer diferencias entre hombres y mujeres en la magnitud de fármaco biodisponible sometida al proceso de acuerdo a la expresión de dichas proteínas.



Durante la presente tesis, se desarrolló un modelo farmacocinético para describir el proceso de recirculación con un mecanismo coherente con la fisiología. El desarrollo y la aplicación del mismo se realizaron mediante modelos no lineales de efectos mixtos permitiendo cuantificar parámetros vinculados a la recirculación, así como una más precisa cuantificación de los parámetros farmacocinéticos vinculados a la disposición.

El impacto de los procesos de recirculación sobre la respuesta farmacocinética y farmacodinámica puede llegar a ser muy significativo. Para VPA, se mostró como la secreción hepatobiliar incrementada en mujeres puede disminuir el *clearance* hepático. Para DFH, se demostró que una autoinducción de este proceso podría explicar matemáticamente la cinética no-lineal. Para NVP, se describieron adecuadamente las observaciones incluyendo este proceso, el cual nunca había sido considerado dentro de su respuesta farmacocinética. Los ciclos de reingreso pueden aumentar las concentraciones espláncicas y, al provocar aumentos periódicos en la concentración arterial, aumentar también la transferencia de fármaco hacia sitios periféricos. Estas características podrían explicar ciertas respuestas farmacodinámicas.

### **Hombres, mujeres y medicamentos, conclusiones finales**

El sexo como covariable afectará la respuesta farmacocinética en una gran cantidad de fármacos. Sin embargo para muchos de ellos el resultado de distintos efectos puede compensarse haciendo que no se observen diferencias o bien las mismas podrían no ser tan drásticas como para provocar consecuencias farmacodinámicas. El impacto del sexo es bastante complejo como para realizar una simplificación de factores que, presentes en un medicamento, contribuyan a su significancia farmacocinética. Es por lo tanto recomendable que el análisis sea realizado caso por caso, tanto para el efecto en bioequivalencia como para la farmacocinética clínica. De cualquier manera, los diferentes análisis realizados en esta tesis pueden agregar información para entender o predecir el impacto del sexo al analizar la farmacocinética y/o farmacodinamia de otros medicamentos, y contar con información para la dosificación de medicamentos aquí incluidos a fin de llegar a tratamientos seguros y eficaces para la población.

## Agradecimientos

---

Realizar esta tesis de Doctorado me permitió establecer relaciones de trabajo y amistad con muchos compañeros. Por las enseñanzas y las aventuras, les agradezco mucho.

A Sil, por tu ayuda, amor y apoyo, siempre.

A Andrés Fagiolino, Cecilia Maldonado, Leticia Caligaris, Federico Mutilva, Camilo Bentancur, Lil Santisteban y Beatriz González, compañeros durante mis primeros años en la Unidad de Monitoreo y en el CEBIOBE cuando todo era un inicio. Llevo sus enseñanzas conmigo.

A mis Profesores, Marta Vázquez y Pietro Fagiolino, en quienes siempre encontré tiempo y dedicación. Por su total apoyo y su confianza para dejarme tomar mi camino, tener mis errores, y estar siempre disponibles para una charla.

A Rosa Eiraldi, por el cariño y la disposición a ayudarme desde que entré al Área. A Laura Magallanes, Marianela Lorier, Natalia Guevara, Lucía Castellano, Victor Bello y Micaela Vigna, por sus contribuciones, voluntad y alegría día a día.

Al Dr. Hartmut Derendorf por su invitación para realizar una pasantía en el Departamento de Farmacéutica de la Universidad de Florida (EEUU), y por sus contribuciones a la tesis.

Al equipo de All Química Ltda., participantes esenciales de todos los ensayos clínicos contenidos en esta investigación.

Fuera del ámbito académico son muchos los que de una manera u otra siento que contribuyeron.

A mis padres, Laura y Jorge, por habernos enseñado todo y dar todo por nosotros. A Juan y Martín, los mejores hermanos que podría imaginar. A mis abuelos, por su alegría y emoción.

A los hermanos de la vida: Matías, Joaquín, Nico, Juan Diego, Marcos; siempre presentes.

A la familia, al Cienfar FdeC, a las Bombas y a la escuela, por acompañar siempre.

Y a los amigos extranjeros que pude conocer gracias a esta tesis: Chris, Henry, Tanja, Josi, Eric, Virat, Katherine, Sandra, Stefanie, Matthias, Sherwin y Felipe.

## Referencias

---

1. Holford N. (2006). Dose Response: Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Approach. En N Ting (Ed.), *Dose Finding in Drug Development* (pp. 73–88). Springer New York.
2. Benet L. (1984). Pharmacokinetics: Basic Principles and Its Use as a Tool in Drug Metabolism. En JR Mitchell & MG Horning (Eds.), *Drug Metabolism and Drug Toxicity* (pp. 199–211). Raven Press, New York.
3. Klotz U, Avant GR, Hoyumpa A, Schenker S, Wilkinson GR. (1975). The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *The Journal of Clinical Investigation*, 55(2):347–359.
4. Ette EI, Williams PJ. (2004). Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *The Annals of Pharmacotherapy*, 38(10):1702–1706.
5. Burgoyne PS, Wolf U, Ferguson MWJ. (1988). Role of Mammalian Y Chromosome in Sex Determination. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 322(1208):63–72.
6. Larney C, Bailey TL, Koopman P. (2014). Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development*, 141(11):2195–205.
7. Waxman D, Chang T. (1995). Hormonal regulation of liver cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450*.
8. Waxman DJ, O'Connor C. (2006). Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Molecular Endocrinology*, 20(11):2613–2629.
9. Waxman D, Holloway M. (2009). Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular Pharmacology*, 76(2):215–228.
10. Kruijver F, Swaab D. (2002). Sex hormone receptors are present in the human suprachiasmatic nucleus. *Neuroendocrinology*, 296–305.
11. Smirnov AN. (2009). Hormonal mechanisms of sex differentiation of the liver: the modern conception and problems. *Russian Journal of Developmental Biology*, 40(5):264–282.
12. Eiraldi R, Fagiolino P. (2012). Epilepsia catamenial vista como una adaptación mórbida. *Revista Farmacéutica*, 154(1):93–102.

13. Case A, Paxson C. (2004). *Sex differences in morbidity and mortality. Demography*. Cambridge, MA.
14. Schmucker D, O'Mahony M, Vessel E. (1994). Women in clinical drug trials: An Update. *Clinical Pharmacokinetics*, 27(6):411–417.
15. Merkatz R, Temple R, Sobel S. (1993). Women in Clinical Trials of New Drugs--A Change in Food and Drug Administration Policy. *The New England Journal of Medicine*, 329(4):292–296.
16. Vidaver R, Lafleur B. (2000). Women subjects in NIH-funded clinical research literature: lack of progress in both representation and analysis by sex. *Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine*, 9(5):495–504.
17. Geller S, Adams M, Carnes M. (2006). Adherence to federal guidelines for reporting of sex and race/ethnicity in clinical trials. *Journal of Women's Health*, 15(10):1123–1131.
18. Geller S, Koch A. (2011). Inclusion, analysis, and reporting of sex and race/ethnicity in clinical trials: have we made progress? *Journal of Women's Health*, 20(3):315–320.
19. Beery AK, Zucker I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(3):565–72.
20. Instituto Nacional de Estadística. (2013). *Uruguay en Cifras* (p. 130).
21. Parekh A, Fadiran EO, Uhl K, Throckmorton DC. (2011). Adverse effects in women: implications for drug development and regulatory policies. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 4(4):453–66.
22. Ofotokun I, Pomeroy C. (2003). Sex differences in adverse reactions to antiretroviral drugs. *Topics in HIV Medicine*, 11(2):55–9.
23. Miller M. (2001). Gender-based differences in the toxicity of pharmaceuticals—the Food and Drug Administration's perspective. *International Journal of Toxicology*, 20:149–152.
24. Anthony M, Berg M. (2002). Biologic and molecular mechanisms for sex differences in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics: Part I. *Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine*, 11(7):601–615.
25. Wells JCK. (2007). Sexual dimorphism of body composition. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(3):415–30.

26. Ley CJ, Lees B, Stevenson JC. (1992). Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(5):950–954.
27. Fagiolino P, Eiraldi R, Vázquez M. (2006). The influence of cardiovascular physiology on dose/pharmacokinetic and pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships. *Clinical Pharmacokinetics*, 45(5):433–48.
28. International Life Sciences Institute. (1994). *Physiological parameter values for PBPK models* (p. 142). Washington DC.
29. Gross JL, Friedman R, Azevedo MJ, Silveiro SP, Pecis M. (1992). Effect of age and sex on glomerular filtration rate measured by 51Cr-EDTA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 25(2):129–134.
30. Berg UB. (2006). Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(9):2577–82.
31. Wright C, Sisson T. (1997). Steady-State Pharmacokinetic Properties of Pramipexole in Healthy Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37:520–525.
32. Yukawa E, Mine H, Higuchi S, Aoyama T. (1992). Digoxin population pharmacokinetics from routine clinical data: role of patient characteristics for estimating dosing regimens. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44(9):761–765.
33. Rathore SS, Wang Y, Krumholz HM. (2002). Sex-based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart failure. *The New England Journal of Medicine*, 347(18):1403–1411.
34. Adams K, Patterson J, Gattis W, O'Connor C, Lee C, Schwartz T, Gheorghide M. (2005). Relationship of Serum Digoxin Concentration to Mortality and Morbidity in Women in the Digitalis Investigation Group TrialA Retrospective Analysis. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(3):497–504.
35. Feldman M, Barnett C. (1991). Fasting gastric pH and its relationship to true hypochlorhydria in humans. *Digestive Diseases and Sciences*, 36(7):866–9.
36. Lindahl A, Ungell A, Knutson L, Lennernäs H. (1997). Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women. *Pharmaceutical Research*, 14(4):497–502.

37. Prewett E, Smith J, Nwokolo C, Sawyerr A, Pounder R. (1991). Twenty-four hour intragastric acidity and plasma gastrin concentration profiles in female and male subjects. *Clinical Science*, 80(6):619–624.
38. Merki HS, Fimmel CJ, Walt RP, Harre K, Röhmel J, Witzel L. (1988). Pattern of 24 hour intragastric acidity in active duodenal ulcer disease and in healthy controls. *Gut*, 29(11):1583–1587.
39. Tuo B, Wen G, Wei J, Liu X, Wang X, Zhang Y, Wu H, Dong X, Chow JYC, Vallon V, Dong H. (2011). Estrogen regulation of duodenal bicarbonate secretion and sex-specific protection of human duodenum. *Gastroenterology*, 141(3):854–863.
40. Kurata J, Honda G, Frankl H. (1985). The incidence of duodenal and gastric ulcers in a large health maintenance organization. *American Journal of Public Health*, 75(6):625–629.
41. Bouras E, Delgado-Aros S, Camilleri M. (2002). SPECT imaging of the stomach: comparison with barostat, and effects of sex, age, body mass index, and fundoplication. *Gut*, 781–786.
42. Fagiolino P, González N, Vázquez M, Eiraldi R. (2007). Itraconazole bioequivalence revisited: Influence of gender on highly variable drugs. *The Open Drug Metabolism Journal*, 1:7–13.
43. Stacher G, Bergmann H. (1992). Scintigraphic quantitation of gastrointestinal motor activity and transport: oesophagus and stomach. *European Journal of Nuclear Medicine*, 815–823.
44. John E. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (12th ed.). Philadelphia, PA: Saunders, Elsevier.
45. Meyer J, Ohashi H, Jehn D, Thomson J. (1981). Size of liver particles emptied from the human stomach. *Gastroenterology*, 80(6):1489–1496.
46. Hermansson G, Sivertsson R. (1996). Gender-related differences in gastric emptying rate of solid meals. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(10):1994–8.
47. Bennink R. (1998). Comparison of total and compartmental gastric emptying and antral motility between healthy men and women. *European Journal of Nuclear Medicine*, 25(9):1293–1299.
48. Datz F, Christian P, Moore J. (1987). Gender-related differences in gastric emptying. *The Journal of Nuclear Medicine*, 28(7):1204–1207.
49. Degen LP, Phillips SF. (1996). Variability of gastrointestinal transit in healthy women and men. *Gut*, 39(2):299–305.

50. Graff J, Brinch K, Madsen JL. (2001). Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. *Clinical Physiology*, 21(2):253–259.
51. Hutson W, Roehrkasse R, Wald A. (1989). Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility. *Gastroenterology*, 96(1):11–17.
52. Wedmann B, Schmidt G, Wegener M, Coenen C, Ricken D, Althoff J. (1991). Effects of age and gender on fat-induced gallbladder contraction and gastric emptying of a caloric liquid meal: a sonographic study. *The American Journal of Gastroenterology*, 86(12):1765–1770.
53. Notivol R, Carrio I, Cano L, Estorch M, Vilardell F. (1984). Gastric emptying of solid and liquid meals in healthy young subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 19(8):1107–1113.
54. Freire AC, Basit AW, Choudhary R, Piong CW, Merchant H a. (2011). Does sex matter? The influence of gender on gastrointestinal physiology and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1-2):15–28.
55. Sadik R, Abrahamsson H, Stotzer P. (2003). Gender differences in gut transit shown with a newly developed radiological procedure. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38(1):36–42.
56. Madsen JL. (1992). Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times. *Digestive Diseases and Sciences*, 37(10):1548–1553.
57. Bennink R, Peeters M. (1999). Evaluation of small-bowel transit for solid and liquid test meal in healthy men and women. *European Journal of Nuclear Medicine*, 26(12):1560–1566.
58. Metcalf A, Phillips S, Zinsmeister A, MacCarty R, Beart R, Wolff B. (1987). Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology*, 92(1):40–47.
59. Jung H, Kim D, Moon I. (2003). Effects of gender and menstrual cycle on colonic transit time in healthy subjects. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 18:181–186.
60. Singh D, Kashyap A, Pandey RV, Saini KS. (2011). Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug Discovery Today*, 16(17-18):793–799.
61. Schinkel AH, Jonker JW. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(1):3–29.

62. Takano M, Yumoto R, Murakami T. (2006). Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacology & Therapeutics*, 109(1-2):137–161.
63. Mouly S, Paine MF. (2003). P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharmaceutical Research*, 20(10):1595–1599.
64. Zimmermann C, Gutmann H, Hruz P, Gutzwiller J, Beglinger C, Drewe J. (2005). Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(2):219–224.
65. Köck K, Brouwer K. (2012). A perspective on efflux transport proteins in the liver. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(5):599–612.
66. Gorjup E, Danner S, Rotter N, Habermann J, Brassat U, Brummendorf TH, Wien S, Meyerhans A, Wollenberg B, Kruse C, von Briesen H. (2009). Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *European Journal of Cell Biology*, 88(7):409–421.
67. Fagiolino P, Vázquez M, Eiraldi R, Maldonado C, Scaramelli A. (2011). Influence of efflux transporters on drug metabolism: theoretical approach for bioavailability and clearance prediction. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(2):75–80.
68. Benet LZ, Cummins CL, Wu CY. (2004). Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *International Journal of Pharmaceutics*, 277(1-2):3–9.
69. Benet L. (2009). The drug transporter– metabolism alliance: uncovering and defining the interplay. *Molecular Pharmaceutics*, 6(6):1631–1643.
70. Wu CY, Benet LZ. (2005). Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical Research*, 22(1):11–23.
71. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. (2008). Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6):717–733.
72. Shugarts S, Benet LZ. (2009). The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical Research*, 26(9):2039–2054.



73. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wacher VJ. (1999). Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 62(1-2):25–31.
74. Löscher W, Potschka H. (2002). Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(1):7–14.
75. Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. (2002). How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clinical Pharmacokinetics*, 41(5):329–342.
76. Soldin OP, Mattison DR. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*, 48(3):143–57.
77. Soldin OP, Chung SH, Mattison DR. (2011). Sex differences in drug disposition. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011(ID 187103):1–14.
78. Schwartz JB. (2003). The Influence of Sex on Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(2):107–121.
79. Schwartz JB. (2007). The current state of knowledge on age, sex, and their interactions on clinical pharmacology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(1):87–96.
80. Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF. (2004). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1):499–523.
81. Owens NJ, Pharm D, Forinash AB, Matson KL. (2001). Sex and Gender Differences. En *Women's Health Across the Lifespan* (pp. 1–14).
82. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. (2003). Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*, 38(4):978–988.
83. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA. (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4):2908–2915.
84. Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T. (2006). Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sciences*, 79(5):455–461.

85. Zanger UM, Schwab M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1):103–141.
86. Williams J, Hyland R, Jones B, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE. (2004). Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(11):1201–1208.
87. Gallagher C, Balliet R, Sun D, Chen G, Lazarus P. (2010). Sex differences in UDP-glucuronosyltransferase 2B17 expression and activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12):2204–2209.
88. Harris RZ, Benet LZ, Schwartz JB. (1995). Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Drugs*, 50(2):222–239.
89. Zhang Y, Schuetz J, Elmquist W, Miller D. (2004). Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2):449–455.
90. Steiner H, Polliack A, Kimchi-Sarfaty C, Libster D, Fibach E, Rund D. (1998). Differences in rhodamine-123 efflux in B-type chronic lymphocytic leukemia suggest possible gender and stage variations in drug-resistance gene activity. *Annals of Hematology*, 76(5):189–94.
91. Rost D, Kopplow K, Gehrke S, Mueller S, Friess H, Ittrich C, Mayer D, Stiehl A. (2005). Gender-specific expression of liver organic anion transporters in rat. *European journal of clinical investigation*, 35:635–643.
92. Merino G, Herwaarden AE, Wagenaar E, Jonker JW, Schinkel AH. (2005). Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in liver. *Molecular Pharmacology*, 67(5):1765–1771.
93. Kim W, Benet L. (2004). P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharmaceutical Research*, 21(7):1284–1293.
94. Bock K, Schrenk D, Forster A, Griese EU, Mörike K, Brockmeier D, Eichelbaum M. (1994). Influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics*, 4(4):209–218.

95. Sabers A. (2008). Pharmacokinetic interactions between contraceptives and antiepileptic drugs. *Seizure*, 17(2):141–144.
96. Wilbur K, Ensom MH. (2000). Pharmacokinetic drug interactions between oral contraceptives and second-generation anticonvulsants. *Clinical Pharmacokinetics*, 38(4):355–365.
97. Kharasch E, Russell M, Garton K, Lentz G, Bowdle A, Cox K. (1997). Assessment of cytochrome P450 3A4 activity during the menstrual cycle using alfentanil as a noninvasive probe. *Anesthesiology*, 87:26–35.
98. Shavit G, Lerman P, Korczyn A, Kivity S, Bechar M, Gitter S. (1984). Phenytoin pharmacokinetics in catamenial epilepsy. *Neurology*, 34(7):959–961.
99. Bruguerolle B, Toumi M, Faraj F, Vervloet D, Razzouk H. (1990). Influence of the menstrual cycle on theophylline pharmacokinetics in asthmatics. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 39(1):59–61.
100. Lane JD, Steege JF, Rupp SL, Kuhn CM. (1992). Menstrual cycle effects on caffeine elimination in the human female. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 43(5):543–546.
101. Wilson K, Oram M, Horth CE, Burnett D. (1982). The influence of the menstrual cycle on the metabolism and clearance of methaqualone. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 14(3):333–339.
102. Wojcicki J, Gawrońska-Szklarz B, Kazimierczyk J, Baskiewicz Z, Raczynski A. (1978). Comparative pharmacokinetics of paracetamol in men and women considering follicular and luteal phases. *Arzneimittelforschung*, 29(2):350–352.
103. Loebstein R, Lalkin A, Koren G. (1997). Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. *Clinical Pharmacokinetics*, 33(5):328–343.
104. Slauterbeck JR, Fuzie SF, Smith MP, Clark RJ, Xu K, Starch DW, Hardy DM. (2002). The Menstrual Cycle, Sex Hormones, and Anterior Cruciate Ligament Injury. *Journal of Athletic Training*, 37(3):275–278.
105. Adams CP, Brantner V V. (2006). Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health affairs*, 25(2):420–428.
106. Fagiolino P, Eiraldi R, Vázquez M. (2005). Intercambiabilidad de Medicamentos. Bioequivalencia y Equivalencia Terapéutica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(2):179–189.

107. Chen ML, Lee SC, Ng MJ, Schuirmann DJ, Lesko LJ, Williams RL. (2000). Pharmacokinetic analysis of bioequivalence trials: implications for sex-related issues in clinical pharmacology and biopharmaceutics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 68(5):510–521.
108. González N, Fagiolino P, Vázquez M, Eiraldi R. (2009). Bioequivalencia Promedio Teniendo en Cuenta el Género de los Sujetos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(6):843–851.
109. Sham HL, Kempf DJ, Molla A, Marsh KC, Kumar GN, Chen CM, Kati W, Stewart K, Lal R, Hsu A, Betebenner D, Korneyeva M, Vasavanonda S, McDonald E, Saldivar A, Wideburg N, Chen X, ... Norbeck DW. (1998). ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12):3218–3224.
110. Agarwal S, Pal D, Mitra AK. (2007). Both P-gp and MRP2 mediate transport of Lopinavir, a protease inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*, 339(1-2):139–47.
111. Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KML, Zelcer N, Wiltshire HR, Beijnen JH, Schinkel AH. (2002). Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS*, 16(17):2295–301.
112. Kumar G, Dykstra J, Roberts EM, Jayanti V, Hickman D, Uchic J, Yao Y, Surber B, Thomas S, Granneman GR. (1999). Potent inhibition of the cytochrome P-450 3A-mediated human liver microsomal metabolism of a novel HIV protease inhibitor by ritonavir: a positive drug-drug interaction. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(8):902–908.
113. Gutmann H, Fricker G, Drewe J, Toeroek M, Miller DS. (1999). Interactions of HIV protease inhibitors with ATP-dependent drug export proteins. *Molecular Pharmacology*, 56(2):383–389.
114. Moyle GJ, Back D. (2001). Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Medicine*, 2(2):105–113.
115. Croxtall JD, Perry CM. (2010). Lopinavir/Ritonavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. *Drugs*, 70(14):1885–1915.
116. Donato EM, Martins LA, Fröhlich PE, Bergold AM. (2008). Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on in vivo data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(3):547–552.
117. Amidon G, Lennernäs H, Shah V, Crison J. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug

- product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3):413–420.
118. Löbenberg R, Amidon G. (2000). Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50:3–12.
  119. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Shah VP, Lesko LJ, Chen M-L, Lee VHL, Hussain AS. (2002). Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*, 19(7):921–5.
  120. FDA. (2000). *Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*. Rockville, MD.
  121. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. (2006). *Fortieth Report. WHO Technical Report Series* (p. 478). Ginebra.
  122. Zhang Q, Dunbar D, Ostrowska A. (1999). Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metabolism and ...*, 27(7):804–809.
  123. Laboratorios Abbott. (2005). *Kaletra comprimidos. Revisión biofarmacéutica y farmacológica. Aplicación para registro original (NDA)*.
  124. Klein CE, Chiu Y-L, Awni W, Zhu T, Heuser RS, Doan T, Breitenbach J, Morris JB, Brun SC, Hanna GJ. (2007). The tablet formulation of lopinavir/ritonavir provides similar bioavailability to the soft-gelatin capsule formulation with less pharmacokinetic variability and diminished food effect. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 44(4):401–410.
  125. Laboratorios Abbott. (2007). KALETRA. Información de prescripción para cápsulas de gelatina blanda.
  126. Laboratorios Abbott. (2013). KALETRA. Información de prescripción comprimidos recubiertos y solución oral. *FDA - ID 3403367*.
  127. Hauck WW, Hyslop T, Chen M, Patnaik R, Williams RL, Population FDA. (2000). Subject-by-Formulation Interaction in Bioequivalence □: Conceptual and Statistical Issues, 17(4):375–380.
  128. Endrenyi L, Fritsch S, Yan W. (1991). C<sub>max</sub>/AUC is a clearer measure than C<sub>max</sub> for absorption rates in investigations of bioequivalence. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 29(10):394–399.

129. Sathe P, Venitz J, Lesko L. (1999). Evaluation of truncated areas in the assessment of bioequivalence of immediate release formulations of drugs with long half-lives and of C<sub>max</sub> with different dissolution rates. *Pharmaceutical Research*, 16(6):939–43.
130. Myers Davit B, Conner D. (2008). Food Effects on Drug Bioavailability: Implications for New and Generic Drug Development. En R Krishna & L Yu (Eds.), *Biopharmaceutics Applications in Drug Development* (Vol. 21, pp. 317–335). Springer US.
131. Wangel A, Deller D. (1965). Intestinal motility in man. *Gastroenterology*, 48(1):58–68.
132. Fleisher D, Li C, Zhou Y, Pao L, Karim A. (1999). Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(3):233–254.
133. McConnell EL, Fadda HM, Basit AW. (2008). Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2):213–26.
134. Charman WN, Porter CJH, Mithani S, Dressman JB. (1997). Physicochemical and Physiological Mechanisms for the Effects of Food on Drug Absorption *Journal of Lipid Research*  
*Pharmaceutical Sciences*, 86(3):269–282.
135. Persson EM, Gustafsson A-S, Carlsson AS, Nilsson RG, Knutson L, Forsell P, Hanisch G, Lennernäs H, Abrahamsson B. (2005). The effects of food on the dissolution of poorly soluble drugs in human and in model small intestinal fluids. *Pharmaceutical Research*, 22(12):2141–51.
136. Clarysse S, Psachoulias D, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Duchateau G, Reppas C, Augustijns P. (2009). Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs. *Pharmaceutical research*, 26(6):1456–66.
137. Verbesselt R, Van Wijngaerden E, de Hoon J. (2007). Simultaneous determination of 8 HIV protease inhibitors in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography with combined use of UV and fluorescence detection: amprenavir, indinavir, atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir. *Journal of Chromatography B*, 845(1):51–60.
138. Novartis. (2009). *Neoral® Soft Gelatin Capsules and Neoral® Oral Solution Prescribing information* (p. 28). East Hanover, NJ.
139. De Coa MA, Merino J. (1997). Fármacos inmunodepresores e inmunoestimuladores. En J Flórez (Ed.), *Farmacología Humana*. (3rd ed., pp. 389–406). Barcelona: Masson.

140. Lallemand F, Perottet P, Felt-Baeyens O, Kloeti W, Philippoz F, Marfurt J, Besseghir K, Gurny R. (2005). A water-soluble prodrug of cyclosporine A for ocular application: a stability study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(1):124–129.
141. Yang S-G. (2010). Biowaiver extension potential and IVIVC for BCS Class II drugs by formulation design: Case study for cyclosporine self-microemulsifying formulation. *Archives of pharmacal research*, 33(11):1835–1842.
142. Keown P, Niese D. (1998). Cyclosporine microemulsion increases drug exposure and reduces acute rejection without incremental toxicity in de novo renal transplantation. *Kidney International*, 54:938–944.
143. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL, Columbia B, Fisher RA, Division T, College M, Frei U. (2001). Cyclosporin. *Drugs*, 61(13):1957–2016.
144. Parquet N, Reigneau O. (2000). New oral formulation of cyclosporin A (Neoral) pharmacokinetics in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 25:965–968.
145. Wu C, Benet L, Hebert M, Gupta SK, Rowland M, Gomez DY, Wachter VJ. (1995). Differentiation of absorption and first-pass gut and hepatic metabolism in humans: Studies with cyclosporine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58(5):492–497.
146. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. (1993). Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(9):6077–6080.
147. Kolars J, Watkins P, Merion R, Awni W. (1991). First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. *The Lancet*, 338:1488–1490.
148. Webber I, Peters W, Back D. (1992). Cyclosporin metabolism by human gastrointestinal mucosal microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 33:661–664.
149. Grevel J, Nüesch E, Abisch E, Kutz K. (1986). Pharmacokinetics of oral cyclosporin A (Sandimmun) in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 31:211–216.
150. Kees F, Bucher M, Schweda F, Gschaidmeier H, Faerber L, Seifert R. (2007). Neoimmun versus Neoral: a bioequivalence study in healthy volunteers and influence of a fat-rich meal on the bioavailability of Neoimmun. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 375(6):393–339.

151. Aros C a, Ardiles LG, Schneider HO, Flores C a, Alruiz P a, Jerez VR, Mezzano S a. (2005). No gender-associated differences of cyclosporine pharmacokinetics in stable renal transplant patients treated with diltiazem. *Transplantation Proceedings*, 37(8):3364–3366.
152. Hesselink D a, van Gelder T, van Schaik RHN, Balk AHMM, van der Heiden IP, van Dam T, van der Werf M, Weimar W, Mathot R a a. (2004). Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 76(6):545–556.
153. Tornatore K, Brazeau D, Dole K, Danison R, Wilding G, Leca N, Gundroo A, Gillis K, Zack J, DiFrancesco R, Venuto RC. (2013). Sex differences in cyclosporine pharmacokinetics and ABCB1 gene expression in mononuclear blood cells in African American and Caucasian renal transplant recipients. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 53(10):1039–1047.
154. Min DI, Lee M, Ku YM, Flanigan M. (2000). Gender-dependent racial difference in disposition of cyclosporine among healthy African American and white volunteers. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 68(5):478–486.
155. Organización Mundial de la Salud. (2010). *Tratamiento antirretroviral de la infección por el VIH en adultos y adolescentes. Recomendaciones para un enfoque de salud pública*. Ginebra, Suiza.
156. Bélanger A, Caron P, Harvey M, Zimmerman PA, Mehlotra RK, Guillemette C. (2009). Glucuronidation of the antiretroviral drug efavirenz by UGT2B7 and an in vitro investigation of drug-drug interaction with zidovudine. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(9):1793–1796.
157. Kwara A, Lartey M, Sagoe K, Kenu E, Court MH. (2009). CYP2B6, CYP2A6 and UGT2B7 genetic polymorphisms are predictors of efavirenz mid-dose concentration in HIV-infected patients. *AIDS*, 23(16):2101–2106.
158. Habtewold A, Amogne W, Makonnen E, Yimer G, Riedel K-D, Ueda N, Worku A, Haefeli WE, Lindquist L, Aderaye G, Burhenne J, Aklillu E. (2011). Long-term effect of efavirenz autoinduction on plasma/peripheral blood mononuclear cell drug exposure and CD4 count is influenced by UGT2B7 and CYP2B6 genotypes among HIV patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10):2350–2361.
159. Bristol-Myers Squibb. (2010). *SUSTIVA® (efavirenz)* (p. 12). Princeton, NJ.



160. Dirson G, Fernandez C, Hindlet P, Roux F, German-Fattal M, Gimenez F, Farinotti R. (2006). Efavirenz does not interact with the ABCB1 transporter at the blood-brain barrier. *Pharmaceutical Research*, 23(7):1525–1532.
161. Weiss J, Herzog M, König S, Storch CH, Ketabi-kiyanvash N. (2009). Induction of multiple drug transporters by efavirenz. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109:242–250.
162. Störmer E, Moltke LL Von, Perloff MD, Greenblatt DJ. (2002). Differential Modulation of P-Glycoprotein Expression and Activity by Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in Cell Culture. *Pharmaceutical Research*, 19(7):1038–1045.
163. Janneh O, Chandler B, Hartkoorn R, Kwan WS, Jenkinson C, Evans S, Back DJ, Owen A, Khoo SH. (2009). Intracellular accumulation of efavirenz and nevirapine is independent of P-glycoprotein activity in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(5):1002–1007.
164. Panikumar AD, Venkat Raju Y, Sunitha G, Sathesh Babu PR, Subrahmanyam CVS. (2012). Development of biorrelevant and discriminating method for dissolution of efavirenz and its formulations. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3):220–223.
165. Gutiérrez F, Navarro A, Padilla S, Antón R, Masiá M, Borrás J, Martín-Hidalgo A. (2005). Prediction of neuropsychiatric adverse events associated with long-term efavirenz therapy, using plasma drug level monitoring. *Clinical Infectious Diseases*, 41:1648–1653.
166. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. (2001). Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 15:71–75.
167. Hawi A, Bell G. (1994). Preformulation studies of nevirapine, a reverse transcriptase inhibitor. *Pharmaceutical Research*, 11:236.
168. Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals. (2012). *Viramune*® (nevirapine) (p. 24). Ridgefield, CT.
169. Lamson MJ, Sabo JP, MacGregor TR, Pav JW, Rowland L, Hawi A, Cappola M, Robinson P. (1999). Single dose pharmacokinetics and bioavailability of nevirapine in healthy volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 20(6):285–291.
170. Cheeseman SH, Hattox SE, McLaughlin MM, Koup RA, Andrews CA. (1993). Pharmacokinetics of nevirapine: initial single-rising-dose study in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2):178–182.

171. Fan-Havard P, Liu Z, Chou M, Ling Y, Barrail-Tran A, Haas DW, Taburet A-M. (2013). Pharmacokinetics of phase I nevirapine metabolites following a single dose and at steady state. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5):2154–2160.
172. Murphy RL, Montaner J. (1996). Nevirapine: a review of its development, pharmacological profile and potential for clinical use. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 5(9):1183–1199.
173. Antinori A, Perno CF, Giancola ML, Forbici F, Ippolito G, Hoetelmans RM, Piscitelli SC. (2005). Efficacy of cerebrospinal fluid (CSF)-penetrating antiretroviral drugs against HIV in the neurological compartment: different patterns of phenotypic resistance in CSF and plasma. *Clinical Infectious Diseases*, 41(12):1787–1793.
174. Van Praag RM, van Weert RP, van Heeswijk G, Zhou XJ, Sommadossi JP, Jurriaans S, Lange JM, Hoetelmans RM, Prins JM. (2002). Stable concentrations of zidovudine, stavudine, lamivudine, abacavir, and nevirapine in serum and cerebrospinal fluid during 2 years of therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3):896–899.
175. Glynn SL, Yazdanian M. (1998). In vitro blood-brain barrier permeability of nevirapine compared to other HIV antiretroviral agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(3):306–310.
176. Riska P, Lamson M, MacGregor T. (1999). Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(8):895–901.
177. Erickson D, Mather G, Trager W. (1999). Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(12):1488–1495.
178. Gervot L, Rochat B, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, Martin H, Beaune P, de Waziers I. (1999). Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics and Genomics*, 9(3):295–306.
179. U.S. Pharmacopeial Convention. (2014). *USP 37 - NF 32*. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention.
180. Vázquez M, Fagiolino P, Ibarra M, Magallanes L. (2014). Safety assessment of efavirenz after a single-dose bioequivalence study: a trend to correlate central nervous system effect and plasma concentration. *International Journal of Pharmacy*, 5(1).

181. Sheiner LB. (1984). The population approach to pharmacokinetic data analysis: rationale and standard data analysis methods. *Drug Metabolism Reviews*, 15(1-2):153–171.
182. Sheiner LB, Beal SL. (1980). Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 8(6):553–571.
183. Sheiner LB, Beal SL. (1981). Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 9(5):635–651.
184. Sheiner LB, Beal SL. (1983). Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: routine clinical pharmacokinetic data. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 11(3):303–319.
185. Steimer J, Vozeh S, Racine-Poon A, Holford N, O'Neill R. (1994). The population approach: rationale, methods, and applications in clinical pharmacology and drug development. En PG Welling (Ed.), *Pharmacokinetics of Drugs* (pp. 405–451). Berlin: Springer-Verlag.
186. Beal SL, Sheiner LB. (1980). The NONMEM System. *American Statistician*, 34:118–119.
187. Bonate PL. (2011). Nonlinear Mixed Effects Models: Theory. En *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation* (2nd ed.). New York, NY: Springer.
188. Bonate PL. (2005). Recommended reading in population pharmacokinetic pharmacodynamics. *The AAPS Journal*, 7(2):363–373.
189. Ette EI, Williams PJ. (2004). Population pharmacokinetics II: estimation methods. *The Annals of Pharmacotherapy*, 38(11):1907–1915.
190. Ette EI, Williams PJ, Lane JR. (2004). Population pharmacokinetics III: design, analysis, and application of population pharmacokinetic Studies. *The Annals of Pharmacotherapy*, 38(12):2136–2144.
191. Pillai GC, Mentré F, Steimer J-L. (2005). Non-linear mixed effects modeling - from methodology and software development to driving implementation in drug development science. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 32(2):161–183.
192. Pillai G, Davies G, Denti P, Steimer J-L, McIlleron H, Zvada S, Chigutsa E, Ngaimisi E, Mirza F, Tadmor B, Holford NHG. (2013). Pharmacometrics: opportunity for reducing disease burden in the

- developing world: the case of Africa. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 2:1–4.
193. Efron B, Tibshirani R. (1993). *An introduction to the bootstrap*. New York, NY: Chapman & Hall.
  194. Savic RM, Karlsson MO. (2009). Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *The AAPS Journal*, 11(3):558–569.
  195. Havlir D, Cheeseman S. (1995). High-dose nevirapine: safety, pharmacokinetics, and antiviral effect in patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 171(3):537–545.
  196. Zhou X, Sheiner L, D'Aquila RT, Hughes MD, Hirsch MS, Fischl MA, Johnson VA, Myers M, Sommadossi JP. (1999). Population pharmacokinetics of nevirapine, zidovudine, and didanosine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(1):121–128.
  197. De Maat MMR, Huitema ADR, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp ECM, Beijnen JH. (2002). Population pharmacokinetics of nevirapine in an unselected cohort of HIV-1-infected individuals. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54(4):378–385.
  198. Kappelhoff BS, van Leth F, MacGregor TR, Lange J, Beijnen JH, Huitema ADR. (2005). Nevirapine and efavirenz pharmacokinetics and covariate analysis in the 2NN study. *Antiviral Therapy*, 10(1):145–155.
  199. Svensson E, van der Walt J-S, Barnes KI, Cohen K, Kredt T, Huitema A, Nachega JB, Karlsson MO, Denti P. (2012). Integration of data from multiple sources for simultaneous modelling analysis: experience from nevirapine population pharmacokinetics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 74(3):465–476.
  200. Chou M, Bertrand J, Segeral O, Verstuyft C, Borand L, Comets E, Le Tiec C, Becquemont L, Ouk V, Mentre F, Taburet A-M. (2010). Population pharmacokinetic-pharmacogenetic study of nevirapine in HIV-infected Cambodian patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10):4432–4439.
  201. Schipani A, Wyen C, Mahungu T, Hendra H, Egan D, Siccardi M, Davies G, Khoo S, Fätkenheuer G, Youle M, Rockstroh J, Brockmeyer NH, Johnson M a, Owen A, Back DJ. (2011). Integration of population pharmacokinetics and pharmacogenetics: an aid to optimal nevirapine dose selection in HIV-infected individuals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6):1332–1339.

202. Padowski JM, Pollack GM. (2011). The influence of distributional kinetics into a peripheral compartment on the pharmacokinetics of substrate partitioning between blood and brain tissue. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 38(6):743–767.
203. Padowski J, Pollack G. (2012). Influence of Enterohepatic Recycling on the Time Course of Brain-to-Blood Partitioning of Valproic Acid in Rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(9):1846–1853.
204. Fagiolino P, Vázquez M, Eiraldi R. (2013). Clearance and bioavailability study through arterio-venous drug concentrations relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4-5):825–859.
205. Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN. (2004). Perl-speaks-NONMEM (PsN)--a Perl module for NONMEM related programming. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 75(2):85–94.
206. Jonsson EN, Karlsson MO. (1999). Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 58(1):51–64.
207. Keizer RJ, van Benten M, Beijnen JH, Schellens JHM, Huitema ADR. (2011). Piraña and PCluster: a modeling environment and cluster infrastructure for NONMEM. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 101(1):72–79.
208. Savic RM, Jonker DM, Kerbusch T, Karlsson MO. (2007). Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 34(5):711–726.
209. Holford NH. (1996). A size standard for pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 30(5):329–332.
210. Davies NM, Takemoto JK, Brocks DR, Yáñez J a. (2010). Multiple peaking phenomena in pharmacokinetic disposition. *Clinical Pharmacokinetics*, 49(6):351–377.
211. Shore P, Brodie B, Hogben C. (1957). The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 361–369.
212. Furuta T, Ohashi K, Kosuge K. (1999). CYP2C19 genotype status and effect of omeprazole on intragastric pH in humans\*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 552–561.
213. Kappelhoff BS, van Leth F, Robinson P a, MacGregor TR, Baraldi E, Montella F, Uip DE, Thompson M a, Russell DB, Lange JM a, Beijnen JH, Huitema ADR. (2005). Are adverse events of nevirapine and

- efavirenz related to plasma concentrations? *Antiviral Therapy*, 10(4):489–498.
214. Karlsson MO, Sheiner LB. (1993). The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 21(6):735–750.
215. Laboratorios Abbott. (2014). *Depakote prescribing information*. North Chicago, IL.
216. Meade EM. (1993). Sodium hydrogen divalproate oligomer. Estados Unidos: United States Patent and Trademark Office.
217. Wilder B, Karas B, Penry J, Asconape J. (1983). Gastrointestinal tolerance of divalproex sodium. *Neurology*, 33(6):608.
218. Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruiter JPN, Ijlst L, Duran M, Wanders RJ a, Tavares de Almeida I. (2008). Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31:205–216.
219. Ohtani Y, Endo F, Matsuda I. (1982). Carnitine deficiency and hyperammonemia associated with valproic acid therapy. *The Journal of Pediatrics*, 101(5):782–785.
220. Vázquez M, Fagiolino P, Maldonado C, Olmos I, Ibarra M, Alvariza S, Guevara N, Magallanes L, Olano I. (2014). Hyperammonemia associated with valproic acid concentrations. *BioMed Research International*, 2014:1–7.
221. United States Pharmacopeial Convention. (2007). Divalproex Sodium standard safety data sheet.
222. Fagiolino P, Martín O, González N, Malanga A. (2007). Actual bioavailability of divalproex sodium extended-release tablets and its clinical implications. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 13(2):75–78.
223. Dutta S, Reed RC, Cavanaugh JH. (2004). Absolute bioavailability and absorption characteristics of divalproex sodium extended-release tablets in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 44(7):737–742.
224. Dutta S, Zhang Y. (2004). Bioavailability of divalproex extended-release formulation relative to the divalproex delayed-release formulation. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 25(8):345–352.
225. Dutta S, Faught E, Limdi N a. (2007). Valproate protein binding following rapid intravenous administration of high doses of valproic acid

- in patients with epilepsy. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 32(4):365–371.
226. Booth CL, Pollack GM, Brouwer KL. (1996). Hepatobiliary disposition of valproic acid and valproate glucuronide: use of a pharmacokinetic model to examine the rate-limiting steps and potential sites of drug interactions. *Hepatology*, 23(4):771–80.
227. Pollack GM, Brouwer KL. (1991). Physiologic and metabolic influences on enterohepatic recirculation: simulations based upon the disposition of valproic acid in the rat. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 19(2):189–225.
228. Dickinson G, Robert C, Harland C, Lynn K, Rodgers M, Kaufman N. (1979). Disposition of Valproic Acid in the rat: Dose-Dependent Metabolism, Distribution, Enterohepatic Recirculation and Choloretic Effect. *Pharmacology*, 211(3):583–559.
229. Dickinson RG, Kluck RM, Eadie MJ, Hooper WD. (1985). Disposition of beta-glucuronidase-resistant “glucuronides” of valproic acid after intrabiliary administration in the rat: intact absorption, fecal excretion and intestinal hydrolysis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 233(1):214–221.
230. Huai-yun H, Secrest DT, Mark KS, Carney D, Brandquist C, Elmquist WF, Miller DW. (1998). Expression of Multidrug Resistance-Associated Protein ( MRP ) in Brain Microvessel Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243:816–820.
231. Gibbs JP, Adeyeye MC, Yang Z, Shen DD. (2004). Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport. *Epilepsy Research*, 58(1):53–66.
232. Baltes S, Fedrowitz M, Torto CL, Potschka H. (2007). Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or Multidrug Resistance Proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *Pharmacology*, 320(1):331–343.
233. Adkison KD, Artru a a, Powers KM, Shen DD. (1994). Contribution of probenecid-sensitive anion transport processes at the brain capillary endothelium and choroid plexus to the efficient efflux of valproic acid from the central nervous system. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(2):797–805.
234. Scism JL, Powers KM, Artru a a, Lewis L, Shen DD. (2000). Probenecid-inhibitable efflux transport of valproic acid in the brain parenchymal cells of rabbits: a microdialysis study. *Brain Research*, 884(1--2):77–86.

235. Ward ES, Pollack GM, Brouwer KL. (2001). Probenecid-associated alterations in valproate glucuronide hepatobiliary disposition: mechanistic assessment using mathematical modeling. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(1):141–147.
236. Amini H, Javan M, Ahmadiani A. (2006). Development and validation of a sensitive assay of valproic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography without prior derivatization. *Journal of Chromatography B*, 830(2):368–371.
237. Yukawa E, To H, Ohdo S, Higuchi S, Aoyama T. (1997). Population-Based Investigation of Valproic Acid Relative Clearance Using Nonlinear Mixed Effects Modeling: Influence of Drug-Drug Interaction and Patient Characteristics. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37:1160–1167.
238. Park H-M, Kang S-S, Lee Y-B, Shin D-J, Kim O-N, Lee S-B, Yim D-S. (2002). Population pharmacokinetics of intravenous valproic acid in Korean patients. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 27(6):419–425.
239. Jiang D, Bai X, Zhang Q, Lu W, Wang Y, Li L, Müller M. (2009). Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genotypes on pharmacokinetic variability of valproic acid in Chinese epileptic patients: nonlinear mixed-effect modeling. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(12):1187–1193.
240. Lin W-W, Jiao Z, Wang C-L, Wang H-Y, Ma C-L, Huang P-F, Guo X-Z, Liu Y-W. (2014). Population pharmacokinetics of valproic acid in adult Chinese epilepsy patients and its application in an individualised dosage regimen. *Therapeutic Drug Monitoring*.
241. Blanco-Serrano B, Otero MJ, Santos-Buelga D, García-Sánchez MJ, Serrano J, Domínguez-Gil A. (1999). Population estimation of valproic acid clearance in adult patients using routine clinical pharmacokinetic data. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 20(August):233–240.
242. Galimberti CA, Mazzucchelli I, Arbasino C, Canevini MP, Fattore C, Perucca E. (2006). Increased apparent oral clearance of valproic acid during intake of combined contraceptive steroids in women with epilepsy. *Epilepsia*, 47(9):1569–1572.
243. Sabers A, Buchholt JM, Uldall P, Hansen EL. (2001). Lamotrigine plasma levels reduced by oral contraceptives. *Epilepsy Research*, 47:151–154.
244. Reimers A, Helde G, Brodtkorb E. (2005). Ethinyl estradiol, not progestogens, reduces lamotrigine serum concentrations. *Epilepsia*, 46(9):1414–1417.



245. Beal SL, Sheiner LB, Boeckmann AJ, Bauer RJ. (1989). NONMEM - Guías de uso. Ellicott City ,MD: ICON Development Solutions.
246. Court MH, Duan S, von Moltke L, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO, Mackenzie PI. (2001). Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(3):998–1006.
247. Miners J, Attwood J, Birkett D. (1983). Influence of sex and oral contraceptive steroids on paracetamol metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 16:503–509.
248. Watkins J, Klaassen C. (1981). Choleric effect of valproic acid in the rat. *Hepatology*, 1(4):341–347.
249. Maynard R, Ishiguro H, Steward MC. (2004). Pancreatic Bicarbonate Secretion. En L Johnson (Ed.), *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier.
250. Padowski JM, Pollack GM. (2012). Influence of enterohepatic recycling on the time course of brain-to-blood partitioning of valproic acid in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(9):1846–1853.
251. Bauer L. (2008). *Applied Clinical Pharmacokinetics* (2nd ed.). McGraw-Hill.
252. Läpple F, Richter O von, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M, Kivistö KT. (2003). Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics*, 13(9):565–575.
253. Potschka H, Löscher W. (2001). In Vivo Evidence for P-Glycoprotein-Mediated Transport of Phenytoin at the Blood-Brain Barrier of Rats. *Epilepsia*, 42(10):1231–1240.
254. Potschka H, Löscher W. (2001). Multidrug resistance-associated protein is involved in the regulation of extracellular levels of phenytoin in the brain. *Neuroreport*, 12(11):2387–2389.
255. Bourgeois B, Wad N. (1985). Michaelis-Menten kinetics and the steady-state serum phenytoin/hydroxyphenytoin ratio. *Therapeutic Drug Monitoring*, 7:405–410.
256. Odani A, Hashimoto Y, Takayanagi K, Otsuki Y, Koue T, Takano M, Yasuhara M, Hattori H, Furusho K, Inui K. (1996). Population pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy: analysis with a dose-dependent clearance model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(3):444–448.

257. Rojanasthien N, Chaichana N, Teekachunhatean S, Kumsorn B, Sangdee C, Chankrachang S. (2007). Effect of doses on the bioavailability of phenytoin from a prompt-release and an extended-release preparation: single dose study. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 90(9):1889–1893.
258. Jung D, Powell JR, Walson P, Perrier D. (1980). Effect of dose on phenytoin absorption. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 28(4):479–485.
259. Tanaka J, Kasai H, Shimizu K, Shimasaki S, Kumagai Y. (2013). Population pharmacokinetics of phenytoin after intravenous administration of fosphenytoin sodium in pediatric patients, adult patients, and healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 69(3):489–497.
260. Chaudhry A, Urban T, Lamba J, Birnbaum AK, Rimmel R, Subramanian M, Strom S, You J, Kasperaviciute D, Catarino CB, Radtke RA, Sisodiya SM, Goldstein DB, Schuetz EG. (2010). CYP2C9\*1B promoter polymorphisms, in linkage with CYP2C19\*2, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2):599–611.
261. Alvariza S. (2014). *Influencia del efecto autoinductivo/autoinhibitorio en la respuesta farmacocinética de la fenitoína*. Universidad de la República, Uruguay.
262. Alvariza S, Fagiolino P, Vázquez M, Feria-Romero I, Orozco-Suárez S. (2014). Chronic administration of phenytoin induces efflux transporter overexpression in rats. *Pharmacological Reports*, 66:946–951.
263. Glick T, Workman T, Gauferberg S. (2004). Preventing phenytoin intoxication: safer use of a familiar anticonvulsant. *The Journal of Family Practice*, 53(3):197–202.
264. Handley A. (1970). Phenytoin tolerance tests. *British Medical Journal*, 3(July):203–204.
265. Rubio-Donnadieu F. (2013). Pharmacoresistance and epilepsy. En L Rocha & E Cavalheiro (Eds.), *Pharmacoresistance in epilepsy: from genes and molecules to promising therapies*. New York, NY: Springer.
266. Alvestad S, Lydersen S, Brodtkorb E. (2007). Rash from antiepileptic drugs: influence by gender, age, and learning disability. *Epilepsia*, 48(7):1360–1365.

267. Verthelyi D. (2006). Female's heightened immune status: estrogen, T cells, and inducible nitric oxide synthase in the balance. *Endocrinology*, 147(2):659–661.