



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE LOPINAVIR/RITONAVIR EN
PACIENTES INFECTADOS CON VIH Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON
LA EXCRECIÓN URINARIA DEL 6 β OH CORTISOL/CORTISOL”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

PRESENTA:

Q.F.B. MARÍA GUADALUPE LOZOYA MORENO

DIRECTORES DE TESIS:

DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA

DRA. MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL

MÉXICO, D.F., JUNIO 2009



SIP-14

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 11:00 horas del día 12 del mes de Junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

"FARMACOCINETICA POBLACIONAL DE LOPINAVIR/RITONAVIR EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA EXCRECIÓN URINARIA DEL 6β-OH CORTISOL/CORTISOL".

Presentada por el alumno:

Lozoya
Apellido paterno

Moreno
Apellido materno

María Guadalupe
Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	7	2	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:


Maestría en Ciencias en Investigación Clínica

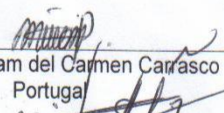
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Directora de Tesis



Dr. Francisco Javier Flores Murrieta


M. en C. Miriam del Carmen Carrasco Portugal


Dr. Carlos Castillo Henkel



Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes


Dr. Juan Gerardo Reyes García


Dr. Víctor Manuel Ruiz López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla


ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 12 del mes Junio del año 2009, la que suscribe María Guadalupe Lozoya Moreno alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Investigación Clínica con número de registro B061721, adscrito a La Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Francisco Javier Flores Murrieta y cede los derechos del trabajo intitulado **“FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE LOPINAVIR/RITONAVIR EN PACIENTES INFECTADOS CON VIH Y SU POSIBLE CORRELACIÓN CON LA EXCRECIÓN URINARIA DEL 6 β -OH CORTISOL/CORTISOL”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección guadalupita822@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Guadalupe Lozoya Moreno
María Guadalupe Lozoya Moreno

Nombre y firma

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES GENERALES	4
1. Fisiopatogénia del VIH	5
<i>1.1. Agentes causales del síndrome de inmunodeficiencia adquirida</i>	5
<i>1.2. Estructura Morfológica del VIH-1</i>	5
2. Tratamiento contra el SIDA	7
<i>2.1. Panorama sobre el tratamiento antirretroviral</i>	7
<i>2.2. Tratamiento antirretroviral disponible en la actualidad</i>	8
<i>2.3. Los IP en el tratamiento antirretroviral</i>	11
<i>2.3.1. Mecanismo de acción de los IP</i>	11
2.4. Lopinavir/ritonavir en el tratamiento antirretroviral	12
<i>2.4.1. Descripción</i>	12
<i>2.4.2. Propiedades Fisicoquímicas</i>	12
<i>2.4.3. Propiedades Farmacocinéticas</i>	14
<i>a). Absorción</i>	14
<i>b). Distribución</i>	15

c). <i>Metabolismo</i>	15
d). <i>Eliminación</i>	15
e). <i>Grupos Poblacionales Especiales</i>	16
2.4.4. <i>Interacciones</i>	16
2.4.5. <i>Reacciones Adversas</i>	19
3. Variabilidad en las respuesta farmacológica	20
3.1. <i>El papel del CYP 3A4 en el metabolismo de los fármacos</i>	23
3.2. <i>El CYP 3A4 en la población mexicana</i>	25
3.3. <i>Variabilidad en las concentraciones plasmáticas de los IP.</i>	26
4. Abordaje Poblacional de la Farmacocinética	27
4.1 <i>Objetivos de la Farmacocinética Poblacional.</i>	28
4.2. <i>Estructura de un Modelo Poblacional</i>	28
4.3. <i>Tipos de Modelos Poblacionales</i>	33
4.3.1. <i>Método en dos fases</i>	33
4.3.2. <i>Modelos de efectos mixtos</i>	33
4.4. <i>Parámetros Poblacionales:</i>	34
5. Estimación de los parámetros poblacionales	
5.1. Bases para generar un modelo poblacional con el programa NONMEM	36
II. Planteamiento del Problema	38

III. Justificación	40
IV. Hipótesis	42
V. Objetivos	44
5.1. <i>Objetivo General</i>	45
5.2. <i>Objetivos Particulares</i>	45
VI. Metodología	46
A. Diseño del Estudio	47
6.1.1. <i>Clasificación del Estudio</i>	47
6.1.2. <i>Población de Estudio</i>	47
6.1.3. <i>Criterios de Inclusión</i>	47
6.1.4. <i>Criterios de No Inclusión</i>	47
6.1.5. <i>Criterios de Eliminación</i>	47
6.1.6. <i>Variables de estudio</i>	48
B. Fármacos de estudio.	48
C. Reactivos	49
D. Equipos	49
E. Validación de los Métodos Analíticos	51
6.2. Validación de los métodos analíticos para la determinación de las concentraciones de lopinavir y ritonavir en plasma	51
6.2.1. <i>Condiciones Cromatográficas.</i>	52

6.2.2. <i>Proceso de semipurificación de muestras</i>	52
6.2.3. <i>Validación</i>	53
a). <i>Selectividad</i>	53
b). <i>Intervalo de Calibración.</i>	55
c). <i>Linealidad.</i>	55
d). <i>Repetibilidad</i>	57
e). <i>Reproducibilidad</i>	59
f). <i>-Estabilidad.</i>	60
6.2.4. <i>Inactivación de las Muestras Infecciosas.</i>	69
6.2.5. <i>Análisis de Muestras.</i>	69
6.3. <i>Validación de Método Analítico para la determinación de las concentraciones urinarias de 6βOH Cortisol</i>	70
6.3.1. <i>Condiciones Cromatográficas</i>	70
6.3.2. <i>Proceso de semipurificación de muestras</i>	70
6.3.3. <i>Validación.</i>	71
a). <i>Selectividad</i>	71
b). <i>Intervalo de Calibración.</i>	73
c). <i>Linealidad.</i>	73
d). <i>Exactitud y Exactitud.</i>	74
e). <i>Estabilidad.</i>	75
6.3.4. <i>Análisis de muestras de orina.</i>	76
6.4.-Método de <i>ELISA</i> para la determinación del Cortisol en muestras de orina.	76
6.5.-Cronología del Estudio	77

6.5.1. <i>Tiempos de muestreo</i>	77
6.5.2. <i>Desarrollo del Estudio</i>	78
6.6. Análisis Estadístico	80
6.7.-Consideraciones Éticas	80
6.8.-Costos de Estudio	80
VII. Resultados	82
VIII. Discusión	128
IX. Conclusiones	145
X. Bibliografía	147

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	NOMBRE DE LA FIGURA
Figura 1.	Estructura de un virión de VIH, se observa la localización de los componentes de la estructura y las proteínas que lo integran.
Figura 2.	Estructura química de Lopinavir (FDA, 2000). Lopinavir químicamente es nombrado [1S-[1R*,(R*), 3R*, 4R*]-N-[4-[[2,6-dimetilfenoxi) acetil] amino]-3-hidroxi-5-fenil-1-(fenilmetil) pentil] tetrahidro-alfa-(1-etiletil)-2-oxo-1(2H)-pirimidina.
Figura 3.	Estructura química de Ritonavir (FDA, 2000). Ritonavir químicamente es nombrado como ácido10-hidroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1-[2-(1-metiletil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11bis(fenilmetil)-2,4,7,12-tetraaza-tridecan-13-oico, éster 5-tiazolilmetil, [5S-(5R*, 8R*,10R*,11R*)].
Figura 4.	Componentes de la variabilidad en la respuesta farmacológica.
Figura 5.	Las enzimas del CP450 hepáticos implicadas en el metabolismo de fármacos (Donato y col.; Guengerich, 1999)
Figura 6.	Componentes de un modelo poblacional: modelo estructural y modelo estadístico.
Figura 7.	Variabilidad interindividual en los parámetros FC. η es la diferencia entre el parámetro para un individuo y el valor típico de este parámetros para la población. La distribución de η para todos los individuos dentro de la población puede ser descrita por el valor medio (cero) y la varianza de la distribución σ^2 .
Figura 8.	Distribución de las concentraciones en todos los individuos dentro de la población de referencia. (Grasela y Sheiner, 1991; Herrera, 2006; Martínez-Lanao, 2006).
Figura 9.	Imagen del cromatógrafo de líquidos de Alta Resolución modulo Alliance 2695, utilizado en el análisis de las muestras del estudio.
Figura 10.	Kit de Cortisol utilizado en el análisis de muestras y el equipo marca TECAN modelo SPECTRA CLASSIC utilizado para las lecturas de las muestras.
Figura 11.	Cromatogramas. En la imagen (A) se encuentra el cromatograma de una inyección de soluciones estándar de lopinavir/ritonavir; en la imagen (B) se observa una muestra de matriz biológica (plasma) libre de fármaco, en la imagen (C) se observa una muestra de plasma cargada con un concentración de la curva de calibración de lopinavir/ritonavir. En la imagen (D) se observa la muestra de un paciente en tratamiento con lopinavir/ritonavir.
Figura 12.	Linealidad del método analítico para la determinación de lopinavir, construida a partir de los promedios de las concentraciones del intervalo de calibración.
Figura 13.	Linealidad del método analítico para la determinación de ritonavir, construida a partir de los promedios de las concentraciones del intervalo de calibración.

Figura 14.	Estabilidad de lopinavir en un periodo continuo de 24h en el automuestreador o autoinyector. En la gráfica A se muestra la exactitud del nivel bajo, en la gráfica B se muestra el nivel medio y en la gráfica C se muestra el nivel alto de los puntos de control de calidad.
Figura 15.	Estabilidad de ritonavir en un periodo continuo de 24h en el automuestreador o autoinyector. En la gráfica A se muestra la exactitud del nivel bajo, en la gráfica B se muestra el nivel medio y en la gráfica C se muestra el nivel alto de los puntos de control de calidad.
Figura 16.	Cromatogramas. En la imagen (A) se encuentra el cromatograma de una inyección de soluciones estándar de 6 β OH Cortisol; en la (B) se observa una muestra de matriz utilizada en la validación (agua) libre de fármaco, en la imagen (C) se observa una muestra de agua cargada con un concentración de la curva de calibración de 6 β OH Cortisol. En la imagen (D) se observa la muestra de un paciente en tratamiento con 6 β OH Cortisol.
Figura 17.	Linealidad del método analítico para la determinación de 6 β OH Cortisol, construida a partir de los promedios de las concentraciones del intervalo de calibración.
Figura 18.	Concentraciones plasmáticas de lopinavir obtenidas del total de 150 muestras plasmáticas analizadas de pacientes en tratamiento con LPV/RTV.
Figura 19.	Concentraciones plasmáticas de LPV obtenidas en la muestra previa a la dosis de la mañana.
Figura 20.	Concentraciones plasmáticas de ritonavir obtenidas del total de 150 muestras plasmáticas analizadas de pacientes en tratamiento con LPV/RTV.
Figura 21.	Concentraciones plasmáticas de RTV obtenidas en la muestra previa a la dosis de la mañana.
Figura 22.	Concentraciones plasmáticas de LPV en función de RTV.
Figura 23.	Esquema general para la construcción de un modelo de efectos mixtos.
Figura 24.	Modelo farmacocinético moncompartamental de primer orden con absorción y eliminación de primer orden. A lado se muestra la gráfica clásica de este modelo.
Figura 25.	Bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados de lopinavir.
Figura 26.	Bondad de ajuste de las predicciones individuales y las observaciones medidas, de los datos analizados de lopinavir.
Figura 27.	Bondad de ajuste de los residuales ponderados poblacionales en función del tiempo, de los datos analizados de lopinavir/ritonavir.
Figura 28.	Gráfica de bondad de ajuste de los residuales ponderado y las observaciones de los datos analizados de lopinavir/ritonavir.

Figura 29.	Figura 29. Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la depuración.
Figura 30.	Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con el volumen de distribución.
Figura 31.	Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la constante de absorción.
Figura 32.	Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la depuración.
Figura 33.	Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para el volumen de distribución.
Figura 34.	Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la constante de absorción.
Figura 35.	Gráfica de bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales finales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados en el modelo final de lopinavir.
Figura 36.	Modelo farmacocinético moncompartamental de primer orden con absorción y eliminación de primer orden. A lado se muestra la gráfica clásica de este modelo.
Figura 37.	Bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados de ritonavir
Figura 38.	Bondad de ajuste de las predicciones individuales y las observaciones medidas, de los datos analizados de ritonavir
Figura 39.	Bondad de ajuste de los residuales ponderados poblaciones en función del tiempo, de los datos analizados de ritonavir.
Figura 40.	Bondad de ajuste de los residuales ponderados y las observaciones de los datos analizados de ritonavir.
Figura 41.	Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la depuración del ritonavir.
Figura 42.	Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con el volumen de distribución del ritonavir.
Figura 43.	Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la constante de absorción a la cual se le asignó un valor fijo.
Figura 44.	Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la depuración del ritonavir.
Figura 45.	Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para el volumen de distribución del ritonavir
Figura 46.	Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la constante de absorción del ritonavir.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

Figura 47.	Gráfica de bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales finales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados en el modelo final del ritonavir.
-------------------	--

LISTA DE TABLAS

TABLA	NOMBRE DE LA TABLA
Tabla 1.	Fármacos del grupo Inhibidores de la Proteasa disponibles en la actualidad para el tratamiento de infección por VIH, aprobados por la FDA hasta el año 2008.
Tabla 2.	Efectos de otros fármacos sobre la farmacocinética de Lopinavir/ritonavir (KALETRA) en ABC, C _{max} y C _{min}
Tabla 3.	Parámetros farmacocinéticos del fármaco coadministrado en presencia de Lopinavir/ritonavir (KALETRA).
Tabla 4.	Factores que pueden afectar y modificar la farmacocinética de los fármacos.
Tabla 5.	Fármacos y sustratos endógenos oxidados por el isoenzima 3A4. (Guengerich, 1999; De Wildt y cols., 1999).
Tabla 6.	Estadística de la repetibilidad del método analítico para la determinación de lopinavir en plasma humano.
Tabla 7.	Estadística de la repetibilidad del método analítico para la determinación de ritonavir en plasma humano.
Tabla 8.	Estadística de la reproducibilidad del método analítico para la determinación de lopinavir en plasma humano.
Tabla 9.	Estadística de la reproducibilidad del método analítico para la determinación de ritonavir en plasma humano.
Tabla 10.	Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente del compuesto (lopinavir) en plasma humano.
Tabla 11.	Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente del compuesto (ritonavir) en plasma humano.
Tabla 12.	Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente durante 20h del compuesto (lopinavir) en plasma humano.
Tabla 13.	Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente durante 20h del compuesto (ritonavir) en plasma humano.
Tabla 14.	Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (lopinavir) ante ciclos de congelado-descongelado en plasma humano.

Tabla 15.	Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (ritonavir) ante ciclos de congelado-descongelado en plasma humano.
Tabla 16.	Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (lopinavir) en periodo de almacenamiento a largo plazo (30 días)
Tabla 17.	Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (ritonavir) en periodo de almacenamiento a largo plazo (30 días)
Tabla 18.	Estadística de la repetibilidad del método analítico para la determinación de 6 β OH Cortisol en muestras de orina.
Tabla 19.	Estadística de la reproducibilidad del método analítico para la determinación de 6 β OH Cortisol en muestras de orina.
Tabla 20.	Combinaciones de los tiempos de muestreo utilizados para la asignación de las tomas de muestras (segunda y tercera muestra) para cada paciente participante en el estudio.
Tabla 21.	Datos demográficos de la población participante en el estudio, se muestran los valores de la media y desviación estándar, así como los medicamentos antirretrovirales de mayor frecuencia en el esquema de tratamiento de los pacientes.
Tabla 22.	Eventos adversos reportados en la población de estudio
Tabla 23.	Parámetros elevados en las valores de perfil de lípidos en los estudios de laboratorio clínico de los pacientes.
Tabla 24.	Parámetros del laboratorio de infectología: conteo de CD4 y carga viral.
Tabla 25.	Concentraciones obtenidas de la medición de β OH Cortisol y Cortisol en la primera orina de la mañana en pacientes con VIH en tratamiento con LPV/RTV.
Tabla 26.	Parámetros estimados por el modelo básico o estructural generado por el NONMEM.
Tabla 27.	Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con depuración (CL).
Tabla 28.	Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de Akaike con el volumen de distribución (V).
Tabla 29.	Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con la constante de absorción.
Tabla 30.	Los valores se presentan como los estimados poblacionales medios de los parámetros farmacocinéticos. F_{OBJ} es el valor de la función objetivo proporcionada por NONMEM. Se muestran los datos generados por el modelo inicial y el modelo final donde la variable que mejor predicción presentó fue el peso.
Tabla 31	Parámetros estimados por el modelo básico o estructural generado por el NONMEM.

Tabla 32	Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de Akaike con depuración (CL) del ritonavir.
Tabla 33.	Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con el volumen de dsitribución (V).
Tabla 34.	Los valores se presentan como los estimados poblacionales medios de los parámetros farmacocinéticos. F _{OBJ} es el valor de la función objetivo proporcionada por

RESUMEN

El desarrollo progresivo de resistencias a los agentes antirretrovirales dificulta el control de la patología infecciosa y obliga a incrementar las medidas destinadas a su optimización en la práctica clínica, siendo la correcta dosificación uno de los puntos clave para alcanzar este objetivo. La individualización de la terapia con los inhibidores de la proteasa parece ser necesaria ya que recientemente se han publicado estudios en los que se manifiesta la amplia variabilidad inter e intraindividual en los parámetros farmacocinéticos de este grupo de fármacos. La combinación de lopinavir y ritonavir (LPV/RTV), son dos inhibidores de la proteasa del VIH, de amplio uso en el tratamiento antirretroviral. En nuestra investigación desarrollamos dos modelos poblacionales por una parte el primer modelo (LPV) describió la variabilidad en la farmacocinética del lopinavir en presencia de ritonavir en pacientes mexicanos infectados con el VIH, y por otra parte, el segundo modelo describió adecuadamente la variabilidad en la

farmacocinética del ritonavir. Los datos se analizaron utilizando un modelo no lineal de efectos mixtos en el programa NONMEM. El análisis incluyó 50 pacientes VIH positivos, en tratamiento con LPV/RTV (400/100 mg). Los datos fueron descritos por un modelo monocompartamental con absorción y eliminación de primer orden para ambos modelos. Las covariables probadas para lopinavir fueron la edad, el peso, la talla, el género, concentración del inhibidor ritonavir, relación del 6β OH Cortisol/Cortisol y para ritonavir solo se excluyó la concentración del mismo. El modelo poblacional desarrollado para lopinavir los parámetros farmacocinéticos fueron CL/F_{LPV} 11.85 L/h, Vd/F_{LPV} 10.4 L y Ka_{LPV} 2.42 h^{-1} , con una variabilidad interindividual de 146%, 36.19% y 36.87% respectivamente. Por otra parte en el modelo poblacional de ritonavir se obtuvieron los siguientes parámetros: CL/F_{RTV} 42.8 L/h, Vd/F_{RTV} 133 L y Ka_{RTV} 0.18 h^{-1} (fijo) con una variabilidad interindividual de 44.83%, 81.24% y 0.45% respectivamente. Los modelos farmacocinéticos poblacionales de lopinavir y ritonavir desarrollados pueden ayudar a predecir los niveles de concentración de LPV/RTV e individualizar los regímenes de dosificación de LPV/RTV en cualquier población de pacientes infectados con VIH mexicanos, basándose en el conocimiento del peso y el género. Sin embargo, la trascendencia clínica definitiva de nuestro modelo debe ser explorada a través de un estudio prospectivo en el que se use el modelo para ajustar la dosificación de lopinavir en presencia de ritonavir.

ABSTRACT

The progressive development of resistance to the antiretroviral agents makes difficult to control the patologic infection and requires to increase the amount of optimization for its clinical practice. The right amount of dosage the main key to reach this goal. The separation of the therapy with the protease inhibitors seems to be necessary as shown in recently studies published where it shows the wide variability inter and intraindividual in the pharmacokinetics parameters of this group of drugs. The combination of lopinavir and ritonavir (LPV/RTV), are two protease inhibitors of HIV, used a lot with the antiretroviral treatment. In our investigation we developed two different population model in one hand our first

model (LPV) described the variability of pharmacokinetics of lopinavir in presence of ritonavir in mexican patients infected with HIV, in the other hand our second model described properly the variability of pharmacokinetics in ritonavir. The data was analyzed using a model "Nonlinear of mixed effects model" in the program NONMEM. The analysis included 50 patients HIV positive, in the treatment with LPV/RTV (400/100 mg). The data was described by one compartment model with absorption and elimination of first order for both models. The covariables tested in the model for lopinavir were age, weight, size, gender, concentration of ritonavir inhibitor, relation of 6BOHCortiol/cortisol. The population model developed of lopinavir the following parameters were: CL/F_{LPV} 11.85 L/h, Vd/F_{LPV} 42.91 L y Ka_{LPV} 2.42 h^{-1} , con una variabilidad interindividual de 146%, 36.19% y 36.87% respectivamente. In the other hand population model of ritonavir the following parameter were obtained: CL/F_{RTV} 42.8 L/h, Vd/F_{RTV} 133 L y Ka_{RTV} 0.18 h^{-1} (Fix) with a interindividual variability of 44.83%, 81.24% and 0.45% respectively. The population pharmacokinetics models of lopinavir and ritonavir developed can help to predict the levels of concentration of LPV/RTV and individualize the regimes of dosage of LPV/RTV in any population of mexican patients infected with HIV, based on knowing the weight and gender, however, the clinical transcendancy of our final model should be explore through a prospective study in which the model is used to adjust the dosage of lopinavir in presence of ritonavir.

ABREVIATURAS

ABC	Area bajo la curva de la concentración contra el tiempo.	Ka	Constante de absorción
AGA	Alfa glicoproteína ácida	LPV	Lopinavir

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6βOHCortisol/Cortisol

AIC	Criterio de información de Akaike	LPV/RTV	Lopinavir/Ritonavir
Cmax	Concentración Máxima	NONMEN	NONlinear Mixed Effects Modeling
Cmin	Concentración Mínima	RTV	Ritonavir
CL/F	Depuración	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
CIENI	Centro	t_{1/2}	Tiempo de vida media
CI	Depuración	Tmax	Tiempo al que se alcanza la concentración máxima
GAM	Modelo aditivo generalizado por etapas	Vd/F	Volumen de Distribución
FDA	Food and Drug Administration	VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
F OBJ	Función Objetivo	VIH-1	Virus tipo 1
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	VIH-2	Virus tipo 2
IMC	Índice de masa corporal		

Introducción

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana VIH, es una de las patologías que, debido a la elevada incidencia en la actualidad, requiere en la práctica clínica, del establecimiento de un tratamiento eficaz y seguro para el paciente inmunocomprometido, por las características fisiopatológicas propias de la infección y las que conlleva su expresión clínica final, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Ello implica no sólo el conocimiento de los aspectos farmacológicos de los agentes antirretrovirales, principalmente en lo referente a eficacia, toxicidad y farmacocinética, sino también de las características específicas de los pacientes a los que van destinados.

Este grupo poblacional presenta características fisiopatológicas que condicionan el empleo de muchos fármacos. Por ello, no es de extrañar que exista una importante variabilidad tanto inter como intraindividual en la farmacocinética de los antirretrovirales específicamente en el grupo de los inhibidores de proteasa en el paciente VIH positivo.

A pesar de disponer de regímenes de dosificación establecidos en función de ciertas características fisiológicas, es necesario monitorear adecuadamente los niveles séricos con objeto de optimizar la eficacia y disminuir la toxicidad de estos antirretrovirales. Se trata de evaluar aquellos factores que influyen sobre la disposición del fármaco de estudio, en este caso una combinación de dos inhibidores de la proteasa, el lopinavir y el ritonavir, y una vez identificados, modificar adecuadamente la dosificación de la combinación (lopinavir/ritonavir).

Para valorar la influencia de estos factores, es necesario realizar el monitoreo de esta combinación de antirretrovirales en la población de interés, en este caso pacientes mexicanos VIH positivos y disponer de técnicas adecuadas que permitan su posterior análisis.

En cuanto a la monitorización, ésta no debe limitarse a la determinación de las concentraciones de los inhibidores de proteasa en los fluidos biológicos, sino que es necesario realizar un cuidadoso y metódico registro de aquellas variables clínicas, fisiológicas o farmacológicas inherentes al paciente y su situación. De esta forma, integrando los datos farmacocinéticos y los fisiopatológicos se puede alcanzar una estrategia terapéutica individual más racional y efectiva.

Estas características son consideradas por los diferentes métodos de análisis farmacocinético poblacional, llamados así porque son útiles para determinar los parámetros farmacocinéticos de fármacos en poblaciones concretas de pacientes, cuantificar las variabilidades inter e intraindividuales asociadas a éstos, y mejorar la estimación del comportamiento farmacocinético a nivel individual.

Dentro de los métodos poblacionales, el modelo no lineal de efectos mixtos presenta la ventaja de analizar multitud de factores (fisiológicos, patológicos y farmacológicos) sobre los parámetros farmacocinéticos poblacionales. Aunque se han hecho algunos estudios de farmacocinética poblacional de lopinavir/ritonavir y de otros antirretrovirales en el paciente VIH positivo, en la población mexicana no se cuenta con ello. En la presente tesis se realizó el estudio farmacocinético poblacional de lopinavir/ritonavir, a partir de una población de 50 pacientes VIH positivos que asisten a monitoreo virológico a la clínica de investigación en enfermedades infecciosas CIENI del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Por otra parte, algunos estudios realizados en la población mexicana describen que algunos fármacos metabolizados por la isoenzima 3A4 del Citocromo P450, alcanzan concentraciones plasmáticas más elevadas comparadas con las reportadas por otras poblaciones, lo cual sugiere una

disminución en la actividad de esta vía metabólica en la población mexicana (Castañeda y cols., 1993; Flores Murrieta y cols., 2000, Carrasco Portugal y cols., 2005). En base a los antecedentes descritos, en este estudio también se buscó caracterizar la actividad de la isoenzima 3A4, correlacionando la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol a través de un índice de actividad.

I. Antecedentes Generales

1. FISIOPATOGENIA DEL VIH-1

1.1. Agentes causales del síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Actualmente, los únicos virus identificados como causantes del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en los humanos son los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), descrito en 1983 (Barre Soussi, 1983; Gallo, 1983) y el tipo 2 (VIH-2), descrito en 1986 (Clavel, 1986). El VIH-1 es el más prevalente y causante de la mayoría de los casos del SIDA, que representa la expresión clínica final de la infección. El VIH-1 y VIH-2 se replican en células T CD4+ (cT CD4+) y se consideran como patogénicos en personas infectadas, aunque el estado de inmunodeficiencia puede ser menos grave en individuos infectados con VIH-2 (Curiel y cols., 2003).

El VIH es un retrovirus, pertenece a la familia retroviridae, concretamente a la subfamilia lentivirus. Las infecciones por los lentivirus producen un curso crónico de la enfermedad, un periodo largo de latencia clínica, una replicación viral persistente y una implicación del sistema nervioso central (Curiel y cols., 2003; Renán, 2006;). La característica más importante es la destrucción del sistema inmune, pero el VIH también origina una serie de manifestaciones neurológicas y tumorales. El VIH, como todos los lentivirus infecta todas las células de la estirpe macrofágica y además presenta una afinidad especial por los linfocitos CD4 (Renán, 2003).

1.2. Estructura Morfológica del VIH

Las partículas virales del VIH poseen una estructura, de aproximadamente 100 nm de diámetro y están rodeadas por una membrana lipoprotéica. Cada partícula viral contiene 72 complejos de glicoproteína que

están integrados en la membrana lipídica y cada uno está compuesto de trímeros de glicoproteína externa gp120 y de la proteína transmembranal gp141. La unión entre gp120 y gp141 es débil, por lo que la gp120 se puede liberar espontáneamente en el tejido infectado. Así la glicoproteína gp120 se puede detectar en el suero y en el tejido linfático de los pacientes infectados por el VIH (Oh y cols., 1992; Sunila y cols, 1997). Durante el proceso de gemación, es probable que en su capa de lipoproteína los virus incorporen proteínas, provenientes de las células huésped, a su membrana lipoprotéica, como proteínas de adhesión (ICAM-1) o antígenos leucocitarios humanos (HLA clase I y II) que podrían facilitar la adhesión a otras células blanco. La proteína de matriz p17 está anclada en el interior de la membrana lipoprotéica viral. El antígeno p24 de la cápside contiene dos copias de ácido ribonucleico (ARN) del VIH-1. Este ARN es parte de un complejo de proteína-ácido nucleico que está compuesto por la núcleo-proteína p7 y la transcriptasa inversa p66. La partícula viral contiene todo el equipo enzimático para la replicación: la transcriptasa inversa, la integrasa p32 y la proteasa p11.

En la figura 1, se muestra la imagen de un virión de VIH, en su estructura morfológica se observan los componentes descritos que conforman el virión.

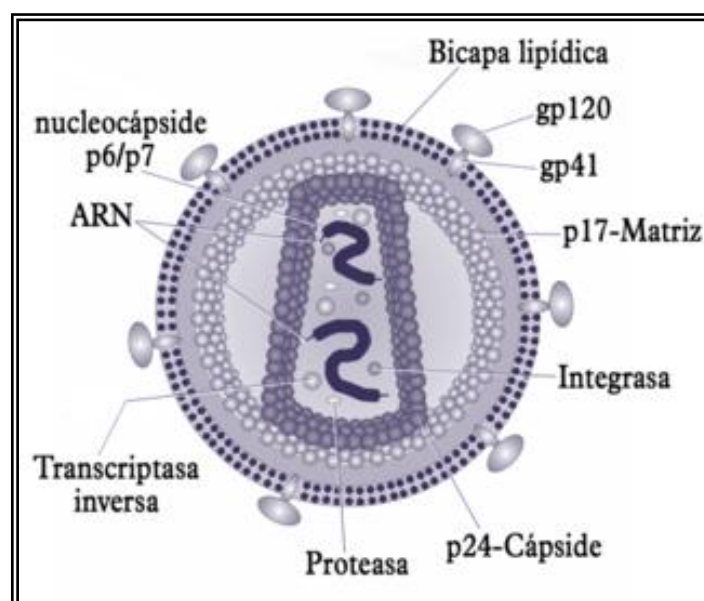


Figura 1. Estructura de un virión de VIH, se observa la localización de los componentes de la estructura y las proteínas que lo integran.

2. TRATAMIENTO CONTRA EL SIDA

2.1. Panorama sobre el tratamiento antirretroviral

La terapia antirretroviral se ha desarrollado rápidamente, desde sus inicios en los ochentas. Los primeros fármacos que se desarrollaron, fueron los análogos de nucleósidos, conocidos también como nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (ITIAN), utilizados inicialmente en monoterapia (Fischl y cols., 1990; Volberding y cols., 1990). Posteriormente tras los resultados del estudio europeo-australiano DELTA (Delta, 1995) y el estudio americano ACTG 175 (Hammer y cols., 1996), la terapia combinada de dos análogos de nucleósidos tomó mayor relevancia, ya que aparentemente era más eficaz que la monoterapia. Ambos estudios demostraron que era mejor el tratamiento iniciado inmediatamente con dos análogos de nucleósidos, que usarlos en forma secuencial. Coincidiendo en tiempo, aparecen los primeros resultados de los ensayos clínicos realizados con los inhibidores de proteasa (IP), una clase completamente nueva de fármacos. Los IP fueron diseñados teniendo como base los conocimientos de la estructura molecular del VIH y la proteasa.

Los esfuerzos sostenidos llevaron a la aprobación rápida entre diciembre 1995 y marzo 1996, de los tres primeros inhibidores de proteasa conocidos, primero saquinavir, ritonavir e indinavir, utilizados para el tratamiento de VIH, poniendo de manifiesto su eficacia y abriendo una nueva vía de estudio.

Más tarde, surge la terapia combinada de dos ITIAN combinados con un IP como la mejor opción para combatir el VIH-1, iniciando así el tratamiento antirretroviral de gran actividad o TARGA (Gulick y cols., 1997; Hammer y cols., 1997; Mocroft y cols., 1998; Palell y cols., 1998). En este mismo contexto, el primer inhibidor de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN) denominado Nevirapina, se aprobó en junio de 1996. Los ITINN fueron vistos escépticamente en un principio, por su actividad limitada y un perfil de

resistencia problemático. Estudios realizados posteriormente, han permitido demostrar su actividad inmunológica y virológica cuando se combinan con ITIAN (Staszewsky y cols., 1999; Mannheimer y cols., 2002; Robbins y cols., 2003).

En pacientes previamente tratados con ITIAN, se han realizado comparaciones indirectas que parecen demostrar que las combinaciones triples con IP son mejores, en cuanto a eficacia, que las que utilizan ITINN (Yazdanpanah y cols., 2004).

2.2. Tratamiento antirretroviral disponible en la actualidad

En el mercado mundial se encuentran disponibles cinco clases de fármacos antirretrovirales: Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósidos (ITIAN) y los No Análogos de Nucleósidos (ITINN), Inhibidores de la Proteasa (IP), Inhibidores de Fusión (IF) y los Inhibidores de la Integrasa .

Sumando en total 33 productos aprobados por la FDA, que incluyen agentes antirretrovirales considerados individualmente o en combinación.

En la tabla 1 se describen los fármacos antirretrovirales del grupo de inhibidores de la proteasa disponibles en el mercado. Se indica el nombre genérico, así como nombres comerciales, el laboratorio que lo comercializa y la fecha de autorización por la FDA.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6βOHCortisol/Cortisol

Clase antirretroviral	Nombre Genérico	Marca y/o nombre comercial	Fabricante	Fecha de aprobación por FDA
<i>Inhibidores de la proteasa (IP)</i>				
Los IP desactivan la proteasa, una proteína que el VIH necesita para replicarse.	Amprenavir	Angerase, APV	GlaxoSmithKline, Vertex Pharmaceuticals	Abril 15,1999
	Atazanavir	Reyataz, ATV	Bristol-Meyers Squibb	Junio 20,2003
	Darunavir	Prezista, TMC114	Tibotec	Junio 23,2006
	Fosamprenavir	Lexiva, FPV	GlaxoSmithKline, Vertex Pharmaceuticals	Octubre 20, 2003
	Indinavir	Crixivian, IDV	Merck	Marzo 13, 1996
	Lopinavir/ Ritonavir	Kaletra, LPV/r	Abbott Laboratories	Sep. 15, 2000
	Nelfinavir	Viracep, NFV	Agourun Pharmaceuticals	Marzo 14, 1997
	Ritonavir	Norvir, RTV	Abbot Laboratories	Marzo 1,1996
	Saquinavir	Invirase, SQV	Hoffmam-La Roche	Diciembre 6, 1995
Tripanavir	Aptivus, TPV	Boehringer Ingelheim	Junio 22,2005	

Tabla 1. Fármacos del grupo Inhibidores de la Proteasa disponibles en la actualidad para el tratamiento de infección por VIH, aprobados por la FDA hasta el 2008. (<http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html>).

2.3. Los IP en el tratamiento antirretroviral

Los inhibidores de proteasa (IP) se consideran piedra angular en el tratamiento antirretroviral. Constituyen un grupo de fármacos que se caracterizan por presentar en común, un metabolismo de eliminación hepático y una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) corta (entre 1 y 5 horas). Presentan un gran número de interacciones farmacológicas, ya que inhiben el Citocromo P450. Su metabolismo es fundamentalmente hepático, principalmente por la isoenzima CYP3A4. Las principales diferencias farmacocinéticas que se han descrito, se presentan en el ámbito de absorción y distribución. En la actualidad estos fármacos son de uso amplio y existe una gran variedad de fármacos IP, como se describió en la tabla 1 (Hurts y Faulds, 2000; Cvetkovic y Goa, 2003; Olfield y Ploster, 2006).

2.3.1. Mecanismo de acción de los IP

Con respecto al mecanismo de acción de los IP son fármacos que presentan una estructura peptídica análoga al sustrato natural con el que compiten, la proteasa del VIH-1 (Cvetkovic y Goa, 2003). La actividad de la proteasa del VIH-1, es esencial en la maduración de las partículas virales infectantes. Cuando el virus entra en la célula, su ARN se transforma en ADN gracias a la acción de la transcriptasa inversa. El nuevo ADN viral, se integra en el genoma de la célula hospedadora y, finalmente, es transcrito y traducido por enzimas celulares, produciendo poliproteínas. Estas poliproteínas se ensamblan y empaquetan en la superficie de la célula, dando lugar a las partículas virales inmaduras que son liberadas. Es entonces cuando la proteasa del virus actúa, cortando los enlaces virales de las poliproteínas gag y gag-pol en pequeñas subunidades funcionales, lo que induce a la maduración de la partícula viral (Kohl y cols., 1997). La proteasa del virus es de naturaleza enzimática y puede ser inhibida competitivamente por los inhibidores de proteasa (Deeks y cols., 1997; Eron, 2000). Estos fármacos compiten con el

sustrato natural "poliproteína vírica" por el centro catalítico, impidiendo el corte de las proteínas gag y gag-pol y por tanto, la maduración de las partículas virales, provocando la liberación de partículas virales inmaduras sin capacidad de infectar células nuevas (Erikson y cols., 1990; Debouck, 1992; Deeks y cols., 1997; Ocaña, 1998; Eron, 2000).

En el grupo de fármacos antirretrovirales inhibidores de la proteasa se encuentra la coformulación de lopinavir/ritonavir, dos inhibidores de la proteasa del VIH. A continuación se describen algunas características de la farmacología y propiedades farmacocinéticas de esta combinación de fármacos.

2.4 LOPINAVIR/RITONAVIR en el tratamiento antirretroviral

2.4.1. Descripción.

La coformulación de Lopinavir/ritonavir (lopinavir/r), es una combinación de dos inhibidores de la proteasa del VIH-1. El nombre comercial es KALETRA, aunque en algunos países se conoce con el nombre de ALUVIA. Fue aprobado por FDA el 15 septiembre del 2000. La dosis estándar recomendada es 400/100 mg dos veces al día. Es el IP de más reciente aparición y el primero que contiene una dosis fija de ritonavir como potenciador, capaz de aumentar la concentración de lopinavir más de 100 veces (Sham y cols., 1998). Lopinavir posee la mayor barrera genética de todos los IP; probablemente son necesarias 6 a 8 mutaciones para que pierda la actividad y se generen resistencias.

2.4.2. Propiedades Fisicoquímicas

La fórmula molecular del lopinavir es C₃₇H₄₈N₄O₅ y su peso molecular es de 628.80 g/mol. La estructura química de lopinavir se presenta en la figura 2.

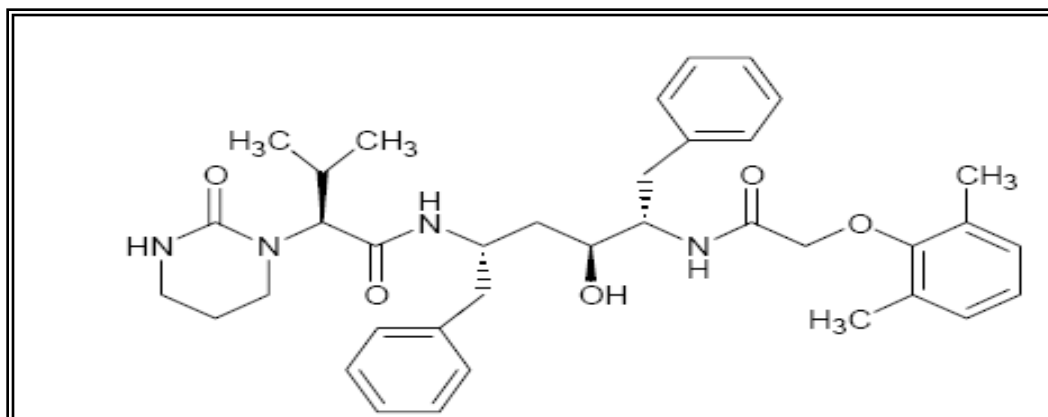


Figura 2. Estructura química de Lopinavir (FDA, 2000). **Lopinavir** químicamente es nombrado [1S-[1R*,(R*), 3R*, 4R*]]-N-[4-[[2,6-dimetilfenoxi] acetil] amino]-3-hidroxi-5-fenil-1-(fenilmetil) pentil] tetrahidro-alfa-(1-etiletil)-2-oxo-1(2H)-pirimidina.

La fórmula molecular del ritonavir es $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$ y su peso molecular es de 720.95 g/mol. La estructura química de ritonavir se presenta en la figura 3.

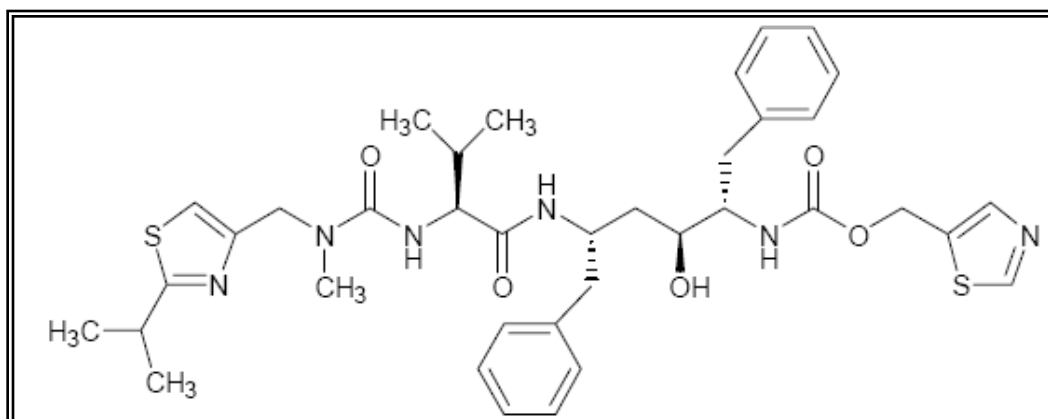


Figura 3. Estructura química de Ritonavir (FDA, 2000). **Ritonavir** químicamente es nombrado como ácido 10-hidroxi-2-metil-5-(1-metiletil)-1-[2-(1-metiletil)-4-tiazolil]-3,6-dioxo-8,11bis (fenilmetil)-2,4,7,12-tetraaza-tridecan-13-oico, éster 5-tiazolilmetil, [5S-(5R*, 8R*, 10R*, 11R*)].

2.4.3. *Propiedades Farmacocinéticas*

En los estudios realizados para evaluar las propiedades farmacocinéticas de lopinavir coadministrado con ritonavir en voluntarios sanos (adultos) y en pacientes infectados por VIH, utilizando dosis única de 400/50 mg o 400/100 mg, así como dosis múltiples (Sham y cols., 1998; Bertz y cols., 1999; Gustavson y cols., 2000, Feinberg y cols., 2002), no han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos (Cvetkovic y Goa, 2003; Olfield y Ploster, 2006). Lopinavir es metabolizado por el CYP3A4 (Kumar y cols., 1999). Ritonavir es un inhibidor del CYP3A4 (Kumar y cols., 1999) por lo tanto, inhibe el metabolismo de lopinavir, aumentando las concentraciones plasmáticas de lopinavir (Lal y cols., 1997; Sham y cols., 1998).

a). Absorción.

Con relación a la absorción, la biodisponibilidad de la coformulación de lopinavir/ritonavir en humanos aún no se ha establecido (Olfield y Ploster, 2006). Sin embargo estudios en ratas describen que la biodisponibilidad de lopinavir sin la coadministración de ritonavir es baja (Sham y cols., 1998).

En el estado estacionario, al administrar dosis múltiples (400/100 mg) de lopinavir/ritonavir, dos veces al día, durante 3 a 4 semanas, se ha reportado una concentración máxima media (C_{max}) de lopinavir de 9.6 mg/L, alcanzada aproximadamente en un tiempo máximo (T_{max}) de 4.2 horas de la administración (Bertz y cols., 1999; Murphy y cols., 2001). La concentración mínima media en el estado estacionario antes de la dosis de la mañana fue de 5.5 mg/L. El área bajo la curva (ABC) de lopinavir en un intervalo de 12 h (ABC_{12}) fue de 82.8 mg·h/L (Bertz y cols., 1999; Murphy y cols., 2001).

b). Distribución

Mientras los datos de la distribución de lopinavir en el estado estacionario señalan que se une entre un 98.2 y un 99.2 % a proteínas plasmáticas, de forma similar en voluntarios sanos y en pacientes VIH positivos (Bertz y cols, 1999; Lal y cols, 1998; Cvetkovic y Goa, 2003; Olfeld y Ploster, 2006). Lopinavir se une a la alfa-1 glicoproteína ácida (AGA) y a la albumina, con mayor afinidad a la AGA y ritonavir también posee gran afinidad por ambas proteínas.

c). Metabolismo

Estudios *in vitro* con microsomas hepáticos humanos describen que lopinavir se metaboliza por la vía oxidativa, por el sistema hepático del citocromo P450, casi exclusivamente por la isoenzima 3A4 (Kumar y cols., 1996; Kumar y cols., 1999). Ritonavir es un potente inhibidor del CYP 3A4, por lo que inhibe el metabolismo de lopinavir, aumentando sus concentraciones plasmáticas y mejorando su biodisponibilidad. Estudios realizados *in vivo* han puesto de manifiesto que el ritonavir induce la expresión del CYP 3A4 tanto en hígado como en intestino (Geletko y cols., 1994; Luo y cols., 2002). El CYP 3A4 constituye la isoforma mas predominante en humanos (Shimada y cols., 1994; Hsu y cols., 1998).

d). Eliminación

Los estudios de eliminación de estos fármacos, señalan que la vida media efectiva de lopinavir en un intervalo de dosificación de 12 horas, es en promedio 5.8 horas con una depuración oral aparente (CL/F) de 6.4 L/h (Shimada y cols, 1994; Hsu y cols, 1998; Hurts y Faulds, 2000).

Tras administrar una dosis de 400/100 mg de lopinavir¹⁴C/ritonavir marcada con ¹⁴C, aproximadamente un 10.4% y 82.6% de la dosis administrada de lopinavir-¹⁴C, se recupera en la orina y heces respectivamente. Aproximadamente el 2.2% y 19.8% de la dosis administrada de lopinavir es eliminada sin cambio por vía renal y por heces respectivamente. Después de la

administración de dosis múltiples de lopinavir/ritonavir, menos del 3% de la dosis de lopinavir es excretada sin cambios en la orina (Cvetkovic y Goa, 2003; Olfield y Ploster, 2006).

e). Grupos Poblacionales Especiales

En los estudios con grupos poblacionales especiales, no se ha observado cambio en las características farmacocinéticas de lopinavir/ritonavir relacionadas con el sexo y la raza. Sin embargo, no se ha estudiado la farmacocinética de lopinavir/ritonavir en pacientes geriátricos (Cvetkovic y Goa, 2003; Olfield y Ploster, 2006), por otra parte en pacientes pediátricos se evaluó la farmacocinética de lopinavir/ritonavir en 53 pacientes (edad entre 6 meses y 12 años) con diagnóstico de VIH positivos. Durante 3 semanas de tratamiento con 230/57.5 mg/m², dos veces al día de lopinavir/ritonavir sin incluir nevirapina en el esquema y con 300/75 mg/m², dos veces al día incluyendo nevirapina en el esquema de tratamiento, produce concentraciones plasmáticas de lopinavir similares a las reportadas en adultos VIH positivos que recibieron lopinavir/ritonavir 400/100mg dos veces al día como esquema de tratamiento (Cvetkovic y Goa, 2003; Olfield y Ploster, 2006).

En el estado estacionario, el ABC de lopinavir, la C_{max} y la C_{min}, en ambos grupos de niños bajo el esquema de tratamiento descrito fue de 72.6 y 85.8 mg·h/L; 8.2 y 10 mg/L; 3.4 y 3.6 mg/L, respectivamente (Cvetkovic y Goa, 2003).

f). Interacciones

Por otro lado, con respecto a las interacciones con otros fármacos, la combinación de lopinavir y ritonavir (KALETRA), el ritonavir se comporta como un inhibidor de la isoforma CYP3A4. La coadministración de la combinación (lopinavir/ritonavir) con otros agentes principalmente metabolizados por el CYP3A4 puede provocar una elevación de las concentraciones plasmáticas de

esos fármacos, que podrían aumentar o prolongar sus efectos terapéuticos, así como los eventos adversos (Cvetkovic y Goa, 2003).

La combinación ha demostrado inducir su propio metabolismo y aumenta la biotransformación de algunos fármacos metabolizados por las enzimas del CYP. Es de esperar que los agentes inductores de la actividad de CYP3A4 aumenten la depuración de lopinavir y por lo tanto reduzcan su concentración plasmática.

En la tabla 2 se resumen los efectos de otros fármacos sobre la farmacocinética de Lopinavir/ritonavir (ABC , C_{max} , C_{min}) y en la tabla 3 se describe el efecto de lopinavir/ritonavir sobre la farmacocinética de otros fármacos que pudieran coadministrarse de manera complementaria.

Agente co-administrado	Dosis del agente co-administrado(mg)	Dosis de KALETRA (mg)	n	Relación (combinación con/sin agente coadministrado de parámetros farmacocinéticos de lopinavir (90% IC); Sin efecto = 1.00		
				C_{max}	ABC	C_{min}
Amprenavir ¹	450 dos veces/d, 5 d	400/100 dos veces al día, 22 d	12	0.89	0.85	0.81
	750 dos veces/d, 5 d		10	(0.83, 0.95)	(0.81, 0.90)	(0.74, 0.89)
Atorvastatina	20 diarios, 4 d	400/100 dos veces al día, 14 d	12	0.90 (0.78, 1.06)	0.90 (0.79, 1.02)	0.92 (0.78, 1.10)
Efavirenz ²	600 c/noche, 9 d	400/100 dos veces al día, 9 d	11, 7*	0.97 (0.78, 1.22)	0.81 (0.64, 1.03)	0.61 (0.38, 0.97)
Ketoconazol	200 única dosis	400/100 dos veces al día, 16 d	12	0.89 (0.80, 0.99)	0.87 (0.75, 1.00)	0.75 (0.55, 1.00)
Nevirapina	200 diarios, 14 días; 2 veces al día, 6 días	400/100 dos veces al día, 20 d	5, 9*	0.95 (0.73, 1.25)	0.99 (0.74, 1.32)	1.02 (0.68, 1.53)
	7 ó 4 mg/kg diarios, 2 semanas; 2 veces por día 1 semana ³	300/75 mg/m ² dos veces por día, 3 semanas	12, 15*	0.86 (0.64, 1.16)	0.78 (0.56, 1.09)	0.45 (0.25, 0.81)
Pravastatina	20 diarios, 4 d	400/100 dos veces al día, 14 d	12	0.98 (0.89, 1.08)	0.95 (0.85, 1.05)	0.88 (0.77, 1.02)
Rifabutina	150 diarios, 10 d	400/100 dos veces al día, 20 d	14	1.08 (0.97, 1.19)	1.17 (1.04, 1.31)	1.20 (0.96, 1.65)
Rifampicina	600 diarios, 10 d	400/100 dos veces al día, 20 d	22	0.45 (0.40, 0.51)	0.25 (0.21, 0.29)	0.01 (0.01, 0.02)

Tabla 2. Efectos de otros fármacos sobre la farmacocinética de Lopinavir/ritonavir (KALETRA) en ABC , C_{max} y C_{min} .

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH-Cortisol/Cortisol

Agente co-administrado	Dosis del agente coadministrado (mg)	Dosis de KALETRA (mg)	n	Relación (con/sin KALETRA) de parámetros farmacocinéticos del agente coadministrado (90%IC); Sin efecto = 1.00		
				C _{max}	ABC	C _{min}
Amprenavir ¹	450 dos veces/d, 5 d 750 dos veces/d, 5d	400/100 dos veces al día, 22 d	12 10	0.32	0.56	1.93
				0.45	0.82	2.64
Atorvastatina	20 diarios, 4 d	400/100 dos veces al día, 14 d	12	4.67 (3.35, 6.51)	5.88 (4.69, 7.37)	2.28 (1.91, 2.71)
Efavirenz ²	600 c/noche, 9 d	400/100 dos veces al día, 9 d	11, 12*	0.91 (0.72, 1.15)	0.84 (0.62, 1.15)	0.84 (0.58, 1.20)
Etinilestradiol ¹	35 μ g diarios, 21 días (Ortho Novum [®])	400/100 dos veces al día, 14 d	12	0.59 (0.52, 0.66)	0.58 (0.54, 0.62)	0.42 (0.36, 0.49)
Indinavir ²	600 única dosis	400/100 dos veces al día, 10 d	11	0.45	0.81	2.93
Ketoconazol	200 única dosis	400/100 dos veces al día, 16 d	12	1.13 (0.91, 1.40)	3.04 (2.44, 3.79)	ND
Metadona	5 única dosis	400/100 dos veces al día, 10 d	11	0.55 (0.48, 0.64)	0.47 (0.42, 0.53)	ND
Nelfinavir ³ Metabolito M8	750 única dosis	400/100 dos veces al día, 11 d	5	0.57 ND	1.14 2.67	1.11 ND
Nevirapina	200 diarios, 14 días; 2 veces al día, 6 días	400/100 dos veces al día, 20 d	5, 6*	1.05 (0.72, 1.52)	1.08 (0.72, 1.64)	1.15 (0.71, 1.86)
Noretindrona	1 diario, 21 d (Ortho Novum [®])	400/100 dos veces al día, 14 d	12	0.84 (0.75, 0.94)	0.83 (0.73, 0.94)	0.68 (0.54, 0.85)
Pravastatina	20 diarios, 4 d	400/100 dos veces al día, 14 d	12	1.26 (0.87, 1.83)	1.33 (0.91, 1.94)	ND
Rifabutina Rifabutina+ 25-O- desacetil rifabutina ⁴	300 diarios, 10 d 150 diarios, 10 d	400/100 dos veces al día, 10 d	12	2.12 (1.89, 2.38)	3.03 (2.79, 3.30)	4.90 (3.18, 5.76)
				3.46 (3.07, 3.91)	5.73 (5.08, 6.46)	9.53 (7.56, 12.01)
Saquinavir ⁵	800 única dosis	400/100 dos veces al día, 10 d	11	1.25	1.20 a 2.64	3.55

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos del fármaco coadministrado en presencia de Lopinavir/ritonavir (KALETRA).

g) Reacciones Adversas

Los IP se han mostrado moderadamente tóxicos en la práctica clínica, aunque con perfiles de toxicidad distintos. En general lopinavir/ritonavir, se han asociado a la aparición de hiperglicemia, hiperlipidemia y lipodistrofia, caracterizándose esta última por obesidad central, pérdida de grasa periférica y menos frecuente el depósito de tejido graso en cuello/espalda (“joroba de búfalo”) (Carr A, 1991; Dietrich y col., 2001). En pacientes hemofílicos puede aumentar el riesgo de aparición de hemorragias espontáneas. También se aconseja vigilar la función hepática por la posible aparición de hepatitis. En esta combinación se asocian reacciones adversas consideradas de grado leve a moderadas. Las más frecuentes son astenia, dolor de cabeza, malestar gastrointestinal, náusea, diarrea, vómito, anorexia, trastorno del gusto, dolor abdominal y alteraciones neurológicas (FDA, 2000).

3. VARIABILIDAD EN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA

La respuesta a los fármacos puede variar de una persona a otra y en ocasiones, de un grupo étnico a otro (Meyer, 2000; Schwartz, 2002). Al administrar una misma dosis de fármaco a una amplia población de pacientes, se observa en muchos casos una amplia variabilidad biológica en la respuesta farmacológica. Esta variabilidad interindividual en la respuesta de numerosos fármacos constituye la causa fundamental que ciertas dosis sean eficaces para algunos pacientes y no efectivas para otros.

Existen un gran número de factores que pueden modificar la farmacocinética y, por ende la respuesta al tratamiento, y pueden clasificarse en: factores que dependen del paciente y factores que dependen del fármaco. En la tabla 4 se detallan algunos ejemplos de estos factores.

Factores relacionados con el paciente y relacionados con el fármaco que pueden afectar y modificar la farmacocinética.	
Factores que dependen del paciente: Factores Fisiológicos: Edad, peso, embarazo, lactancia, constitución genética y superficie corporal. Factores Patológicos: Insuficiencia renal, hepática, cardíaca, condiciones como neoplasias, fibrosis quística, entre otras. Factores Clínicos: Interacciones que modifican los procesos ADME, fluidoterapia y nutrición parenteral, cirugía, técnicas depurativas, entre otras. Hábitos de vida: Tabaco, ejercicio, alcoholismo.	Factores que dependen del fármaco: Dosis Duración Vía de Administración Forma de Dosificación Interacciones Intervalo Secuencia

Tabla 4.-Factores que pueden afectar y modificar la farmacocinética de los fármacos.

La presencia de uno o más de estos factores, hace necesario individualizar los tratamientos farmacológicos adaptándolos a las características de cada paciente (Holford, 2001). Como se ha dicho la variabilidad inter e intraindividual es debida a diferentes factores que afectan a la relación entre la dosis administrada y la intensidad y duración de los efectos farmacológicos observados. Esta variabilidad presenta dos componentes, uno farmacocinético (circulación del medicamento por el organismo) y otro farmacodinámico (efecto del medicamento) (Domínguez-Gil, 2000, Dresser, 2000).

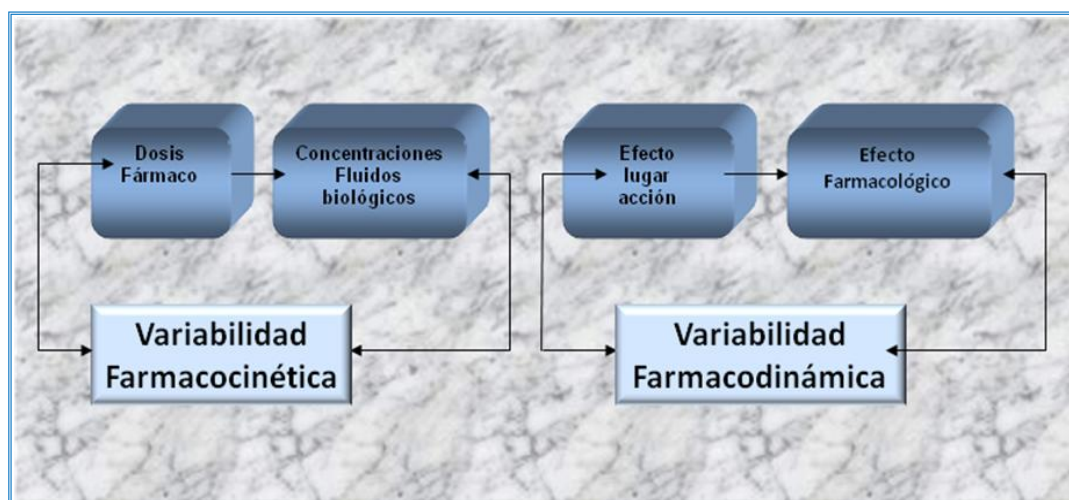


Figura 4. Componentes de la variabilidad en la respuesta farmacológica.

La variabilidad interindividual es bien conocida y justifica, desde hace décadas, los distintos esquemas posológicos (dosis) utilizados en diferentes poblaciones de pacientes: niños, ancianos, pacientes con insuficiencia renal, inmunocomprometidos, etcétera. La variabilidad intraindividual es menos conocida y a menudo ignorada como causa responsable de la aparición de cambios inesperados en la respuesta que se manifiesta preferentemente en tratamientos crónicos. La determinación sistemática de las concentraciones en sangre de algunos medicamentos sometidos a control en centros hospitalarios pone de manifiesto cambios, en ocasiones importantes, que pueden justificar respuestas erráticas (Domínguez-Gil, 2005).

De las variaciones farmacocinéticas que recientemente se han documentado, las de mayor impacto refieren al metabolismo de fármacos específicamente las relacionadas con la actividad de enzimas (entre ellas el CYP3A4) responsables de dicho metabolismo además de presentarse con mayor frecuencia.

3.1 El papel del CYP3A4 en el metabolismo de los fármacos

La isoenzima 3A4 es una subfamilia del grupo de enzimas que integran el citocromo P450, se estima que participa en la biotransformación de más del 50% de los fármacos de uso actual, mediante el metabolismo oxidativo (Benet, 1996). El CYP3A4 es la isoforma más abundante en hígado e intestino delgado (Wrighton y cols, 1989; Tanaka, 1998). En la figura 5 se muestra la distribución de diferentes isoenzimas localizadas en el hígado, así como el papel que desempeña cada una de ellas en el metabolismo de fármacos.

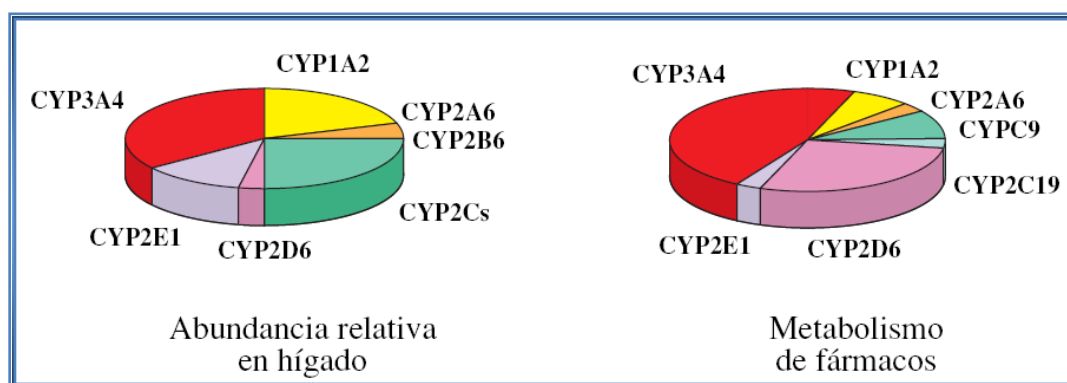


Figura 5. Las enzimas del CYP450 hepático implicadas en el metabolismo de fármacos (Donato y col.; Guengerich, 1999).

Las diferencias observadas entre las diferentes poblaciones o grupos étnicos, pueden estar generadas por diversos factores incluyendo la variabilidad en la expresión de las isoenzimas que conforman el CYP, por diferencias genéticas en los individuos, lo cual se debe a la presencia de polimorfismos genéticos que determinan la actividad metabólica de este complejo enzimático y se ha documentado que la presencia de estos polimorfismos varía importantemente entre razas y grupos étnicos (Burk, 2004; Schwartz, 2002).

Existen sustancias que pueden influir en la actividad del CYP3A4, las cuales son clasificadas como: Inhibidores, Inductores y sustratos de esta isoenzima. Los inhibidores del CYP3A4 pueden incrementar los niveles de fármacos que se metabolizan por esta vía. Los inductores del 3A4 pueden disminuir los niveles de los fármacos que se metabolizan por esta isoenzima. Los fármacos que se metabolizan por el CYP3A4, además de tener un metabolismo influido por sus inhibidores o por sus inductores pueden teóricamente, interaccionar entre ellos mismos por un mecanismo de inhibición competitiva que puede disminuir el metabolismo e incrementar los niveles plasmáticos de ambos medicamentos. Un ejemplo de esta interacción es la coformulación de lopinavir/ritonavir, que en este caso es favorable para alcanzar concentraciones mayores de lopinavir, mejorando esta combinación también la biodisponibilidad de lopinavir en presencia del inhibidor ritonavir.

En la tabla 5 se muestran algunos fármacos clasificados de acuerdo a su actividad sobre la enzima 3A4.

1. Fármacos		
1.1 <i>Analgésicos-anestésicos</i>	1.7 <i>Antifúngicos</i>	1.14 <i>Psicotrópicos</i>
Alfentanilna	Ketokonazol	Alprazolam
Etilmorfina	Itraconazol	Benzfetamina
Fentanil	Miconazol	Clozapina
Lidocaina	1.8 <i>Antihipertensivos</i>	Diazepam
1.2 <i>Antiarrítmicos</i>	Amlodipina	Midazolam
Amiodarona	Diltiazem	Zoldipén
Digoxina	Felodipina	Triazolam
Propafenona	Losartan	1.15 <i>Quimioterápicos</i>
Quinidina	Nircadipina	Busulfan
Verapamil	Nifedipina	Ciclofosfamida
1.3 <i>Antibióticos</i>	1.9 <i>Antihistamínicos</i>	Doxorubicina
Azitromicina	Astemizol	Etoposido
Claritromicina	Ebastina	Isofosfamida
Clindamicina	Loratidina	Paclitaxel
Dapsona	Mizolastina	Tamoxifen
Eritromicina	Terfenadina	Tenipoxide
Rifampicina	1.10 <i>Antiulcerosos</i>	Vinblastina
1.4 <i>Anticonvulsivantes</i>	Lansoprazol	Vincristina
Carbamazepina	Omeprazol	1.16 <i>Otros</i>
Clonazepam	1.11 <i>Anti-VIH</i>	Alpidem
Etoxisumida	Indinavir	Dextrometorfano
Zonisamida	Ritonavir	Etinilestradiol
1.5 <i>Antidepresivos</i>	Saquinavir	Haloperidol
Amitriptilina	1.12 <i>Inmunosupresores</i>	Metadona
Imipramina	Ciclosporina	Ondansetrón
Nefozodona	Rapamicina	Salmeterol
Sertralina	Tacrolimus	Simvastatin
1.6 <i>Antiinflamatorios</i>	1.13 <i>Opiáceos</i>	Teofilina
Acetaminofeno	Codeína	Terguride
Meloxicam	Morfina	Warfarina
2. Substratos endógenos		
Androstenediona	Dehidroepiandrosterona	Progesterona
Cortisol	Estradiol	Testosterona

Tabla 5. Fármacos y sustratos endógenos oxidados por la isoenzima 3A4 (Guengerich, 1999; De Wildt y cols., 1999).

3.2. El CYP3A4 en la población mexicana

En este mismo sentido, los estudios en la población mexicana han mostrado diferencias interétnicas en la farmacocinética de compuestos metabolizados por el CYP3A4, tales como la nifedipina (Castañeda y cols., 1996), la ciclosporina (Palma y cols., 1997) y el sildenafil (Flores Murrieta y cols., 2000). Los resultados en estos estudios muestran que los mexicanos poseen un metabolismo deficiente mediado por el CYP3A4, lo que se expresa en concentraciones plasmáticas más elevadas en mexicanos que en otras poblaciones (caucásicos) y por tanto la incidencia de efectos adversos de manera más temprana y con mayor frecuencia en la población mexicana.

Recientemente, se ha sugerido que algunas sustancias endógenas como es el caso del Cortisol que es metabolizado por la vía del CYP3A4, para usarse como marcadores de actividad de esta isoenzima, determinando la relación del metabolito y el Cortisol ($6\beta\text{OHCortisol/Cortisol}$) y observando a su vez el índice de actividad del CYP3A4 (Lykkesfeldt y cols., 1993; Joellenbeck, 1992; Totsuka, 1999; Mirghani, 2003). En este caso se evalúa la relación de la excreción urinaria del metabolito formado por esta vía el $6\beta\text{OHCortisol}$ y la sustancia endógena el Cortisol ($6\beta\text{OHCortisol/Cortisol}$). En algunos estudios llevados a cabo para ver la utilidad del uso de la relación del $6\beta\text{OH Cortisol/Cortisol}$ como indicativo de la actividad del CYP3A4, se ha visto que existe una buena correlación con los parámetros farmacocinéticos obtenidos como en el caso de midazolam (Yeates, 1996; Eeckhoudt, 2001) y metadona (Boulton, 2001). Sin embargo en otros estudios no ha sido un buen marcador como lo demostró un estudio realizado con glibenclamida en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Gutiérrez, 2006).

3.3. Variabilidad en las concentraciones plasmáticas de los IP.

La administración de los IP, grupo al que pertenece lopinavir/ritonavir, puede dar lugar a variabilidad en las concentraciones plasmáticas en un mismo paciente entre días, variabilidad interindividual e incluso diferencias en la fase menstrual con respecto a la fase folicular de la mujer (Adams y cols., 1998; Piscitelli, 1999). Esta variabilidad puede estar determinada por diversos factores que afectan la biodisponibilidad, la absorción y el metabolismo como son: las enfermedades gastrointestinales, la ingesta de comida, el diferente grado de unión a las proteínas plasmáticas como a la α -1-glicoproteína (proteína reactante de fase aguda) que puede incrementarse en periodos de estrés, lesión e infección, dando lugar a una sobreestimación de las concentraciones plasmáticas (Saldler y cols., 1999), la unión a la glicoproteína-P transportadora de fármacos, que modula la entrada de los IP al linfocito, (proteína ATP dependiente que se encuentra en diversos tejidos, en particular en las células epiteliales del tracto gastrointestinal, hígado y riñón), por lo que puede reducir la absorción oral, aumentar la eliminación hepática y renal, y ser factor limitante en la penetración al sistema nervioso central (Kim y cols, 1998; Profit y cols., 1999), e incluso la variabilidad interindividual en la actividad de la isoenzima CYP3A4, que puede estar determinada por la variabilidad genética (entre grupos de poblaciones), enfermedad hepática (la cirrosis puede reducirla), la edad (con la edad puede disminuir), sexo (algunos estudios señalan que la mujer presenta mayor actividad) y la terapia asociada con otros fármacos (Slain y cols., 2000). En un estudio realizado por Barry y cols, en pacientes que toman saquinavir, se comenta la diferencia encontrada en las concentraciones valle del fármaco, llegando a ser del orden de 10 veces (Barry y cols., 1998, López y col., 2001).

En la actualidad existen herramientas que permiten evaluar esta amplia variabilidad entre los individuos como es el caso del abordaje poblacional.

4. ABORDAJE POBLACIONAL DE LA FARMACOCINÉTICA

El desarrollo de los principios farmacocinéticos y su posterior aplicación en la evaluación del perfil de disposición de los fármacos ha permitido caracterizar adecuadamente sus procesos cinéticos de absorción, distribución y eliminación (Burton, 1985).

Los estudios farmacocinéticos tanto en su vertiente experimental como clínica, clásicamente, han estudiado el comportamiento de los fármacos en el individuo, inicialmente tenían como objetivo principal la determinación de parámetros asociados a un modelo determinístico capaz de describir la evolución temporal de sus concentraciones en diferentes fluidos biológicos. La experiencia acumulada con estos estudios ha permitido apreciar la gran variabilidad existente en los procesos farmacocinéticos dentro de una población de pacientes, a la cual se le había prestado escasa atención hasta hace poco más de 15 años.

Ello ha dado lugar a otro tipo de estudios, cuyo objetivo es cuantificar el efecto de diferentes factores, tales como la edad, el peso, el sexo, las patologías asociadas o las interacciones, sobre los procesos de disposición cinética, con el fin de minimizar la extensión de esa variabilidad, en principio inexplicable. Los resultados obtenidos son útiles en la clínica por ejemplo para establecer las pautas de dosificación en determinados grupos de pacientes (niños, ancianos, insuficientes renales, inmunocomprometidos, etc.).

Esta evolución ha conducido a un nuevo enfoque de los estudios farmacocinéticos. Así, la estimación de los parámetros farmacocinéticos individuales ha dado paso a la determinación del comportamiento cinético en una población determinada. De esta manera surge el concepto de *farmacocinética de poblaciones*, que trata de sistematizar la información sobre la cinética de disposición de fármacos en grupos de pacientes (Aarons, 1991).

En este sentido, la farmacocinética poblacional se define como el estudio de la variabilidad inter e intraindividual de las concentraciones séricas que alcanzan los fármacos, cuando se administran en regímenes de dosificación estándar a un grupo amplio de pacientes con características fisiopatológicas y clínicas definidas (Aarons, 1991; Mandema, 1995).

4.1 Objetivos de la Farmacocinética Poblacional.

De acuerdo con esta definición los objetivos fundamentales de la farmacocinética poblacional podrían resumirse en los siguientes: (Sheiner y cols., 1997).

- a) Determinar el valor medio de los parámetros farmacocinéticos en los distintos grupos de poblaciones;
- b) Identificar y evaluar las relaciones cuantitativas que existen entre los diferentes factores fisiopatológicos, clínicos y los parámetros cinéticos, y
- c) Evaluar la variabilidad inter e intraindividual que existe en el comportamiento cinético con el objeto de conseguir una utilización más eficaz y segura de los medicamentos.

4.2. Estructura de un Modelo Poblacional

Un modelo de población está constituido por un *modelo estructural* y un *modelo estadístico*. Estos componentes se pueden observar en la figura 6.

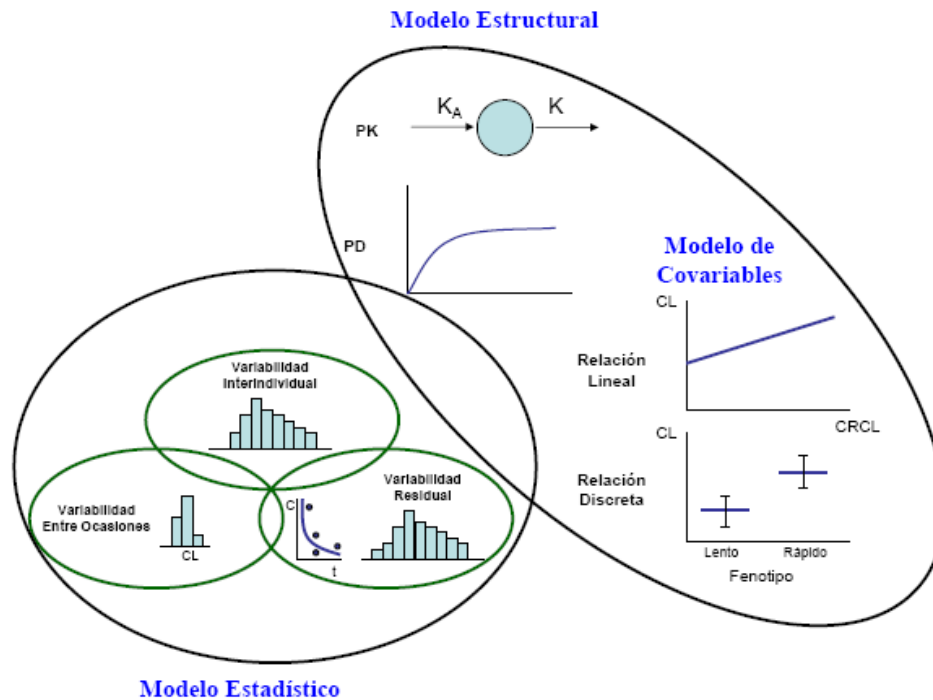


Figura 6. Componentes de un modelo poblacional: modelo estructural y modelo estadístico.

El *modelo estructural* es el que define el comportamiento farmacocinético en el individuo típico (medio) de la población en función de ciertos factores capaces de alterarlo. Está constituido a su vez por un modelo farmacocinético y uno de regresión. El *modelo farmacocinético* será el que identificará los parámetros que caracterizan el comportamiento medio, suele ser a su vez un modelo farmacocinético convencional, habitualmente compartimental aunque cada vez con mayor frecuencia se utilizan modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos. El *modelo de regresión* correlaciona los parámetros del modelo farmacocinético (depuración, volumen de distribución, etc.) con variables continuas (edad, peso, aclaramiento de creatinina, etc.) y/o categóricas (sexo, diagnóstico, hábitos, etc.) identificadas en el modelo de población. Para poder establecer un modelo de regresión es necesario tener definidas las variables (habitualmente se denominan covariables) que se

correlacionan en un intervalo amplio (si se trata de covariables continuas) o en una proporción suficiente (si se trata de covariables categóricas).

El modelo de regresión corresponde a la relación lineal entre los parámetros farmacocinéticos básicos del modelo como la depuración, la absorción y el volumen aparente de distribución con covariables demográficas o clínicas de los pacientes como la depuración de creatinina y el peso. Los parámetros del modelo estructural son llamados habitualmente *parámetros de efectos fijos* al ser comunes a todos los individuos. La mayor dificultad al desarrollar modelos de población está en identificar y cuantificar las diferentes covariables que se correlacionan con los parámetros farmacocinéticos del modelo (Domínguez-Gil, 2000; Herrera Carranza, 2006; Martínez-Lanao, 2006).

El segundo componente fundamental de un modelo de población es el *modelo estadístico*. Dicho modelo cuantifica la magnitud de la variabilidad farmacocinética interindividual (parámetros farmacocinéticos) y residual (concentraciones).

La variabilidad interindividual cuantifica las desviaciones de los parámetros de cada individuo respecto al valor típico de la población.

La variabilidad intraindividual (residual) cuantifica las desviaciones de las predicciones de cada respuesta (concentraciones plasmáticas). Es decir, describe el tipo de distribución estadística de los parámetros farmacocinéticos o de las concentraciones séricas en relación con sus valores medios y cuantifica mediante la varianza del parámetro o mediante la varianza de la concentración plasmática dicha distribución. En la figura 7 se observa la variabilidad interindividual de un parámetro farmacocinético en este caso el volumen de distribución (Vd) la cual es cuantificada por un error de magnitud η . Asumiendo una distribución estadística de tipo gaussiano, el error interindividual del

parámetro farmacocinético presenta un valor medio que tiende a cero y una varianza interindividual de magnitud σ^2_{vd} , como se observa en dicha la figura 7.

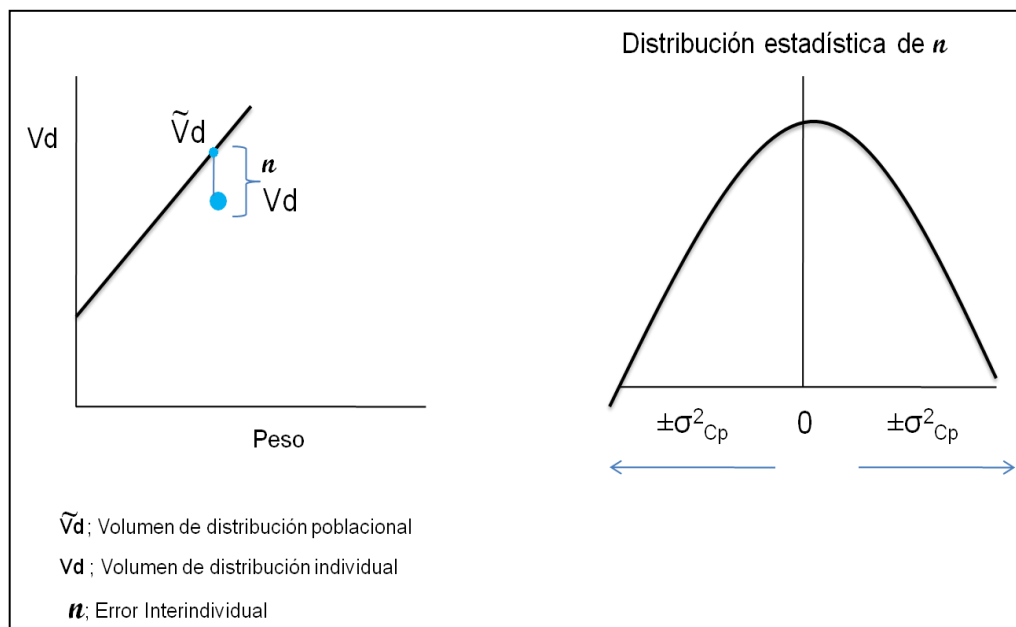


Figura 7. Variabilidad interindividual en los parámetros FC. η es la diferencia entre el parámetro para un individuo y el valor típico de este parámetros para la población. La distribución de η para todos los individuos dentro de la población puede ser descrita por el valor medio (cero) y la varianza de la distribución σ^2 (Grasela y Sheiner, 1991; Herrera Carranza, 2006).

La variabilidad residual cuantifica la magnitud de los errores entre las concentraciones observadas en el individuo y las predichas utilizando los parámetros farmacocinéticos individualmente obtenidos. La variabilidad residual incluye entre otras, la variabilidad intraindividual, el error analítico y el error en la especificación del modelo.

Los parámetros de varianza son denominados habitualmente *parámetros de efectos aleatorios*. Si nos referimos a la variabilidad interindividual, hablamos de efectos aleatorios interindividuales y si hablamos de la variabilidad residual se denominan parámetros de efectos aleatorios residuales (Herrera Carranza, 2006; Martínez-Lanao, 2006; Domínguez-Gil y cols., 2000).

4.3. Modelos Poblacionales

Uno de los aspectos más interesantes de la farmacocinética poblacional es la construcción de un modelo de población que pueda ser utilizado posteriormente en la práctica clínica para la individualización de la farmacocinética y de la posología. Lo que se busca es que las concentraciones séricas del fármaco en el paciente en monitoreo se encuentren dentro de la distribución de la probabilidad de las concentraciones séricas del fármaco, en la población de referencia como se observa en la figura 8.

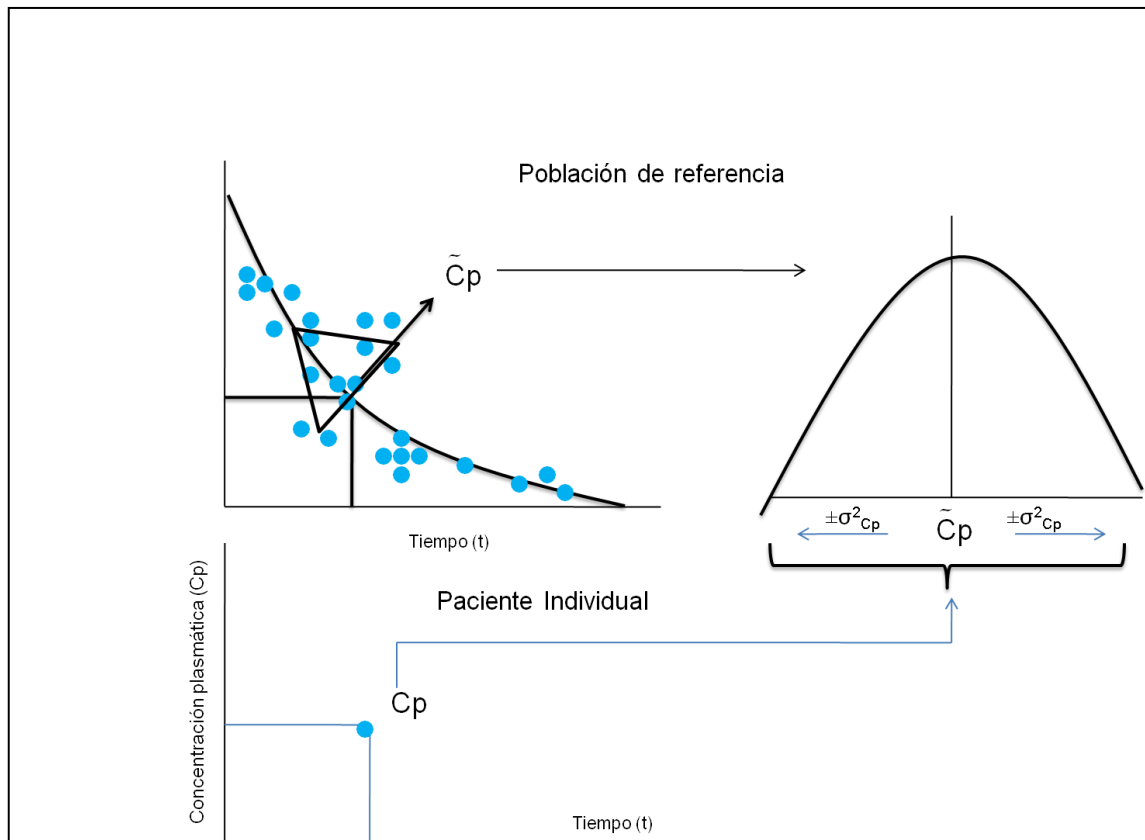


Figura 8. Distribución de las concentraciones de los individuos de una población de referencia (Grasela y Sheiner, 1991; Herrera, 2006; Martínez-Lanao, 2006).

Aunque se han desarrollado diversos métodos matemáticos-estadísticos para la construcción, los métodos más habitualmente utilizados en la estimación de parámetros de población son los siguientes: (Domínguez-Gil y cols., 2000; Herrera Carranza, 2006; Martínez, 2006).

4.3.1. *Método en dos fases*: Como su propio nombre lo indica se realiza en dos fases. En la primera fase se realiza por separado la cinética de cada individuo ajustado por regresión no lineal la curva de concentración/tiempo al modelo cinético seleccionado utilizando un programa convencional de regresión no lineal mediante mínimos cuadrados ponderados. En la segunda fase se analizan estadísticamente el conjunto de los parámetros individuales obtenidos en la primera fase con el objeto de estimar los valores medios de los parámetros (efectos fijos) y sus correspondientes varianzas (efectos aleatorios).

4.3.2. *Modelos de efectos mixtos*: Como alternativa a los modelos en dos etapas están los llamados Modelos de Efectos Mixtos. En estos modelos la resolución del modelo se lleva a cabo en una sola etapa. Son métodos computacionales y utilizan programas específicos. El ordenador estima simultáneamente el conjunto de los parámetros de efectos fijos (parámetros farmacocinéticos) y aleatorios (variabilidad interindividual y residual) que tengan una mayor probabilidad de producirse, por eso estos métodos se denominan métodos de máxima probabilidad. El concepto de "efectos mixtos" se debe a la estimación simultánea en el mismo ajuste de parámetros de efectos fijos y parámetros aleatorios tanto inter como intraindividuales.

En la práctica, el método de dos fases se utiliza cuando se dispone de muchos datos de nivel sérico para cada individuo por el contrario, los métodos de efectos mixtos se reservan para aquellas poblaciones donde el número de datos de nivel sérico por cada individuo es relativamente escaso (Domínguez-Gil y cols., 2000; Herrera Carranza, 2006; Martínez-Lanao, 2006).

4.4. *Parámetros Poblacionales*

El perfil cinético de un fármaco en una determinada población se caracteriza por tres tipos de parámetros poblacionales (Sheiner y cols., 1984; Grasela y cols, 1991):

1. *Parámetros de efectos fijos.* Cuantifican el comportamiento cinético del fármaco en la población mediante la caracterización de parámetros farmacocinéticos medios y de sus posibles relaciones con ciertos factores fisiopatológicos y clínicos.

Por ejemplo, para un fármaco eliminado por vía renal y que se ajusta a un modelo monocompartimental, estos parámetros corresponderían a la depuración, al volumen de distribución medio o a los coeficientes de las relaciones establecidas entre estos parámetros y otros factores tales como el aclaramiento de creatinina, utilizado como medida del grado de función renal o la edad.

Estos parámetros se convierten en una herramienta útil para la toma de decisiones clínicas y de investigación, ya que permiten desarrollar una recomendación "*a priori*" de la dosificación para una población específica de pacientes (Tod, 1998).

2. *Parámetros de efectos aleatorios interindividuales.* Cuantifican la magnitud de la variabilidad cinética interindividual, es decir, describen el tipo de dispersión de los parámetros farmacocinéticos en relación a sus valores medios y determinan, mediante las varianzas, la magnitud de la misma.

La magnitud de la variabilidad en un parámetro farmacocinético puede ser un indicador útil para la seguridad del fármaco. De hecho una aproximación para definir el índice terapéutico de un medicamento administrado de forma crónica puede ser la relación entre el ámbito de concentraciones plasmáticas

en estado estacionario y el valor de la variabilidad interindividual de la depuración. Así en dos poblaciones con los mismos valores medios de parámetros farmacocinéticos, pero con diferentes grados de variabilidad interindividual, al administrar una misma dosis estándar se obtendrán efectos farmacológicos con mayor variabilidad en la población con mayor variabilidad cinética en sus parámetros. Por esta razón, los parámetros de efecto aleatorio interindividual permiten evaluar la incertidumbre, cinética o dinámica, asociada a una recomendación posológica realizada, tanto a priori como a posteriori, en un individuo que pertenece a la población para la cual se ha caracterizado su comportamiento cinético. Desde el punto de vista experimental, estos parámetros son los principales determinantes del tamaño de la muestra de pacientes pertenecientes a la población de estudio necesarios para la correcta caracterización del comportamiento poblacional (Sheiner, 1991).

3. Parámetros de efectos aleatorios intraindividuales. Cuantifican la magnitud de la variabilidad residual que incluye entre otras, la variabilidad cinética intraindividual, el error analítico, los posibles errores en la especificación o selección del modelo, el error en los tiempos de muestreo, etc. Por ejemplo el error residual puede ser proporcional a la concentración y presentar un coeficiente de variación del 15%. Estos componentes de la varianza residual no se pueden estimar fácilmente por separado, ya que para ello se necesitaría un número importante de datos clínicos suficientemente detallados y completos. Su principal utilidad reside en poder detectar la fuente de error y su magnitud (Sheiner, 1991).

5.- ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS POBLACIONALES

EL NONMEM es una herramienta estadística en el análisis de datos poblacionales. El desarrollo de métodos para utilizar datos procedentes de la rutina clínica ha sido muy activo. En la actualidad el más utilizado, contrastado y evaluado es el método de primer orden implementado en el programa

NONMEM (*NONlinear Mixed Effects Model*). Es un programa en el que se considera un modelo de efectos mixtos con aproximación paramétrica y un método de primer orden, designado porque se utiliza el primer término de la serie de Taylor como forma de linealizar la entrada de los parámetros de efectos aleatorios en el modelo farmacoestadístico considerado (es decir el método es lineal con respecto a los efectos aleatorios).

5.1. Bases para generar un modelo poblacional con el NONMEM

Basándose en resultados obtenidos en estudios de simulación y datos reales, Grasela (Grasela, 1986) propuso algunas sugerencias relacionadas con el tipo de información que se requiere para que un análisis de datos, realizado con el NONMEM pueda originar datos fiables:

- Los tiempos de muestreo deben ser totalmente aleatorios de manera que se encuentre representada adecuadamente la evolución de las concentraciones del fármaco a lo largo del intervalo de dosificación

- Dependiendo del número de parámetros que se deseen estimar es aconsejable la obtención de un mínimo de 2 a 4 datos de concentración por individuo. También son válidos, aquellos pacientes con un número inferior de datos de concentración, siempre que no constituyan la mayoría, ya que siempre pueden proporcionar alguna información adicional.

- Incluir un mínimo de 50 pacientes, suficientemente representativos de la población que reciben el fármaco con fines terapéuticos.

- Proceder a una recolección exhaustiva de datos demográficos y clínicos (edad, sexo, patologías asociadas, etc.) de todos los pacientes incluidos en la población objeto de estudio, para que sea posible analizar el efecto de cada uno de los factores en el perfil cinético del fármaco en cuestión. Es necesario,

además, que cada uno de estos factores este suficientemente representado en la población con objeto de valorar su verdadera influencia.

Además del NONMEN se han desarrollado otros programas que incluyen modelos de efectos mixtos con aproximación paramétrica entre los que cabe destacar: POPKAN, que implementa técnicas bayesianas para el estudio del comportamiento farmacocinético y farmacodinámico poblacional, y P-PHARM. La metodología estadística para el análisis poblacional incluye también estrategias no paramétricas como el método NPEM (Non Parametric Expectation Maximization) (Schumitzky, 1991).

II. Planteamiento del Problema

Actualmente, la combinación de tres o más fármacos antirretrovirales constituye el tratamiento de elección para la infección por el VIH. Este esquema de tratamiento retrasa la progresión clínica de la enfermedad, disminuye los ingresos hospitalarios y los costos asociados, aumentando significativamente la supervivencia de los pacientes infectados.

El tratamiento antirretroviral busca disminuir la replicación del virus por debajo de los límites de detección de los métodos actualmente disponibles durante el mayor tiempo posible. Hasta la fecha en nuestro país se dispone de fármacos antirretrovirales que pertenecen a cuatro grupos (Inhibidores nucleósidos y no nucleósidos de la transcriptasa reversa, inhibidores de proteasa e inhibidos de fusión).

La administración de los inhibidores de proteasa, grupo del que forma parte lopinavir/ritonavir, puede dar lugar a variabilidad en las concentraciones plasmáticas en un mismo paciente o en un grupo de pacientes, variabilidad que puede estar determinada por diversos factores que afectan a la biodisponibilidad, metabolismo y eliminación de la combinación lopinavir/ritonavir.

Dadas las diferencias descritas entre individuos y diferentes grupos de individuos, aunado a la limitada información de estudios farmacocinéticos poblacionales de la combinación lopinavir/ritonavir es importante establecer por un lado, las características farmacocinéticas de estos compuestos (parámetros farmacocinéticos) y por otro lado establecer si es posible correlacionar esta información con la actividad del CYP3A4 hepático medido a través de la excreción urinaria del Cortisol y su metabolito, el 6 β OHCortisol mediante un índice de actividad, producto de la relación entre las concentraciones urinarias del 6 β OHCortisol/Cortisol.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

III. Justificación

La formulación combinada de lopinavir/ritonavir, de uso amplio en la población mexicana VIH positivo, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento para la infección por VIH. Sin embargo, debido a la limitada información de estudios farmacocinéticos poblacionales en mexicanos y tomando en cuenta que estos fármacos se metabolizan por la vía del CYP3A4, es importante determinar la variabilidad biológica en nuestra población de los parámetros farmacocinéticos de estos compuestos y el posible establecimiento de una relación, a través de la excreción urinaria del 6β OH Cortisol y del Cortisol con la vía metabólica de la isoenzima CYP3A4.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

IV. Hipótesis

La excreción del 6 β OH Cortisol entre el Cortisol, es un buen marcador de la actividad metabólica del CYP3A4 hepático *in vivo*, y es una covariable que puede explicar la variabilidad en la farmacocinética poblacional de algunos fármacos que se metabolizan por esta enzima como es el caso de lopinavir/ritonavir.

Se planteó este estudio para confirmar la hipótesis, ya que estudios realizados recientemente, describen que las características farmacocinéticas de algunos fármacos metabolizados por el CYP3A4 son diferentes en nuestra población probablemente debido a un menor metabolismo.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

V. Objetivos

5.1. Objetivo General

1. Caracterizar la Farmacocinética Poblacional de Lopinavir/Ritonavir en pacientes infectados con el VIH y su posible correlación con la excreción urinaria del $6\beta\text{OH}$ Cortisol/Cortisol.

5.2. Objetivos Particulares

1. Realizar el montaje y la validación del método analítico para la determinación de Lopinavir/ritonavir en plasma humano y del $6\beta\text{OHCortisol}$ en orina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
2. Realizar las determinaciones de lopinavir/ritonavir en plasma y de $6\beta\text{OHCortisol}$ en orina.
3. Realizar las determinaciones de cortisol en orina mediante reacción inmunológica a través de la técnica de ELISA.
4. Establecer el modelo de farmacocinética poblacional que permita caracterizar los parámetros cinéticos poblacionales y que permita describir los factores que contribuyen significativamente a la variabilidad entre sujetos, incluyendo la actividad del CYP3A4 hepático en pacientes infectados por VIH.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

VI. Metodología

A. Diseño del Estudio.

6.1.1. Clasificación del Estudio.

De acuerdo a la finalidad el estudio es *analítico*, por la secuencia temporal es *longitudinal*, tomando en cuenta la asignación de los factores del estudio es *observacional* y en función, a su inicio en relación a la cronología de los hechos es *prospectivo*.

6.1.2. Población de Estudio

Pacientes ambulatorios, mexicanos con el diagnóstico de VIH positivo, atendidos en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), los cuales, en su esquema de tratamiento antirretroviral de abril a noviembre de 2008, se encontró la coformulación lopinavir/ritonavir (Kaletra). Que cumplieron los criterios de inclusión para participar en el estudio.

6.1.3. Criterios de Inclusión

Pacientes con diagnóstico de VIH positivo, de ambos géneros, adultos, que en el esquema de tratamiento antirretroviral recibieron la coformulación de lopinavir/ritonavir, en cualquiera de sus formas farmacéuticas (cápsulas o tabletas) y que contaron con las pruebas de laboratorio clínico e infectología.

6.1.4. Criterios de No Inclusión

Pacientes en etapa de niñez, pacientes hospitalizados o quienes presentaron alguna limitación física para permanecer durante el procedimiento completo del estudio el día de participación en el mismo.

6.1.5. Criterios de Eliminación

Pacientes cuyo horario de toma de muestra se desconoció o bien existió confusión en el rótulo de alguna muestra tomada.

6.1.6. Variables de estudio

- *Variable dependiente:*

Concentraciones plasmáticas de lopinavir/ritonavir ($\mu\text{g/ml}$)

- *Variable independiente:*

Tiempo (h)

- *Covariables categóricas para realizar el modelo farmacocinético:*

Género y la formulación farmacéutica (FF)

- *Covariables continuas para realizar el modelo farmacocinético:*

Edad (años), Peso (Kg), Talla (m), Índice de masa corporal (kg/m^2), la concentración de ritonavir CRTV y la correlación de 6 β OH Cortisol/Cortisol.

B. Fármacos de estudio.

Para el desarrollo, montaje y validación de los métodos analíticos por HPLC se utilizaron los siguientes estándares:

- ❖ *Lopinavir.* El estándar del lopinavir, fue donado por la empresa Abbott Laboratories, a través de la clínica de infectología CIENI.
- ❖ *Ritonavir.* El estándar del ritonavir grado USP, fue comprado a través del proveedor científico.
- ❖ *6-Betahidroxycortisol.* El estándar del 6 β OH Cortisol grado analítico, se adquirió a través de la empresa Sigma Aldrich Química, S.A.

C.- Reactivos.

Para los desarrollo de los métodos de análisis por HPLC, se utilizaron reactivos grado analítico entre ellos sales, KH_2PO_4 (fosfato monobásico de potasio), NaH_2PO_4 (fosfato monobásico de sodio), NaOH (hidróxido de sodio), Na_2CO_3 (carbonato de sodio cristal) y ácidos como ácido acético glacial. También se utilizaron solventes grado cromatográfico, como Acetonitrilo, Acetato de Etilo, Metanol, Etanol, Éter Etilico Anhidro y n-Pentano, todos ellos de la marca Baker (Mallinckrodt Baker S.A de C.V., México); el agua desionizada se obtuvo a través de un sistema millipore (Millipore, Francia), NANOpureUV (Burnstead thermolyne, EUA).

D. Equipos

Para determinar las concentraciones en plasma de lopinavir/ritonavir y las de $6\beta\text{OHCortisol}$ en orina se utilizó Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y para determinar las concentraciones de Cortisol en orina se utilizó un KIT de Cortisol para determinación por ELISA. A continuación se describen las características de los equipos utilizados.

▪Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución marca Waters modelo Alliance 2695, acoplado a un detector Ultravioleta Visible de longitud de onda variable, marca Waters modelo 2487 (Waters Corporation, Milford, MA, E.U.A.). Se utilizaron dos columnas cromatográficas: Columna Cromatográfica marca Waters modelo Symmetry C_{18} , 5 μm de tamaño de partícula, 3.9 mm de diámetro y 150 mm de longitud y Columna Cromatográfica marca PRINCETON C_{18} , 5 μm de tamaño de partícula, 3.9 mm de diámetro y 150 mm de longitud. El registrador de sistema de cómputo fue el Software Analítico Empower, mediante el cual se procesaron los datos del cromatógrafo. En la figura 9 se muestra el cromatógrafo de líquidos de alta resolución utilizado en el estudio.



Figura 9.- Imagen del cromatógrafo de líquidos de Alta Resolución modulo Alliance 2695, utilizado en el análisis de las muestras del estudio.

▪Kit de Cortisol (Orina) ELISA “Inmunoensayo Enzimático para la determinación cuantitativa de Cortisol en orina humana” de la línea IBL (laboratorio Inmuno biológico laboratorios). El Kit para medir Cortisol en orina proporcionó un “microplato” con 80 pozos (con el anticuerpo para Cortisol) para el análisis de muestras, soluciones estándar de concentraciones conocidas de 0 a 500 ng/ml de Cortisol, buffer de incubación, el conjugado, el sustrato-TMB, una solución STOP y dos concentraciones conocidas como puntos control a un nivel bajo y alto respectivamente. Las lecturas de las muestras de orina de los pacientes VIH positivos para la determinación de Cortisol se realizaron en un equipo modelo Spectra Classic marca Tecan. Las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 450 nm. En la figura 10 se muestra el KIT para determinar el Cortisol en muestras de orina y los consumibles incluidos. También se

muestra el equipo de lectura para los ensayos de ELISA en donde se leyeron las muestras.



Figura 10. Kit de Cortisol utilizado en el análisis de muestras y el equipo marca TECAN modelo SPECTRA CLASSIC utilizado para las lecturas de las muestras.

E. Validación de los Métodos Analíticos.

6.2. Validación de los Métodos Analíticos para la determinación de las concentraciones de lopinavir y ritonavir en plasma.

La validación de un método analítico nos permitió demostrar que el método fué apropiado para el propósito para el cual fue creado. Esta validación se apegó a lo dispuesto en la NOM-177-SSA1-1998 (Secretaría de Salud, 1998). En la validación de los métodos analíticos se evaluó la selectividad, la linealidad, la precisión y la exactitud del método en el intervalo de calibración establecido. Adicionalmente se evaluaron una serie de pruebas extras que permitieron información importante del compuesto de interés como fueron las pruebas de estabilidad y de tolerancia del método analítico.

6.2.1. Condiciones Cromatográficas.

Se utilizó como fase móvil, una mezcla de 55% de amortiguador de KH₂PO₄ 0.05 M a pH 5.7 (ajustado con NaOH 1 M) y 45% de acetonitrilo. El flujo de trabajo fue 1ml/min, la longitud de onda a la que se determinó el compuesto fue de 215 nm. La temperatura de la columna fue de 40 °C y la temperatura de la muestra en el inyector fue de 5 °C. El proceso de semipurificación de muestras seleccionado se describe a continuación:

6.2.2. Proceso de semipurificación de muestras.

- En un tubo cónico de 15 ml se agregaron 500 μ L de plasma (libre de fármaco), se le adicionaron 50 μ L del estándar LPV/RTV, se agitó en un vortex por 20 segundos.
- Se adicionaron 250 μ L de Na₂CO₃ 1 M.
- Se agregaron 3 ml de éter etílico anhidro, se taparon los tubos perfectamente y se agitaron en un vortex durante 1 minuto a máxima velocidad.
- Se centrifugaron a 3500 rpm, durante 10 minutos y posteriormente se congelaron 10 minutos.
- Se transfirió el solvente (que se encontraba en la parte superior del tubo) a un tubo de boca ancha.
- Se evaporó en un baño maría bajo corriente de nitrógeno hasta la sequedad.

- El extracto seco, se reconstituyó con 200 μL de fase móvil, los tubos reconstituidos se agitaron en un vortex a máxima velocidad y se colocó la muestra en un vial de alto recobro.
- Finalmente se inyectaron 25 μL de los extractos al sistema cromatográfico.

6.2.3. Validación

a). Selectividad. Esta prueba permitió evaluar si el método fué capaz de separar al compuesto de interés en el análisis, de otras sustancias exógenas o endógenas que pudieron estar presentes en la matriz biológica e interferir en la cuantificación. Para la realización de esta prueba se formó un pool de plasma (al menos 6 plasmas libres de fármaco provenientes de 6 sujetos distintos) y se realizó una semipurificación de las muestras con el proceso de extracción previamente descrito. También se evaluaron fármacos de uso común, que no requieren receta médica como es en el caso de algunos analgésicos como el acetaminofen, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico entre otros, así como las interferencias con anticoagulantes como la heparina.

En la figura 11 se muestran los resultados de la prueba de selectividad a través de los cromatogramas del método analítico para la determinación de LPV y RTV. El cromatograma “A” muestra concentraciones en solución (estándares) de LPV y RTV. En el cromatograma “B” se presenta una muestra de plasma libre de fármaco y se puede observar que no hay interferencia alguna en el tiempo de retención de LPV y RTV. El cromatograma “C” presenta una muestra de plasma cargada con concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPV y RTV y finalmente el cromatograma “D” presenta el análisis de la muestra de un participante VIH positivo en tratamiento con LPV y RTV.

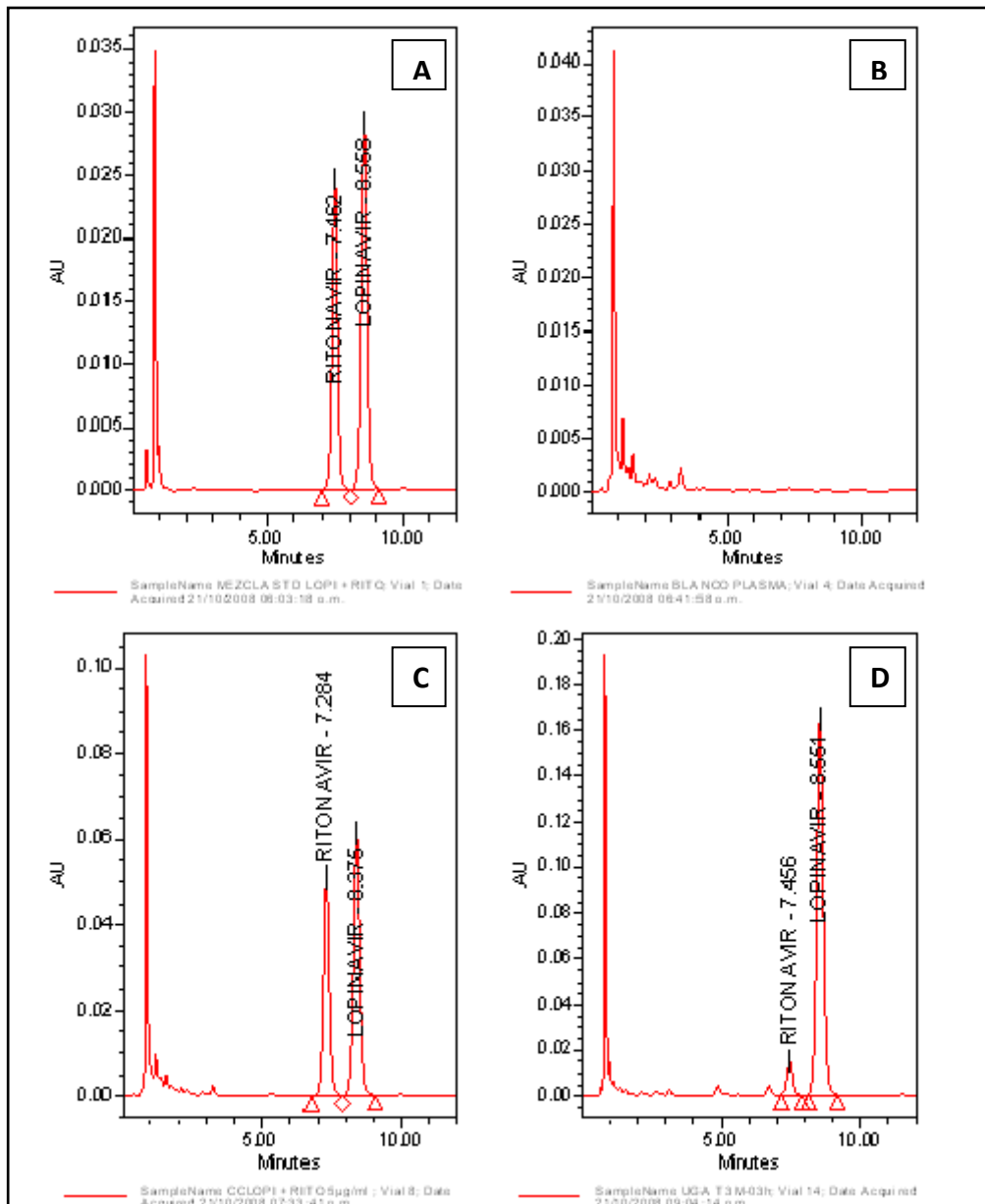


Figura 11. Cromatogramas. En la imagen (A) se encuentra el cromatograma de una inyección de soluciones estándar de lopinavir/ritonavir; en la imagen (B) se observa una muestra de matriz biológica (plasma) libre de fármaco, en la imagen (C) se observa una muestra de plasma cargada con una concentración de la curva de calibración de lopinavir/ritonavir. En la imagen (D) se observa la inyección de una muestra de un paciente en tratamiento con lopinavir/ritonavir previamente extraída.

El criterio de aceptación para esta prueba, fue que el plasma libre de fármaco no presentó interferencias en el tiempo de retención para lopinavir y ritonavir.

b). Intervalo de Calibración. Las concentraciones empleadas en la curva de calibración para la validación del método analítico se eligieron de acuerdo a las concentraciones que se esperaban alcanzar en el estudio farmacocinético en función de la dosis administrada y de los datos reportados en la literatura. En este estudio la curva de calibración estuvo constituida por los siguientes puntos 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 25 y 50 µg/ml de LPV y RTV en plasma. También se utilizaron tres controles de calidad cuyas concentraciones están dentro de este intervalo de calibración las cuales fueron: 0.4, 4 y 40 µg/ml de LPV y RTV. Las soluciones de trabajo para LPV y RTV se prepararon en una mezcla de metanol: agua en proporciones 90:10 respectivamente.

c). Linealidad. Se define como la relación matemática que existe entre la concentración a evaluar con respecto a la observada. En la mayoría de los casos la relación matemática que se sigue entre la concentración y la respuesta (absorción de la luz) es la ecuación de una línea recta, por ello el término de linealidad.

Se evaluó la linealidad del método en un intervalo de concentraciones de 0.1 a 50 µg/ml de LPV y RTV de forma simultánea. Para ello se analizaron 6 curvas de calibración utilizando plasma libre de fármaco, siguiendo el proceso de semipurificación descrito anteriormente. El método analítico demostró ser lineal en el intervalo de calibración de trabajo 0.1 a 50 µg/ml de LPV y RTV. Es decir al graficar las respuestas (alturas) en función de la concentración, estas fueron descritas con la ecuación $y=mx+b$. Donde la intersección (b) fue de -0.033, la pendiente (m) 1.056 y el coeficiente de correlación (r) fue de 0.999 para lopinavir. En la figura 12 se muestra la gráfica de linealidad de las concentraciones de LPV.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6βOHCortisol/Cortisol

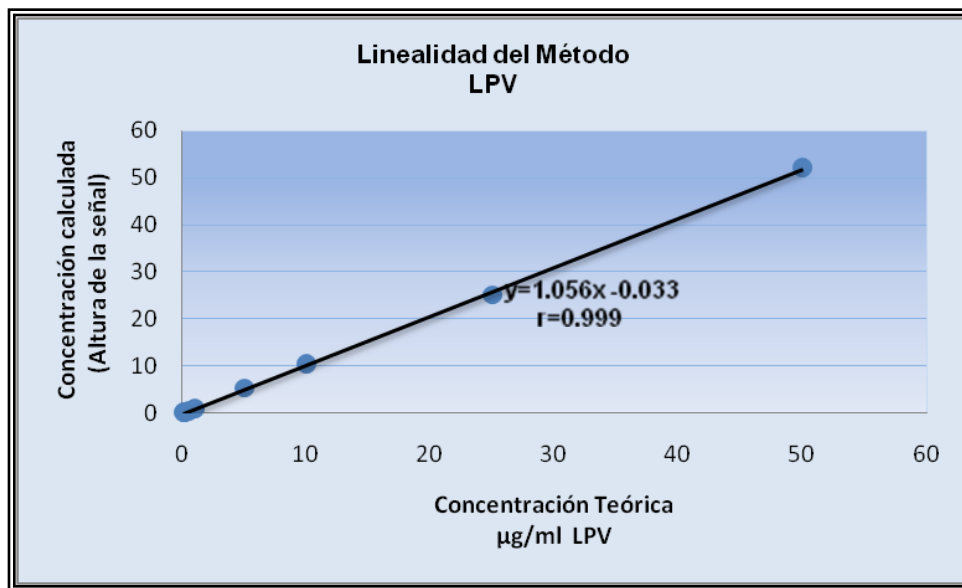


Figura 12. Linealidad del método analítico para la determinación de lopinavir, cada uno de los puntos representa los promedios de las concentraciones del intervalo de calibración.

Para ritonavir se obtuvo una pendiente de 1.075, una intersección de -0.04 y un coeficiente de correlación de 0.999. En la figura 13 se muestra la gráfica de la prueba de linealidad del método para ritonavir.

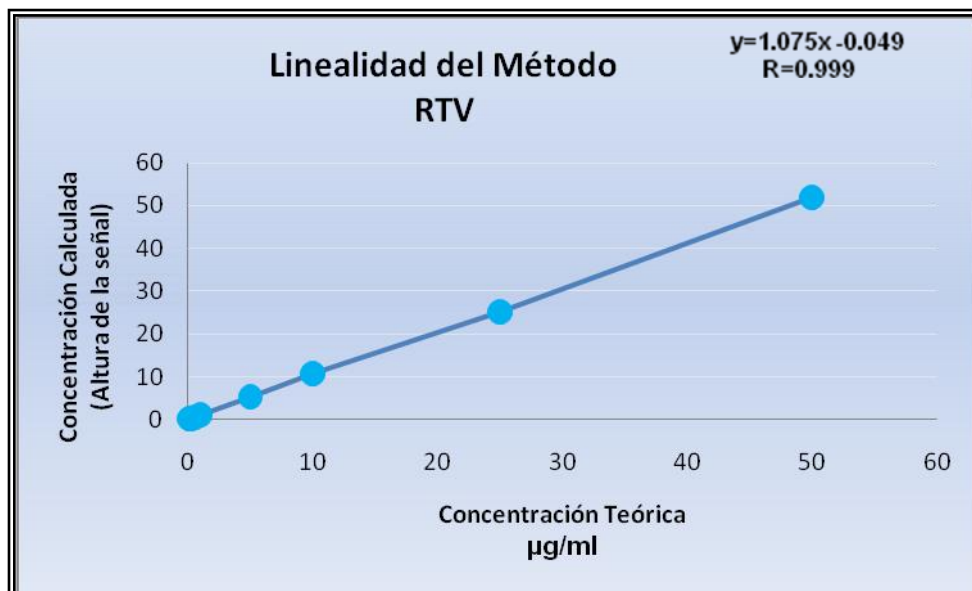


Figura 13. Linealidad del método analítico para la determinación de ritonavir, cada punto representa los promedios de las concentraciones del intervalo de calibración.

El criterio de aceptación de esta prueba fue: un coeficiente de variación menor o igual al 20% para la concentración más baja de la curva de calibración y coeficiente menor o igual al 15% para el resto de los puntos del segundo al último, además de un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99.

d). **Repetibilidad.** Esta prueba permitió evaluar la concordancia entre los valores obtenidos con los valores teóricos. A través de esta prueba se evaluó la precisión del método analítico que indica la variación en un mismo laboratorio tras determinaciones repetidas realizadas de forma independiente en un mismo día bajo las mismas condiciones de análisis. Este parámetro se avaluó mediante el análisis de muestras de concentraciones conocidas llamadas puntos de control de calidad del método analítico, contempladas en el intervalo de calibración, pero diferentes al mismo. La evaluación se realizó en un mismo día, esta prueba es conocida como “*variabilidad intradía o repetibilidad*”, para ello se analizaron por sextuplicado cada uno de los puntos de control 0.4, 4 y 40 µg/ml tanto para LPV como RTV de forma simultánea, pero cuantificados de manera independiente. En la tabla 6 se muestra la estadística de la repetibilidad del método para lopinavir.

Repetibilidad del método analítico				
Lopinavir				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio (n=6) Intradía ± DE	C.V. (%) (n=6)	Exactitud (%)
Nivel Bajo	0.4	0.38 ± 0.01	2.28	95.17
Nivel Medio	4	3.89 ± 0.06	3.80	97.22
Nivel Alto	40	40.95 ± 1.33	3.19	102.38

Tabla 6. Estadística de la repetibilidad del método analítico para la determinación de lopinavir en plasma humano.

Con respecto a la repetibilidad del método para ritonavir se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 7.

Repetibilidad del método analítico				
Ritonavir				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio (n=6) Intradía ± DE	C.V. (%) (n=6)	Exactitud (%)
Nivel Bajo	0.4	0.4 ± 0.01	1.78	99.5
Nivel Medio	4	3.71 ± 0.21	2.99	93.67
Nivel Alto	40	38.53 ± 1.49	2.44	96.89

Tabla 7. Estadística de la repetibilidad del método analítico para la determinación de ritonavir en plasma humano.

Esta prueba cumplió con los criterios de aceptación al obtener un coeficiente de variación menor o igual al 3.8% para cada una de las determinaciones (puntos control) para lopinavir y un coeficiente de variación menor o igual a 2.99% para ritonavir, es decir las concentraciones medidas se encontraron entre el 85 y 115% del valor teórico permitido.

e). Reproducibilidad. Esta prueba nos indica la precisión del método en condiciones diferentes de análisis, es decir que tan variable es el método en distintos días. Se calculó con base en la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), resultado de dividir la desviación estándar del método entre el valor de la media obtenida, todo ello multiplicado por 100 para expresarlo en porcentaje. Esta prueba se evaluó analizando los puntos de control de calidad (0.4, 4 y 40 µg/ml de LPV y RTV) en días diferentes realizando duplicados de los puntos de control “precisión interdías”. En la tabla 8 se muestran los resultados de la prueba.

Reproducibilidad del método analítico				
Lopinavir				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio (n=6) Interdías ± DE	C.V. (%) (n=6)	Exactitud (%)
Nivel Bajo	0.4	0.4 ± 0.03	7.71	100.83
Nivel Medio	4	3.95 ± 0.15	3.85	98.75
Nivel Alto	40	45.07 ± 1.34	3.15	106.25

Tabla 8. Estadística de la reproducibilidad del método analítico para la determinación de lopinavir en plasma humano.

Con respecto a la prueba de reproducibilidad del método analítico para determinar ritonavir la tabla 9 muestra los resultados obtenidos.

Reproducibilidad del método analítico				
Ritonavir				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio (n=6) Interdías ± DE	C.V. (%) (n=6)	Exactitud (%)
Nivel Bajo	0.4	0.40 ± 0.02	5.39	100.42
Nivel Medio	4	3.88 ± 0.17	4.40	96.45
Nivel Alto	40	40.83 ± 0.93	2.29	102.08

Tabla 9. Estadística de la reproducibilidad del método analítico para la determinación de ritonavir en plasma humano.

El método demostró ser reproducible interdías al cumplir los criterios de aceptación donde el coeficiente de variación interdía fue igual o menor al 7.71% para lopinavir y un coeficiente de variación interdía igual o menor a 5.39% para ritonavir por lo que esta prueba cumplió ya que no superó el 15% que es el valor permitido.

f). Estabilidad. Esta prueba se realizó para determinar si el compuesto es estable al ser sometido a condiciones de trabajo que normalmente se realiza para la determinación de las concentraciones del fármaco y permite establecer tanto las condiciones de almacenamiento como el tiempo en el que el compuesto permanece estable. Para evaluar la estabilidad se realizaron cuatro pruebas.

1. *Estabilidad a temperatura ambiente*: En esta prueba se evaluó la estabilidad de la muestra durante el tiempo requerido para su procesamiento en la mesa de trabajo y a temperatura ambiente. Para evaluar esta prueba se cargaron muestras de plasma con las concentraciones de los puntos de control de calidad, bajo, medio y alto, por triplicado, se sometieron a un periodo de reposo de 3h a temperatura ambiente. Para evaluar estas muestras se realizó una curva de calibración y un triplicado de los puntos de control de calidad (bajo, medio y alto) las cuales fueron preparadas en el momento y sirvieron de comparación para evaluar las muestras sometidas a la prueba.

Adicionalmente se realizó una prueba de estabilidad de las muestras en 20 h a temperatura ambiente, la cual fue necesaria para inactivar las muestras infecciosas. Se realizó el mismo procedimiento que en la prueba anterior, solo se prolongó el tiempo de reposo de las muestras cargadas a 20 h.

Las pruebas se realizaron de manera simultánea para lopinavir y ritonavir, pero nuevamente se cuantificaron de manera independiente.

En la tabla 10 se muestra la estadística de la prueba realizada y la tabla 11 muestra la estadística de la prueba para ritonavir.

Estabilidad de lopinavir a temperatura ambiente por 3 h.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba ± DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba ± DE	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.05	92.5
Nivel Medio	4	3.86 ± 0.18	3.70 ± 0.02	92.5
Nivel Alto	40	39.26 ± 0.43	39.81 ± 0.26	99.52

Tabla 10. Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente del compuesto (lopinavir) en plasma humano.

Estabilidad de ritonavir a temperatura ambiente por 3 h.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba ± DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba ±	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.02	92.5
Nivel Medio	4	3.65 ± 0.03	3.60 ± 0.03	90.0
Nivel Alto	40	38.29 ± 0.39	38.54 ± 0.31	96.35

Tabla 11. Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente del compuesto (ritonavir) en plasma humano.

Esta prueba cumplió con los criterios de aceptación permitidos ya que se obtuvo un recobro de menor o igual al 99.52% para las muestras de lopinavir sometidas a la prueba. Por otra parte la tabla 11 muestra los resultados acerca de esta misma prueba pero para las muestras de ritonavir y se obtuvo un recobro menor o igual al 96.35%.

La tabla 12 muestra los resultados estadísticos de la prueba de estabilidad durante 20 h a temperatura ambiente la cual cumple con los criterios de aceptación al presentar un recobro de menor o igual al 102.75% para las muestras de lopinavir. Por otra parte la tabla 13 muestra los resultados

acerca de esta misma prueba pero para las muestras de ritonavir donde se obtuvo un recobro menor o igual al 112.68%.

Por lo tanto las muestras infecciosas se inactivaron por este procedimiento ya que se demostró que el compuesto no se ve afectado ante las condiciones de la prueba.

Estabilidad de lopinavir a temperatura ambiente por 20 h.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba ± DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba ± DE	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.412 ± 0.01	0.411 ± 0.01	102.75
Nivel Medio	4	3.604 ± 0.42	3.792 ± 0.15	94.8
Nivel Alto	40	43.932 ± 0.59	46.655 ± 1.63	116.63

Tabla 12. Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente durante 20h del compuesto (lopinavir) en plasma humano.

Estabilidad de ritonavir a temperatura ambiente por 20 h.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba ± DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba ± DE	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.439 ± 0.01	0.434 ± 0.02	108.5
Nivel Medio	4	3.729 ± 0.47	3.847 ± 0.26	96.175
Nivel Alto	40	43.706 ± 0.53	45.073 ± 0.26	112.68

Tabla 13. Estadística de la prueba de estabilidad temperatura ambiente durante 20h del compuesto (ritonavir) en plasma humano.

2.-Estabilidad en ciclos de congelado-descongelado: En esta prueba se evaluó la estabilidad del compuesto ante ciclos de congelado-descongelado a

temperatura ambiente. Se realizó ante tres ciclos de sometimiento. Esta prueba proporcionó información sobre la estabilidad de las muestras ante posibles re-análisis, lo que implicó periodos de congelación-descongelación. Para evaluar esta prueba se cargaron muestras de plasma con las concentraciones de los puntos de control de calidad, bajo, medio y alto, por triplicado, se sometieron a un periodo de congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (REVCO), se descongelaron a temperatura ambiente, se repite este ciclo en tres ocasiones y en este último ciclo se realiza el análisis de las muestras.

Para evaluar estas muestras se realizó una curva de calibración y un triplicado de los puntos de control de calidad (bajo, medio y alto) las cuales fueron preparadas en el momento y sirvieron de comparación para evaluar las muestras sometidas a la prueba. En la tabla 14 se muestran los resultados de la prueba realizada para lopinavir y en la tabla 15 los resultados de la prueba para ritonavir.

Estabilidad de lopinavir en ciclos de congelado-descongelado.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba \pm DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba \pm DE	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.39 ± 0.01	0.37 ± 0.02	92.5
Nivel Medio	4	3.8 ± 0.03	4.1 ± 0.17	102.5
Nivel Alto	40	39.91 ± 0.55	44.77 ± 2.7	111.925

Tabla 14. Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (lopinavir) ante ciclos de congelado-descongelado en plasma humano.

Estabilidad de ritonavir en ciclos de congelado-descongelado.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (µg/ml)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba ± DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba ± DE	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.04	105
Nivel Medio	4	3.7 ± 0.05	3.63 ± 0.42	90.75
Nivel Alto	40	37.94 ± 0.42	42.43 ± 2.60	106.07

Tabla 15. Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (ritonavir) ante ciclos de congelado-descongelado en plasma humano.

De acuerdo a los resultados estadísticos la prueba cumplió con los criterios de aceptación y el compuesto no se afectó ante el sometimiento a las condiciones de la prueba.

3.-Estabilidad a largo plazo: En esta prueba se evaluó la estabilidad de la muestra ante las condiciones de almacenamiento hasta el análisis de las mismas. En nuestro caso se almacenaron las muestras a -80 °C en ultracongelador por un periodo de 30 días de almacenamiento. Se cargaron muestras de plasma con las concentraciones de los puntos de control de calidad, bajo, medio y alto, por triplicado, se sometieron a un periodo de congelación a -80 °C durante 30 días, posteriormente se realizó el análisis. En la tabla 16 se muestran los resultados estadísticos de la prueba de estabilidad a largo plazo del compuesto. Por otro lado en la tabla 17 se muestra los resultados de esta prueba para ritonavir.

Estabilidad de lopinavir a largo plazo.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba \pm DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba \pm DE	Recobro (%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.353 \pm 0.02	0.365 \pm 0.01	91.25
Nivel Medio	4	4.033 \pm 0.2	3.879 \pm 0.03	96.97
Nivel Alto	40	42.117 \pm 0.46	44.573 \pm 3.44	111.43

Tabla 16. Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (lopinavir) en periodo de almacenamiento a largo plazo (30 días).

Estabilidad de ritonavir a largo plazo.				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio Muestras sin sometimiento a la prueba \pm DE	Promedio Muestras sometidas a la prueba \pm DE	Recobro(%) Muestras sometidas a la prueba
Nivel Bajo	0.4	0.363 \pm 0.02	0.353 \pm 0.02	88.25
Nivel Medio	4	3.56 \pm 0.03	3.515 \pm 0.04	87.87
Nivel Alto	40	37.767 \pm 0.34	37.99 \pm 0.44	94.97

Tabla 17. Estadística de la prueba de estabilidad del compuesto (ritonavir) en periodo de almacenamiento a largo plazo (30 días)

Esta prueba nos indicó la estabilidad del compuesto en las condiciones de almacenamiento hasta su análisis.

4.-Estabilidad de la muestra procesada: En esta prueba se evaluó la estabilidad de las muestras en un periodo de 24 posterior a su análisis y almacenadas en el automuestreador. Para evaluar esta prueba se programó una corrida analítica con una duración de 24 h. Se cargaron muestras de plasma con las concentraciones de la curva de calibración y las de los puntos de control de calidad bajo, medio y alto por triplicado (solo los puntos control).

Se inyectaron las muestras control a determinados tiempos posterior al inicio de la corrida analítica, se evaluaron a las 8, 12, 18 y 24 h.

La figura 14 muestra las gráficas de exactitud de la prueba realizada durante 24 h para evaluar la estabilidad del lopinavir y en la figura 15 se muestra las gráficas de exactitud de la prueba realizada durante 24 h para evaluar la estabilidad del ritonavir.

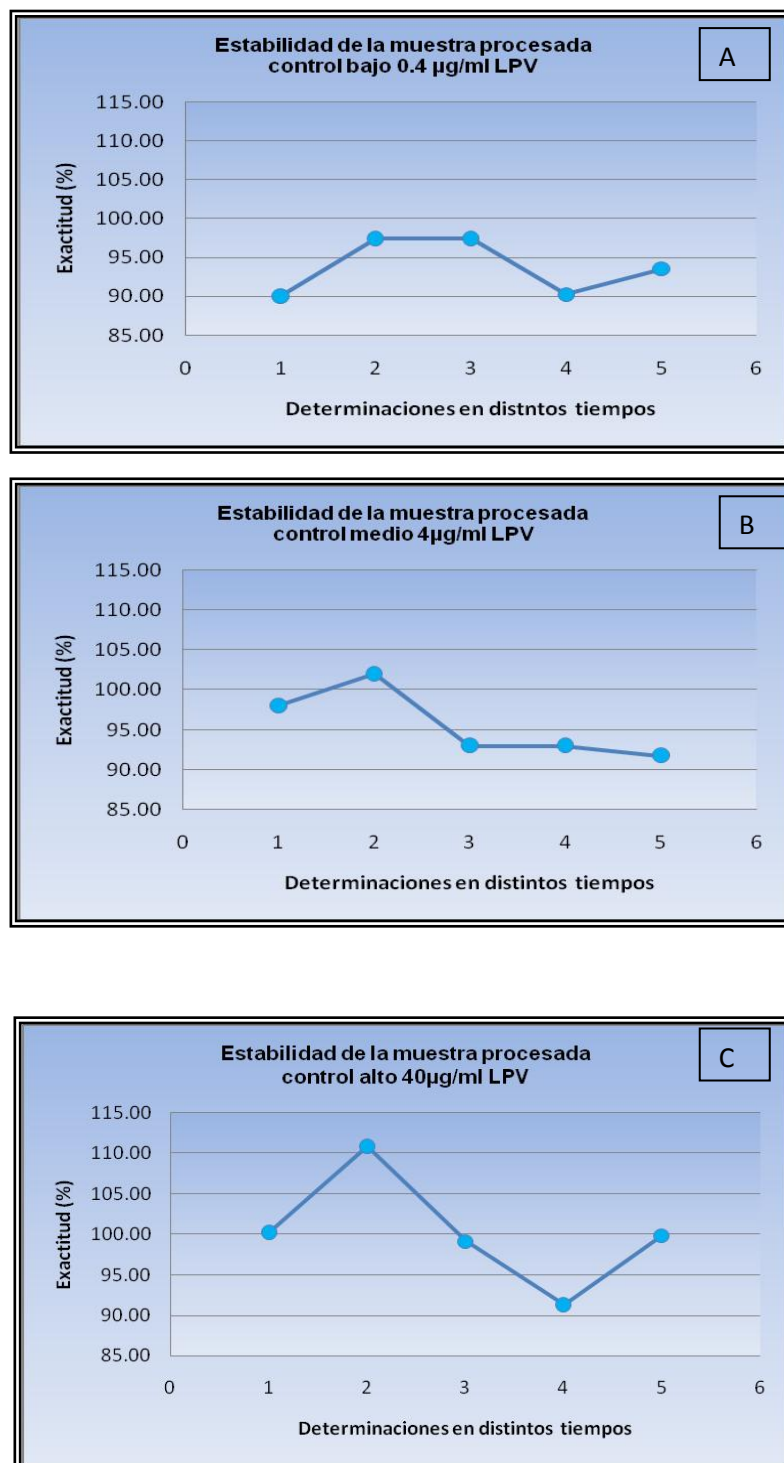


Figura 14. Estabilidad de lopinavir en un periodo continuo de 24h en el automuestreador o autoinyector. En la gráfica A se muestra la exactitud del nivel bajo, en la gráfica B se muestra el nivel medio y en la gráfica C se muestra el nivel alto de los puntos de control de calidad.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

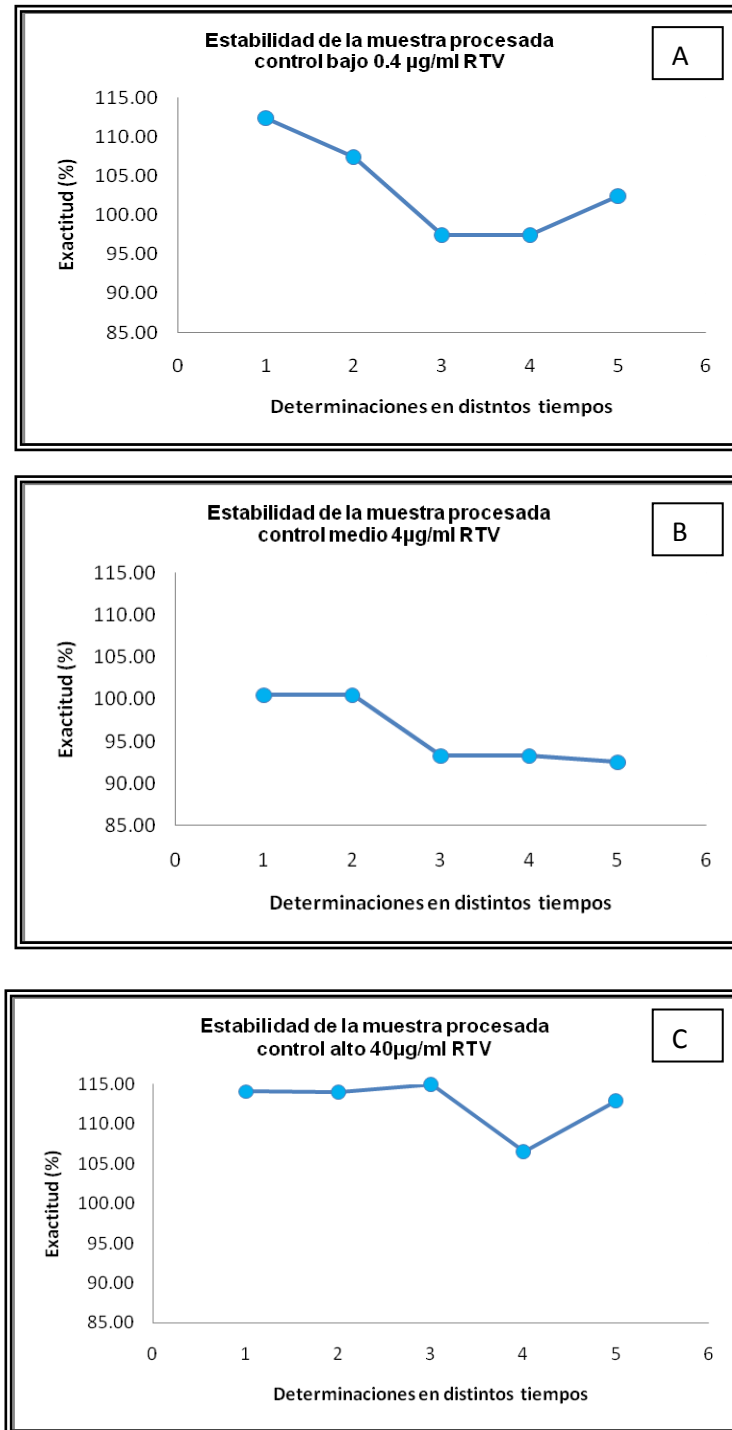


Figura 15. Estabilidad de ritonavir en un periodo continuo de 24 h en el automuestreador o autoinyector. En la gráfica A se muestra la exactitud del nivel bajo, en la gráfica B se muestra el nivel medio y en la gráfica C se muestra el nivel alto de los puntos de control de calidad.

En todas las pruebas de estabilidad se analizó una curva de calibración y un triplicado de los puntos de control de calidad procesados en el momento y los cuales fueron la referencia para comparar las muestras sometidas a la prueba evaluada. De esta manera se obtuvo un resultado directo comparando el recobro de las muestras de prueba respecto a las muestras de referencia, el cual debe estar dentro del 85 a 115% respecto al valor teórico.

6.2.4. Inactivación de las Muestras Infecciosas.

Para manipular las muestras de los pacientes VIH positivos, se realizó un prueba de estabilidad previamente a temperatura ambiente 20 horas, de tal manera que siguiendo la programación del análisis, las muestras se colocaron en una campana de extracción y permanecieron ahí durante 20 horas, transcurrido este tiempo se procesaron de acuerdo al proceso de semipurificación del método analítico. Esta prueba permitió la inactivación del virus y no afectó la estabilidad de los compuestos de interés. Este procedimiento se realizó previo a cada corrida de análisis.

6.2.5. Análisis de Muestras.

Las muestras de plasma para la determinación de LPV, se manipularon con las medidas de seguridad necesarias para el manejo de muestras potencialmente infecciosas. Se realizó una programación de análisis, siguiendo el proceso de semipurificación descrito, de esta manera se determinaron las concentraciones plasmáticas de LPV.

La estabilidad de compuesto LPV/RTV quedó evidenciada ante las pruebas realizadas para evaluarla: muestras sometidas a ciclos de congelado-

descongelado, temperatura ambiente (o periodo de reposo), almacenamiento a largo plazo en el ultracongelador (-80 °C) y ante 20 h a temperatura ambiente para inactivación del VIH.

6.3. Validación del Método Analítico para la determinación de las concentraciones urinarias del 6 β OH Cortisol.

La validación del método analítico para la determinación de 6 β OH Cortisol se apegó a lo descrito en la NOM-177-SSA1-1998. Al igual que en la validación del método analítico para determinar LPV, en este método se desarrollaron las pruebas descritas anteriormente, realizando solo algunas variaciones necesarias en dichas pruebas.

6.3.1.-Condiciones Cromatográficas.

Se utilizó como fase móvil una mezcla de 82% de amortiguador de NaH₂PO₄ 0.05M a pH 3 (ajustado con ácido acético glacial) y 18% de acetonitrilo. El flujo de trabajo fue de 1 ml/min, longitud de onda de 245 nm. La temperatura de la columna fue de 35 °C y la temperatura de la muestra fue de 5 °C. El proceso de semipurificación seleccionado fue el que se describe a continuación:

6.3.2. Proceso de semipurificación de las muestras

- En un tubo cónico de rosca de 15 ml se agregaron 1.5 ml de agua desionizada (durante la validación u orina cuando se procesaron las muestras de los pacientes).

- Se agregaron 150 μ L del estándar de 6 β OH Cortisol y se agitó en vortex durante 20 segundos.
- Se adicionó 500 μ L de NaOH 1 M.
- Se agregaron 5 ml de una mezcla de acetato de etilo:pentano en proporciones 70:30, se tapan perfectamente.
- Se centrifugó a 3500 rpm durante 6 minutos.
- Se transfirió el solvente (que se encontró en la parte superior del tubo) a un tubo de boca ancha.
- Se evaporó en baño maría a 50°C, bajo aire hasta la sequedad.
- Mientras transcurrió el tiempo de evaporación, se realizó una segunda semipurificación.
- Al tubo de rosca que contenía la primera parte del proceso (el agua u orina), nuevamente se agregó 5 ml de la mezcla de acetato de etilo: pentano (70:30), se centrifugó y el sobrenadante se transfirió al tubo de boca ancha previamente evaporado.
- Se repitió el procedimiento para realizar una segunda evaporación en baño maría a 50 °C.
- Una vez secos los extractos, se adicionó 150 μ L de una mezcla de metanol:agua (50:50), se agitan en vortex a máxima velocidad.
- Se inyectó 60 μ L al sistema cromatográfico.

6.3.3. Validación.

a). Selectividad. La prueba de selectividad en este caso no se realizó analizando 6 muestras biológicas provenientes de sujetos distintos, ya que se utilizó agua desionizada como el medio que contiene el analito de interés

(6 β OH Cortisol), puesto que estamos evaluando una sustancia endógena y no podemos tener una matriz biológica libre de fármaco. Por ello solo se buscó un método de semipurificación que permitió la separación adecuada del 6 β OH Cortisol.

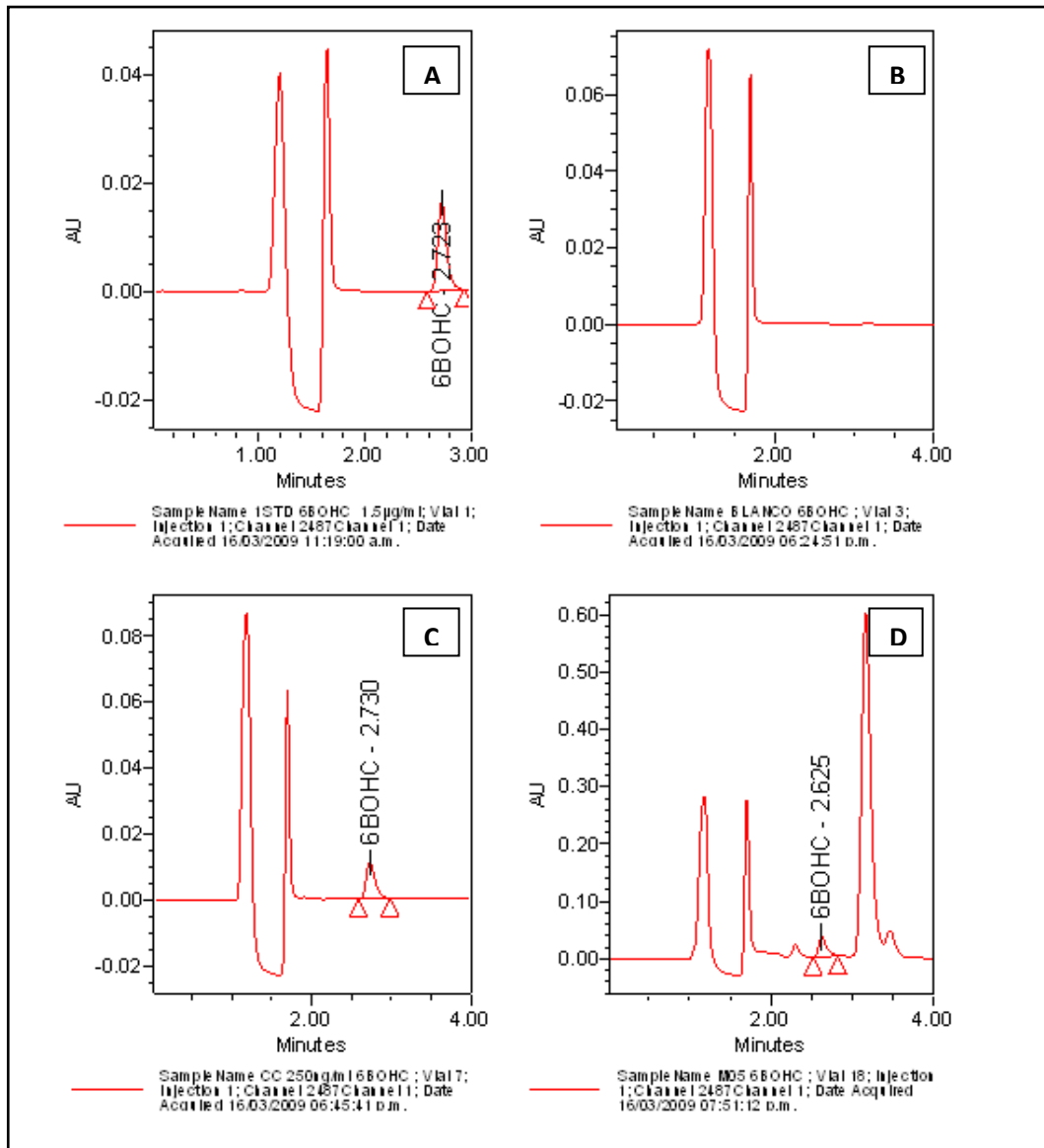


Figura 16. Cromatogramas. En la imagen (A) se encuentra el cromatograma de una inyección de soluciones estándar de 6 β OH Cortisol; en la imagen (B) se observa una muestra de matriz utilizada en la validación (agua) libre de fármaco, en la imagen (C) se observa una muestra de agua cargada con un concentración de la curva de calibración de 6 β OH Cortisol. En la imagen (D) se observa la muestra de un paciente en tratamiento con 6 β OH Cortisol.

b). Intervalo de Calibración. El rango de concentraciones empleado se determinó tomando en cuenta las concentraciones obtenidas en otros estudios realizados (Lykkesfeldt y cols, 1994; Zhi Chen y cols, 2003) y fue de 50, 100, 150, 250, 500 y 1000 ng/ml de 6 β OHCortisol. Las concentraciones establecidas como puntos de control de calidad en los niveles bajo, medio y alto fueron: 75, 400 y 750 ng/ml de 6 β OHCortisol respectivamente.

c). Linealidad. Se evaluó la linealidad del método analítico en el intervalo de calibración de trabajo (50 a 1000 ng/ml de 6 β OHCortisol). El medio donde se evaluó el compuesto de interés fué agua desionizada por las razones antes expuestas, siguiendo el proceso de semipurificación descrito para este método analítico. Se inyectaron al sistema 60 μ L de cada uno de los extractos que contienen el 6 β OHCortisol. Al finalizar la prueba se evaluó la pendiente cuyo valor fue de 1.08, la intersección de -17.08 y el coeficiente de correlación de 0.999. En la figura 17 se muestra la grafica de la prueba de linealidad de método analítico.

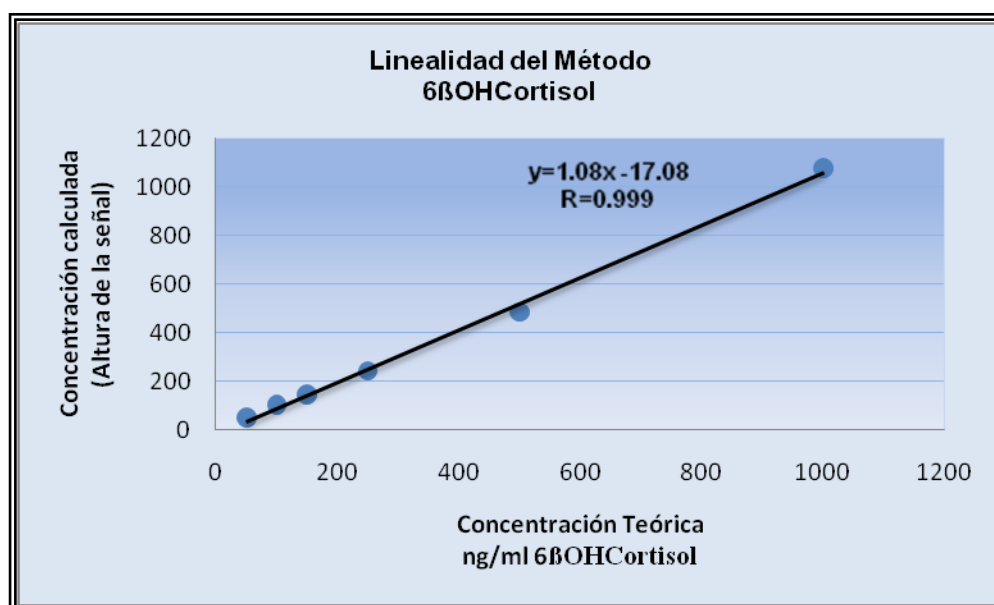


Figura 17. Linealidad del método analítico para la determinación de 6 β OHCortisol, cada punto representa los promedios de las concentraciones del intervalo de calibración.

De acuerdo a los criterios de aceptación que se señalaron en el método anterior esta prueba cumple con los criterios de aceptación. Por lo tanto el método demostró ser lineal.

d). Precisión y Exactitud. Se evaluó la precisión y exactitud del método, analizando las concentraciones de los puntos de control de calidad en los diferentes niveles (bajo, medio y alto): 75, 200 y 750 ng/ml de 6βOHCortisol. Se realizó la prueba tal y como se describe en el método anterior. Se evaluaron las concentraciones de 6βOHCortisol en agua desionizada y se realizó la prueba en un mismo día (para evaluar repetibilidad) y en días diferentes (reproducibilidad). En ambas pruebas el coeficiente de variación fue menor o igual al 15% para la precisión, es decir las concentraciones medidas pueden encontrarse entre el 85 y 115% de exactitud respecto al valor teórico. La tabla 18 muestra los resultados estadísticos de la prueba realizada para la repetibilidad del método analítico.

Repetibilidad del método analítico				
6βOHCortisol				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (ng/ml)	Promedio (n=6) Intradía ± DE	C.V. (%)	Exactitud (%)
Nivel Bajo	75	73.30 ± 4.71	6.42	97.73
Nivel Medio	200	198.22 ± 11.73	5.92	99.11
Nivel Alto	750	752.04 ± 40.15	5.34	100.77

Tabla 18. Estadística de la repetibilidad del método analítico para la determinación de 6βOHCortisol en muestras de orina.

Esta prueba cumplió con los criterios de aceptación al obtener un coeficiente de variación menor o igual al 6.42% para cada una de las determinaciones (puntos control), es decir las concentraciones medidas se encontraron entre el 85 y 115% del valor teórico permitido.

En la tabla 19 se muestran los resultados de la prueba realizada para determinar la reproducibilidad del método analítico para determinar 6 β OH Cortisol en orina.

Reproducibilidad del método analítico				
6 β OH Cortisol				
Puntos de Control de Calidad	Concentración Teórica (ng/ml)	Promedio (n=6) Interdías \pm DE	C.V. (%)	Exactitud (%)
Nivel Bajo	75	79.03 \pm 2.59	3.28	105.38
Nivel Medio	200	201.71 \pm 15.83	7.85	100.85
Nivel Alto	750	828.10 \pm 16.51	1.99	110.4

Tabla 19. Estadística de la reproducibilidad del método analítico para la determinación de 6 β OH Cortisol en muestras de orina.

e). Estabilidad. Dentro las pruebas que permitieron las condiciones de trabajo y de almacenamiento fueron las pruebas de estabilidad del compuesto de interés. En este caso se evaluaron las concentraciones preparadas en agua desionizada cargada con el estándar de 6 β OH Cortisol, analizadas en los tres niveles bajo, medio y alto (75, 400 y 750 ng/ml) por triplicado y fueron sometidas a temperatura ambiente por un tiempo estimado equivalente al tiempo requerido para su procesamiento y para ello se evaluaron 4 horas de reposo en la mesa de trabajo. Las muestras sometidas a la prueba se compararon con un triplicado de concentraciones iguales pero procesadas en el momento. De esta manera se obtuvo el resultado directo comparado el recobro de las muestras sometidas a la prueba, el cual se encontró dentro del 85 a 115% respecto al valor teórico.

6.3.4. Análisis de muestras de orina.

Las muestras de orina para la determinación de 6 β OH Cortisol, se manipularon con las medidas de seguridad que requiere un muestra

potencialmente infecciosa. Se realizó una programación del análisis, siguiendo el proceso de semipurificación descrito para este método se determinaron las concentraciones de este metabolito endógeno 6 β OH Cortisol.

6.4. Método de ELISA para la determinación del Cortisol en muestras de orina.

Siguiendo las instrucciones para la preparación de las muestras en el Kit de Cortisol la técnica utilizada fue la siguiente:

- Se diluyó 1:1 la muestra de orina con el buffer (amortiguador) de incubación (50 μ L + 50 μ L)
- Se colocaron 10 μ L en el “microplato” de cada uno de las soluciones estándar de Cortisol y los puntos control, por duplicado.
- Se colocaron 10 μ L en el “microplato” las muestras de orina (diluidas) para analizar por duplicado.
- Se agregaron 300 μ L del conjugado diluido 1:100 y agitaron suavemente.
- Se incubaron a 37 °C, durante 1 hora.
- Se lavaron los pozos del “microplato” con 400 μ L de agua destilada, en dos ocasiones.
- Se adicionaron 100 μ L del sustrato-TMB a cada una de las muestras (en los pozos).
- Se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos.

- Se agregaron 100 μ L de la solución STOP a cada una de las muestras para detener la reacción.
- La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm en el equipo para las lecturas de ELISA.

Cada análisis realizado se evaluó con una curva de calibración, ambos puntos de control bajo y alto de concentración conocida.

6.5. Cronología del Estudio

6.5.1. Tiempos de muestreo.

Para realizar la presente investigación fue necesario tener al menos 3 muestras sanguíneas de cada uno de los pacientes, tomadas en tiempos distribuidos estratégicamente en el intervalo de dosificación de lopinavir/ritonavir. La asignación de los tiempos de muestreo se realizó mediante una tabla de números aleatorios (realizada en el programa Excel), para una mejor distribución del tiempo de muestreo entre los pacientes participantes en el estudio. Se realizó una programación de los tiempos de muestreo en un intervalo de 12 h (ya que la presentación de lopinavir/ritonavir se administra cada 12 h). Se tomaron 3 muestras a cada uno de los pacientes participante en el estudio de farmacocinética poblacional, la primer muestra se tomó en ayunas y previo a la administración de la dosis de la mañana, al mismo tiempo se tomaron las muestras para realizarles los estudios de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, examen general de orina) y de infectología (carga viral, conteo de CD4 y CD8). La segunda y la tercera muestra para la farmacocinética poblacional fueron tomadas acordes al tiempo de muestreo asignado al azar. Las combinaciones de tiempo de muestreo utilizadas se describen en la tabla 20.

Codificación de combinación de muestreo	Horario de toma de muestra (h)	Horario de toma de muestra (h)
1	0.5	5
2	1	6
3	2	8
4	3	9
5	4	11

Tabla 20.-Combinaciones de los tiempos de muestreo utilizados para la asignación de las tomas de muestras (segunda y tercera muestra) para cada paciente participante en el estudio.

Estas codificaciones se asignaron a los participantes siguiendo el orden de la tabla de números aleatorios.

6.5.2. Desarrollo del Estudio

Se realizó una invitación de manera directa o vía telefónica a los pacientes que asisten a monitoreo virológico a la clínica de infectología CIENI, se les explicó el protocolo de estudio, así como, la finalidad del estudio y la manera en que se iba a llevar a cabo. El paciente que aceptó participar firmó su hoja de consentimiento informado por escrito y por duplicado (ya que una copia del mismo es requerida para su posterior archivo) y se programó su asistencia para su participación al estudio.

De acuerdo a la programación de participación y disposición de los pacientes se desarrolló el estudio. La principal indicación para los participantes fue disponibilidad durante todo el día de la participación por el intervalo de tiempo necesario para el muestreo. La logística de desarrollo del estudio fue

asistir a la clínica de infectología CIENI del INER a partir de las 7:30 am a 8:30 am en ayunas y llevar una muestra de orina (la primera de la mañana) y el medicamento antirretroviral (esquema que incluye lopinavir/ritonavir) y concomitante. En la clínica de infectología donde se contó con las instalaciones adecuadas de bioseguridad, se realizó la primer toma de muestra sanguínea (previa a la dosis de la mañana) así como, las muestras para los estudios de laboratorio clínico y de infectología. Posteriormente el paciente se trasladó a la Unidad de Investigación en Farmacología (UIF) ubicada en el pabellón número 6 del INER. En la UIF, se realizaron las mediciones antropométricas, como peso, talla, IMC. Se les aplicó una encuesta breve que permitió conocer el esquema antirretroviral completo, los medicamentos concomitantes, algunos hábitos (fumar, consumo de alcohol), posibles padecimientos y reporte de posibles eventos adversos o indeseables referentes al tratamiento. Terminada la encuesta se le indicó a cada participante el horario de toma de la segunda y tercera muestra sanguínea, mismas que se realizaron en las instalaciones de la clínica de infectología. El día de participación en el estudio, se les proporcionó a los pacientes el desayuno y la comida, para tener una estancia lo más cómoda posible, sobre todo por el tiempo que implicó la metodología.

Al término de las tres tomas de muestras necesarias para la farmacocinética poblacional, el paciente concluyó su participación y siguiendo las indicaciones del laboratorio de infectología y del laboratorio clínico, el paciente regresó por los resultados de las pruebas laboratorios.

Al final del día del estudio, se recogieron las muestras de los participantes en la clínica de infectología. Las muestras de plasma y orina se trasladaron en condiciones de alta bioseguridad a las instalaciones de la UIF, donde se almacenaron a una temperatura de -80 °C para su posterior análisis.

6.6. Análisis Estadístico.

En el análisis de los datos demográficos para realizar estadística descriptiva de la población participante se utilizó el programa Excel 2007. Para el análisis farmacocinético poblacional de las concentraciones plasmáticas de LPV y RTV, se utilizó el software NONMEM versión V, considerado como el “estándar de oro” en el abordaje poblacional, empleando el método de minimización de primer orden (F_{OBJ}). El software Xpose2 permitió la obtención de los gráficos ponderados en el análisis farmacocinético poblacional.

6.7. Consideraciones Éticas

Esta investigación se aprobó por el comité de Ciencia y Bioética del INER. El estudio realizado es considerado de riesgo menor al mínimo de acuerdo a los lineamientos de la secretaria de salud. Los pacientes participantes firmaron una carta de consentimiento informado de manera voluntaria previo a su participación.

6.8. Costos del Estudio

Esta investigación se realizó con los recursos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Instituto Politécnico Nacional, de tal manera que no tuvo costo alguno para los pacientes participantes.

VII. Resultados

7.1. Datos de la población de estudio

Se incluyeron 50 pacientes VIH positivos, 4 mujeres y 46 hombres. La edad de los mismos osciló entre los 28 y 66 años de edad, el peso entre los 36.5 y 109 kg, y la talla entre los 142 y 178 cm. Presentaron un índice de masa corporal (IMC) que osciló entre 14.43 y 35.18 kg/m². En la tabla 21 se muestran los valores de la media y desviación estándar de los parámetros demográficos de los pacientes, así como la información de otros ARV incluidos en el esquema de tratamiento.

Característica (n=50)	Media ± (D.E)	Intervalo Max-Min
Género		
Masculino	46	
Femenino	4	
Edad (años)	39 ± 8.14	28 - 66
Talla (cm)	166.33 ± 6.74	142 - 178
Peso (kg)	65.96 ± 13.34	36.5 -109
IMC (kg/m ²)	23.75 ± 6.51	14.43-35.18
Dosis (mg/ml)	400/100 LPV/RTV	
ARV concomitantes	Porcentaje % (n=50)	
LPV + Emtricitabina/Tenofovir	40	
LPV + Efavirenz	8	
LPV +Lamivudina /Zidovudina	24	
Avacavir	10	
Otros	12	

Tabla 21. Datos demográficos de la población participante en el estudio, se muestran los valores de la media y desviación estándar, así como los medicamentos antirretrovirales de mayor frecuencia en el esquema de tratamiento de los pacientes.

La historia clínica de los pacientes nos proporcionó información referente a ciertos eventos adversos, que se pueden asociar a la terapia antirretroviral y a la condición de la infección por VIH.

Una proporción importante de los participantes refirieron náuseas posterior al inicio de la terapia y presentes a la fecha, también se documentó la presencia de diarreas frecuentes y manifestaciones de lipodistrofia evidentes y referidas por el paciente. En la tabla 22 se muestra el porcentaje de los eventos adversos descritos en la población participante.

Eventos Adversos	Porcentaje % (n=50)
Diarrea	24
Náuseas	14
Lipodistrofia	44
Reflujo	10
*Debilidad en piezas dentales	4
*No documentado en la literatura	

Tabla 22. Eventos adversos reportados en la población de estudio.

Respecto a la presencia de enfermedades concomitantes, 2 pacientes padecían de diabetes mellitus tipo I e hipertensión arterial. Por otra parte, las pruebas de laboratorio que reflejaron un mayor número de anomalías fueron el perfil de lípidos entre las cuales se encontraron los parámetros de colesterol y triglicéridos. Los resultados clínicos mostraron hipercolesterinemia, hipocolesterinemia e hipertriglicerinemia.

Se encontraron niveles de colesterol hasta 3 veces superior a los valores de referencia 140-200 mg/dL, sin embargo también se encontraron valores por debajo de estos parámetros de referencia. Respecto a los valores de triglicéridos se obtuvieron en algunos pacientes niveles medidos 6 veces

mayores a los valores de referencia 50-200 mg/dL, pero en esta evaluación no hubo valores medidos inferiores a los de referencia. En la tabla 23 se muestra en que porcentaje de la población participante se presentaron las anomalías descritas.

Anormalidades de Laboratorio Clínico	Frecuencia	% (n=50)
Hipercolesterinemia	16	32
Hipocolesterinemia	9	18
Hipertriglicerinemia	29	58

Tabla 23.- Parámetros elevados en los valores de perfil de lípidos en los estudios de laboratorio clínico de los pacientes.

Respecto a los resultados del monitoreo virológico es importante tener en cuenta que los pacientes participantes en el estudio como se señaló en los criterios de inclusión, son pacientes en monitoreo periódico. En este contexto los resultados de laboratorio para el monitoreo virológico se describen en la tabla 24.

Resultados de Laboratorio de Infectología		
Conteo de CD4	Frecuencia	%(n=50)
Valores Normales CD4	6	12
Valores anormales CD4	44	88
Carga Viral	Frecuencia	%(n=50)
Indetectable (<50copias)	29	58
Detectable (>50copias)	21	42

Tabla 24.- Parámetros del laboratorio de infectología: conteo de CD4 y Carga Viral.

La tabla 24 muestra que poco más de la mitad de la población mantuvo una buena supresión viral, es decir tiene carga viral indetectable, lo que indica un número mínimo de copias víricas. Sin embargo el conteo de linfocitos T CD4 permaneció disminuido en poco menos del 90% de la población participante.

Todos los resultados anteriores permitieron información adicional de la población, aunado con la información proporcionada por el cuestionario contestado por los pacientes, los datos demográficos, clínicos y fisiopatológicos, datos que se consideraron covariables en la construcción del modelo poblacional de lopinavir en presencia de ritonavir.

7.2. Determinación de las concentraciones plasmáticas de LPV/RTV mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de LPV/RTV en las muestras de los pacientes VIH positivos. Las muestras fueron analizadas siguiendo el proceso de semipurificación descrito en la validación del método. Se analizó una curva de calibración y un duplicado de los puntos de control de calidad en los tres niveles, bajo, medio y alto (0.4, 4 y 40 µg/ml LPV/RTV), los cuales se distribuyeron a lo largo de la corrida analítica de las muestras plasmáticas. En la figura 18 se observan las 150 muestras plasmáticas analizadas y las concentraciones plasmáticas obtenidas de lopinavir en el estado estacionario puesto que los pacientes han estado en tratamiento antirretroviral con LPV/RTV por tiempo prolongado y se observa una amplia variabilidad en los valores obtenidos.

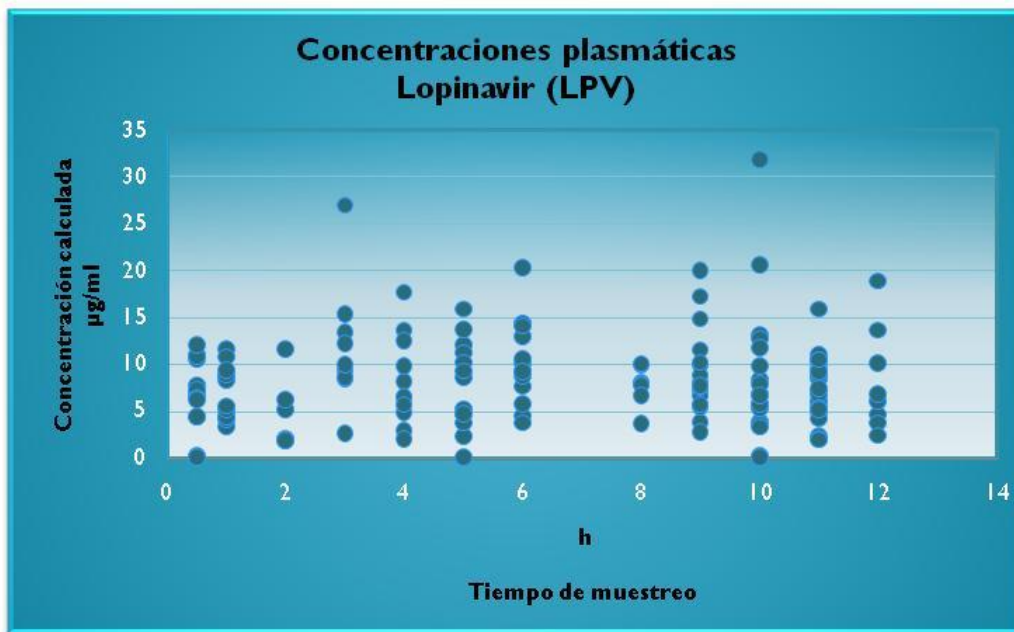


Figura 18. Concentraciones plasmáticas de lopinavir obtenidas del total de 150 muestras plasmáticas analizadas de pacientes en tratamiento con LPV/RTV.

Las concentraciones plasmáticas encontradas fueron entre 2.041 a 31.972 µg/ml de LPV/RTV. De la población participante (n=50), el 52% tiene concentraciones entre 10.098 a 31.972 µg/ml de lopinavir, este dato se observó en al menos una de las tres concentraciones medidas de cada uno de los pacientes. Por otra parte al analizar las muestras tomadas previo a la dosis de la mañana tenemos concentraciones promedio de 8.8 µg/ml. En la figura 19, se grafican las concentraciones de la muestra tomada previa a la dosis de la mañana y es notoria la amplia variabilidad en los valores obtenidos.

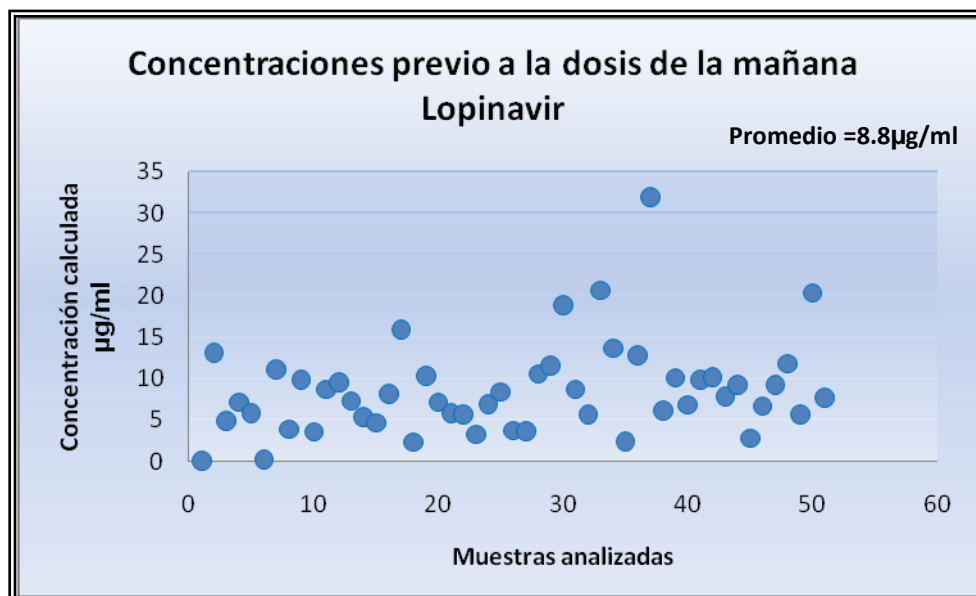


Figura 19. Concentraciones plasmáticas de LPV obtenidas en la muestra previa a la dosis de la mañana.

Simultáneamente se determinaron las concentraciones plasmáticas de ritonavir en las muestras 150 muestras plasmáticas de los pacientes VIH positivos. El análisis se realizó siguiendo el proceso de semipurificación descrito en la validación del método. Se evaluó una curva de calibración y un duplicado de los puntos de control de calidad en los tres niveles, bajo, medio y alto (0.4, 4 y 40 µg/ml RTV), los cuales se distribuyeron a lo largo de la corrida analítica de las muestras plasmáticas. En la figura 20 se observan las 150 muestras plasmáticas analizadas y las concentraciones plasmáticas obtenidas en el estado estacionario en los pacientes que han estado en tratamiento antirretroviral con LPV/RTV por tiempo prolongado y de igual manera se observa una amplia variabilidad en las concentraciones plasmáticas obtenidas.

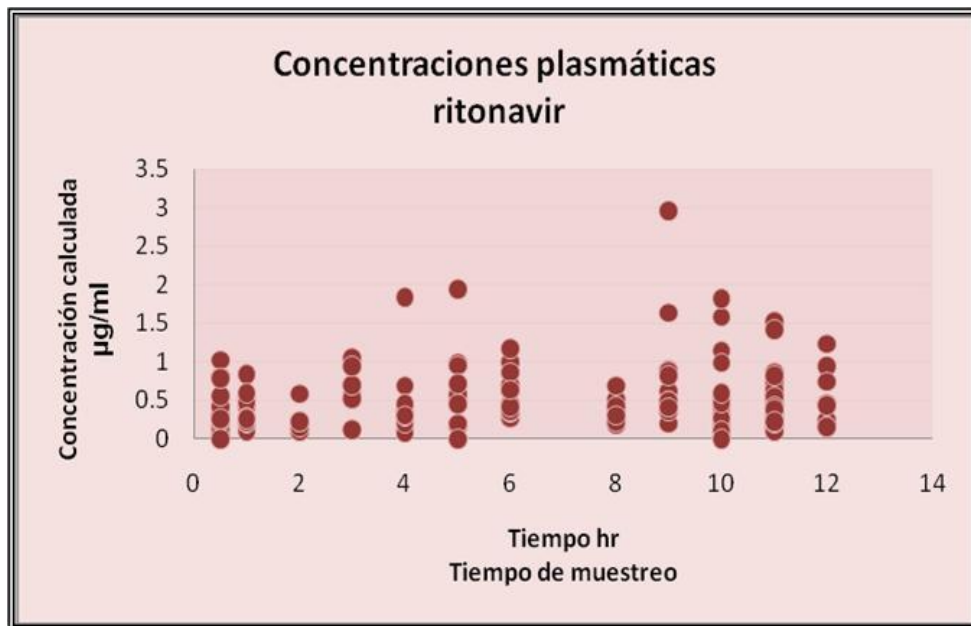


Figura 20. Concentraciones plasmáticas de ritonavir obtenidas del total de 150 muestras plasmáticas analizadas de pacientes en tratamiento con LPV/RTV.

Las concentraciones plasmáticas de ritonavir se encontraron en un intervalo 0.102 a 2.96 $\mu\text{g/ml}$ de ritonavir. Al igual que en lo observado con lopinavir, las concentraciones previas a la administración del fármaco fueron superiores a las reportadas, teniendo un valor promedio de 0.7 $\mu\text{g/ml}$ de ritonavir. En la figura 21, se grafican las concentraciones de la muestra tomada previa a la dosis de la mañana de cada uno de los pacientes y también se presentó una amplia variabilidad en los valores obtenidos.

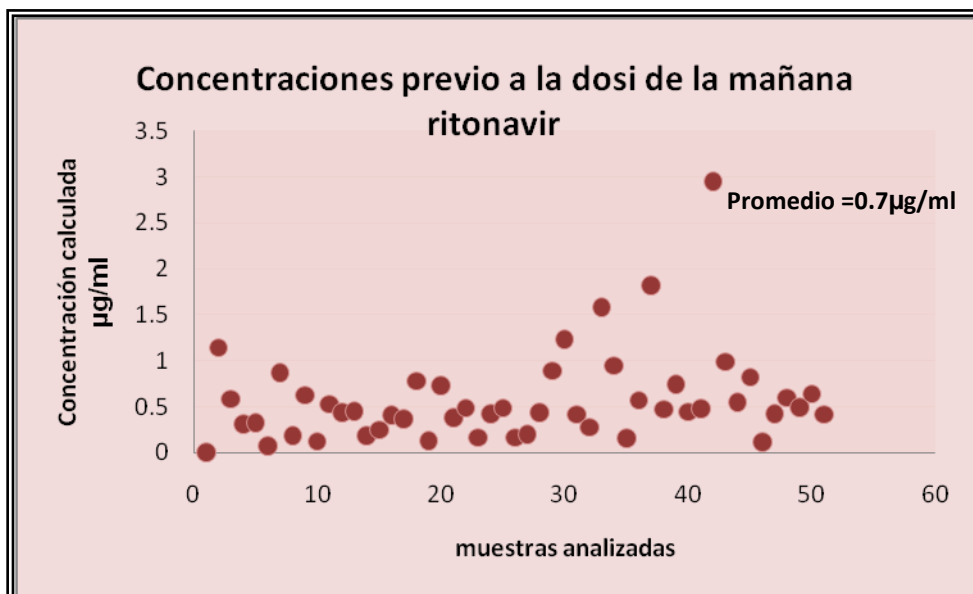


Figura 21. Concentraciones plasmáticas de RTV obtenidas en la muestra previa a la dosis de la mañana.

Al graficar las concentraciones medidas de lopinavir en función de las concentraciones de ritonavir se observa una tendencia lineal entre ambas mediciones, sin embargo se manifiesta una variabilidad en esta tendencia ya que algunos puntos no siguen tal perfil. La figura 22 muestra la gráfica de ambas concentraciones.

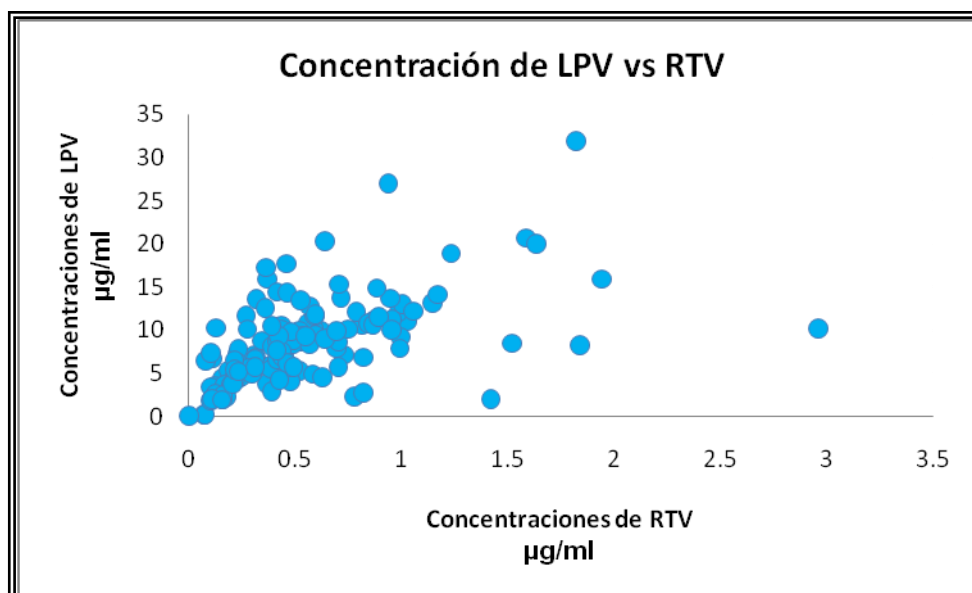


Figura 22. Concentraciones plasmáticas de LPV en función de RTV.

7.3. Determinación de la concentraciones de 6 β OH Cortisol en orina.

Se determinaron las concentraciones del metabolito del Cortisol (el 6 β OH Cortisol) en las muestras de orina (la primera de la mañana) de los pacientes VIH positivos. Las muestras se analizaron siguiendo el proceso de semipurificación descrito en la validación del método. Se analizó una curva de calibración y un duplicado de los puntos de control de calidad en los tres niveles, bajo, medio y alto (75, 200 y 750 ng/ml de 6 β OH Cortisol), los cuales se distribuyeron a lo largo de la corrida analítica en el análisis de muestras.

Las concentraciones obtenidas fueron muy variables, se distribuyeron en un intervalo de 160 a 936.704 ng/ml de 6 β OH Cortisol en orina.

En algunas muestras fue imposible la determinación del 6 β OH Cortisol, ya que el valor obtenido fue aberrante y como el analito de interés es un compuesto endógeno no tenemos muestra alguna libre del mismo, que nos sirva de referencia como una muestra blanco libre del compuesto.

7.4. Determinación del Cortisol en orina mediante reacción inmunológica a través de la técnica de ELISA.

Se realizaron las determinaciones de Cortisol en las muestras de orina de los pacientes participantes. El análisis se realizó por duplicado utilizando la técnica de inmunoensayo (ELISA). El Kit utilizado para realizar el análisis fue sensible (1 a 500 ng/ml) a las concentraciones medidas, las cuales se encontraron en un intervalo de 4.92 a 308.21 ng/ml de Cortisol en orina.

7.5. Determinación de la relación de la excreción urinaria del 6 β OHCortisol/Cortisol.

Las mediciones para el 6 β OHCortisol y para el Cortisol en las muestras de orina fueron muy variables y fue imposible la cuantificación de alguno de los componentes en varias muestras, ya que se obtuvieron valores aberrantes que no tenían lógica de acuerdo a la literatura. Las razones anteriores fueron un inconveniente que no permitieron establecer una correlación entre el 6 β OHCortisol/Cortisol para todos los pacientes.

Sin embargo en un 46% de la población participante si se logró establecer la correlación del 6 β OHCortisol/Cortisol, obteniendo en promedio una correlación de 3.856. En la tabla 25 se muestran los resultados de la correlación.

Excreción urinaria del 6 β OHCortisol/Cortisol			
Pacientes VIH+	6 β OHCortisol (ng/ml)	Cortisol (ng/ml)	Correlación β 6OHC/C
23 (46%)	655.48	169.97	3.85

Tabla 25. Concentraciones de 6 β OHCortisol y Cortisol en la primera orina de la mañana de pacientes con VIH en tratamiento con LPV/RTV.

7.6. Construcción del Modelo Farmacocinético Poblacional de Lopinavir

De acuerdo al desarrollo metodológico del estudio, en el cual solo se tiene un número limitado de muestras por paciente, se realizó un análisis farmacocinético poblacional empleando “*modelos no lineales de efectos mixtos*”. En la figura 23 se muestra el procedimiento de este modelaje de acuerdo a las recomendaciones propuestas por la FDA:

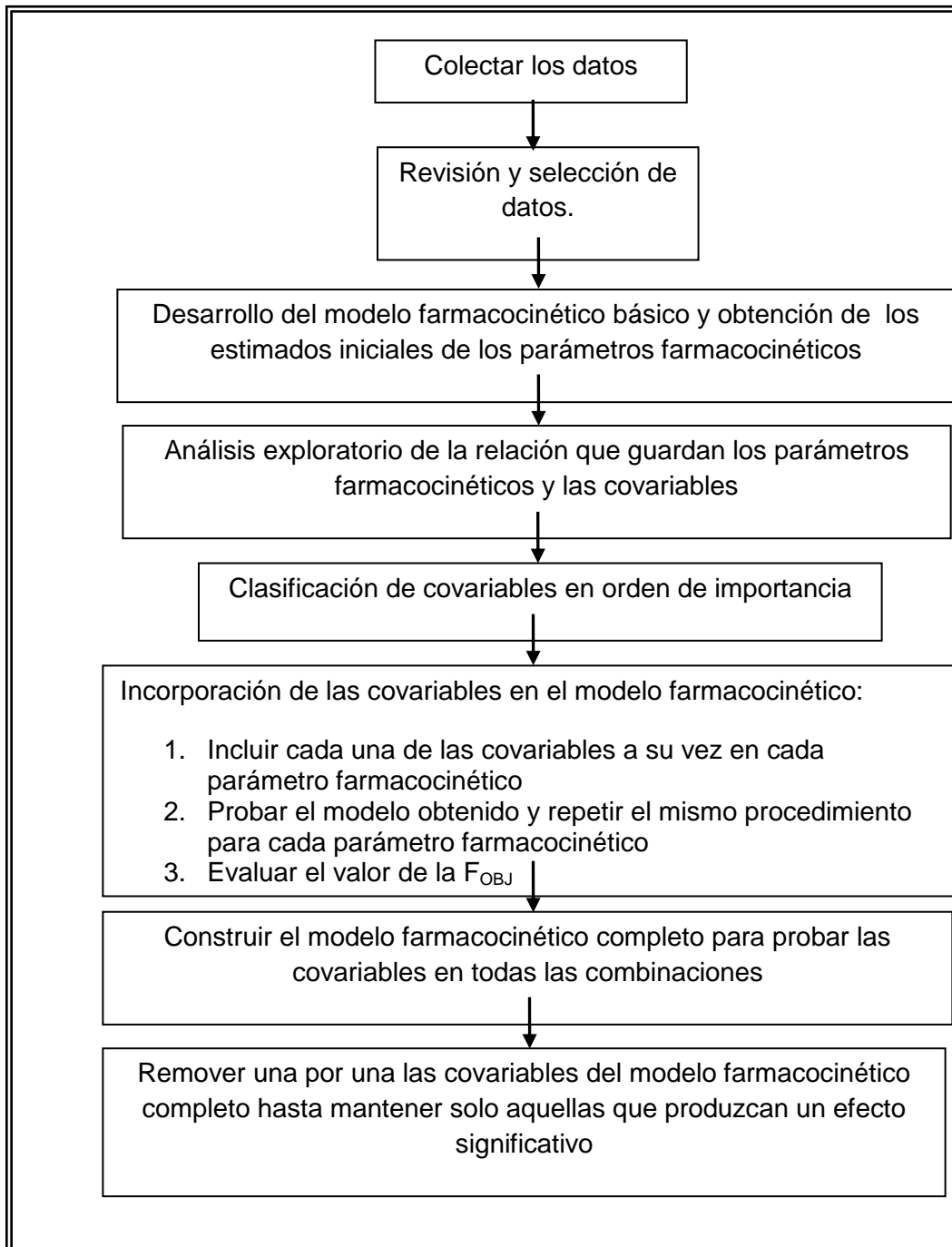


Figura 23 Esquema general para la construcción de un modelo de efectos mixtos (FDA, 1999; Domínguez-Gil, 2005; Herrera 2006).

La construcción del modelo de población se realizó con la ayuda del programa computacional NONMEM versión V (UCSF, San Francisco, CA,

USA), empleando el método de minimización de primer orden (F_{OBJ}). Este modelo se realizó considerando tres etapas: el desarrollo del modelo estructural, el desarrollo de los modelos de error interindividual y residual, y los modelos de inclusión de covariables.

7.6.1. Primera Etapa: Modelo Poblacional Básico en Pacientes VIH positivos.

El modelo básico se caracterizó por describir adecuadamente los datos generados en el estudio, pero sin relacionar parámetros farmacocinéticos con indicadores clínicos/fisiopatológicos individuales.

En esta etapa se optimizaron poblacionalmente los parámetros del modelo farmacocinético (aclaramiento, volumen aparente de distribución y constante de absorción del modelo cinético) es decir, los parámetros comunes a toda la población de estudio. El modelo farmacocinético que describió mejor el curso temporal de las concentraciones de lopinavir fue un modelo monocompartamental con absorción y eliminación de primer orden. Las subrutinas utilizadas fueron *ADVAN 2* y *TRANS 2*. Los parámetros estimados fueron depuración (Cl/F), volumen de distribución (Vd/F) y la constante de absorción (Ka). En la figura 24 se observa la gráfica representativa del modelo descrito.



Figura 24.-Modelo farmacocinético monocompartamental con absorción y eliminación de primer orden.

Posteriormente se probaron varios modelos de error interindividual y residual, y el mejor modelo para evaluar la variabilidad interindividual y la variabilidad residual en los parámetros, fue el modelo de error exponencial, en ambos casos. El modelo poblacional básico antes descrito estimó que los valores típicos de la población para los parámetros cinéticos fueron: CL 14.53 L/h, el volumen de distribución 40.9 L y la constante de absorción 2.25 h⁻¹. En la tabla 26 se muestran los estimados señalados.

Parámetros	Estimado	Variabilidad Interindividual (%)	Variabilidad Residual (%)
Cl/F (L/h)	14.53	140	35.21%
V/F (L)	40.9	40.12	
Ka (h ⁻¹)	2.25	1.21	

Tabla 26.-Parámetros estimados por el modelo básico o estructural generado por el NONMEM.

La variación interindividual que se obtuvo para cada uno de los parámetros promedio estimados fue de 140% para el CL/F, 40.12% para el V/F y 1.21% para la Ka, con una variabilidad residual (interindividual) del 35.21%.

Estos datos indican que la mayor variabilidad en los parámetros farmacocinéticos puede estar dada por la amplia variabilidad existente en la depuración. El valor de la función objetivo (F_{OBJ}) en este modelo básico fue de 499.35

Se realizó un análisis gráfico con la ayuda del programa Xpose2, se observaron las siguientes gráficas donde se calcula la relación entre la predicción media y las observaciones (mediciones). Las figuras 25, 26, 27 y 28 muestran la bondad de ajuste de las observaciones, predicciones y residuales ponderados calculados.

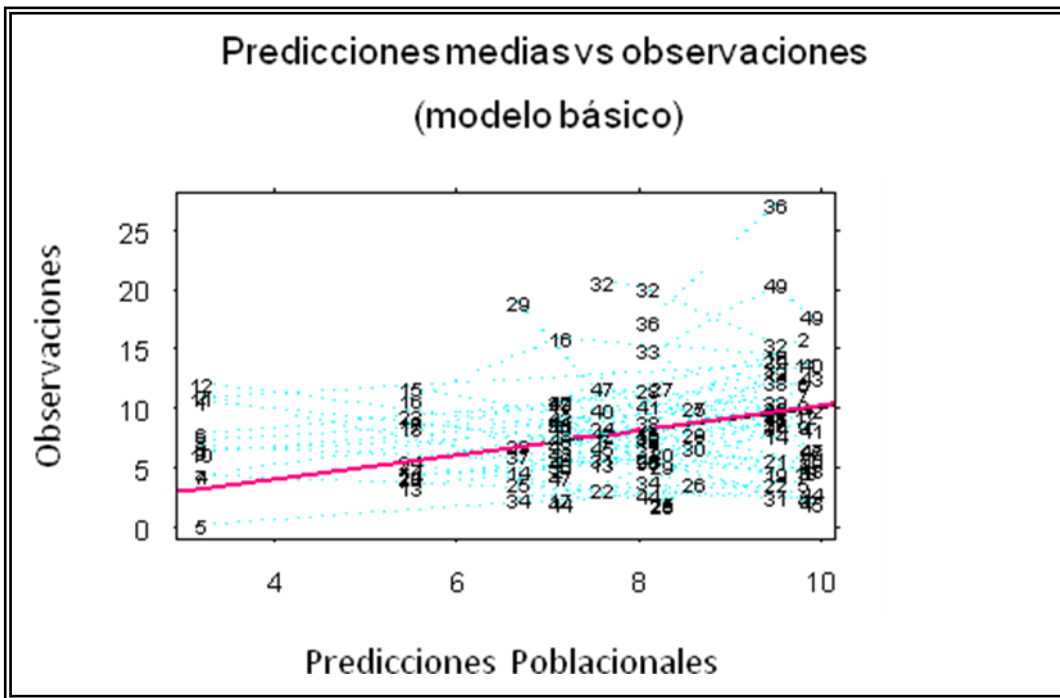


Figura 25. Bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados de lopinavir.

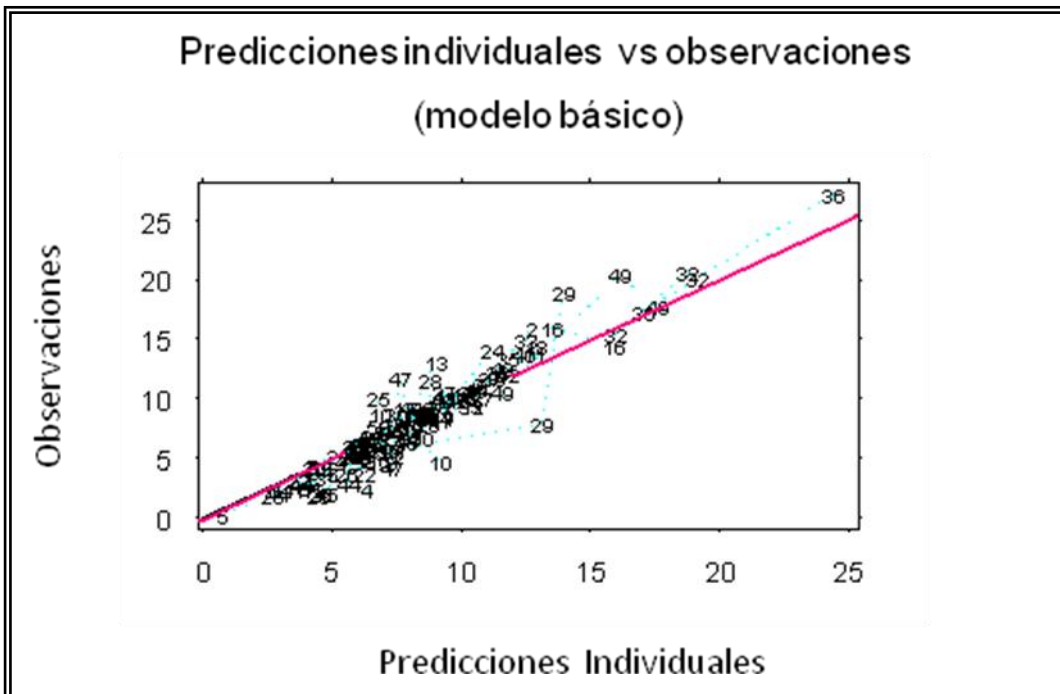


Figura 26. Bondad de ajuste de las predicciones individuales y las observaciones medidas, de los datos analizados de lopinavir.

y su posible correlación con la excreción urinaria del $6\beta\text{OH}$ Cortisol/Cortisol

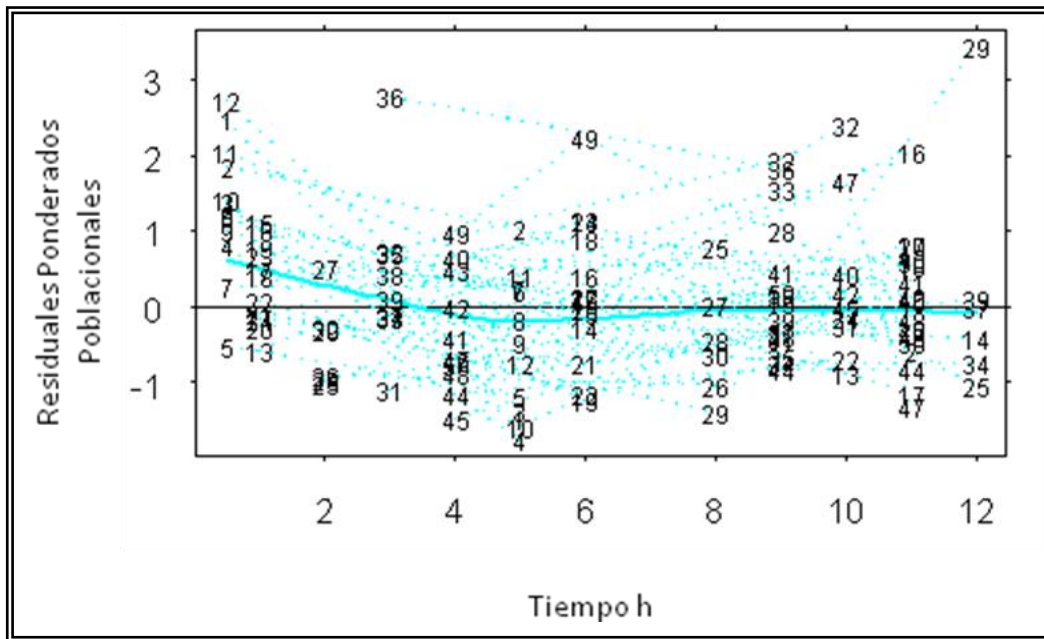


Figura 27. Bondad de ajuste de los residuales ponderados poblaciones en función del tiempo, de los datos analizados de lopinavir/ritonavir.

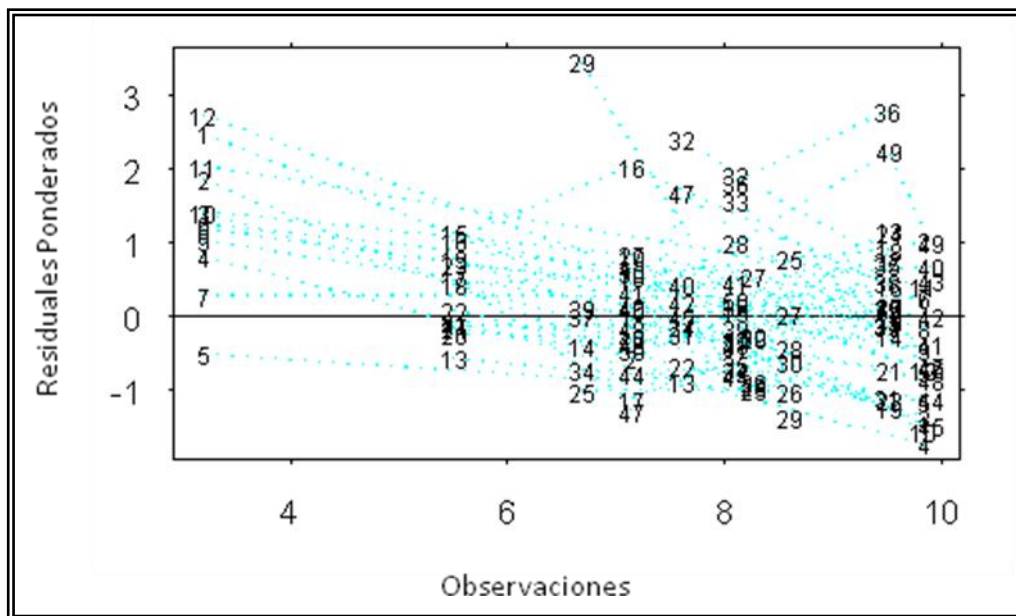


Figura 28. Gráfica de bondad de ajuste de los residuales ponderados y las observaciones de los datos analizados de lopinavir/ritonavir.

Del Modelo Estructural Básico se pasa a una segunda etapa, en la que se construye un Modelo Estructural Intermedio en el cual se incorporan las covariables que son estadísticamente significativas.

7.6.2 Segunda etapa: modelo intermedio. Estudio y selección de las variables predictoras o covariables.

En esta etapa se realizó la selección preliminar de las covariables individuales que pudieran afectar los procesos de depuración, distribución y la constante de absorción. Esta selección se realizó de forma automatizada con el programa XPOSE (Mandema y cols, 1991; Jonsson y Carlsson, 1999), y los modelos propuestos por Xpose se probaron en el NONMEM. El procedimiento empleado en el Xpose se llama análisis por modelos aditivos generalizados o GAM (*Generalized Additive Model*), con el objeto de establecer las posibles correlaciones con las covariables incluidas en el estudio. La forma en que se analizaron fue adicionando covariable por covariable y evaluando la significancia que genera para explicar la varianza. Posteriormente, se adicionan más de una covariable a la vez, hasta que se realizan todas las posibles combinaciones de covariables (Mandema y cols., 1991; Herrera Carranza, 2006).

En este análisis se exploró la relación entre los parámetros de constante de absorción, volumen de distribución y depuración con las covariables continuas peso corporal (kg, PESO), estatura (cm, TALL), índice de masa corporal (kg/cm^2 , IMC), edad (años, EDAD), influencia del inhibidor ritonavir (CRTV). De igual manera se exploró la influencia de las variables categóricas género (hombres, mujeres; SEXO), formulación farmacéutica (capsula=1, tableta=2; FF), administración de otros medicamentos (0 = ausencia, 1 = presencia, MED), y la relación del $6\beta\text{OHCortisol}$ /Cortisol (CORT) como indicador de la actividad del CYP3A4.

El análisis gráfico en Xpose proporcionó las siguientes gráficas que se muestran en la figura 29 sobre la influencia de las covariables probadas sobre los parámetros farmacocinéticos. Es importante señalar que la covariable de la relación del $6\beta\text{OHCortisol/Cortisol}$ (CORT) no mostró una influencia significativa.

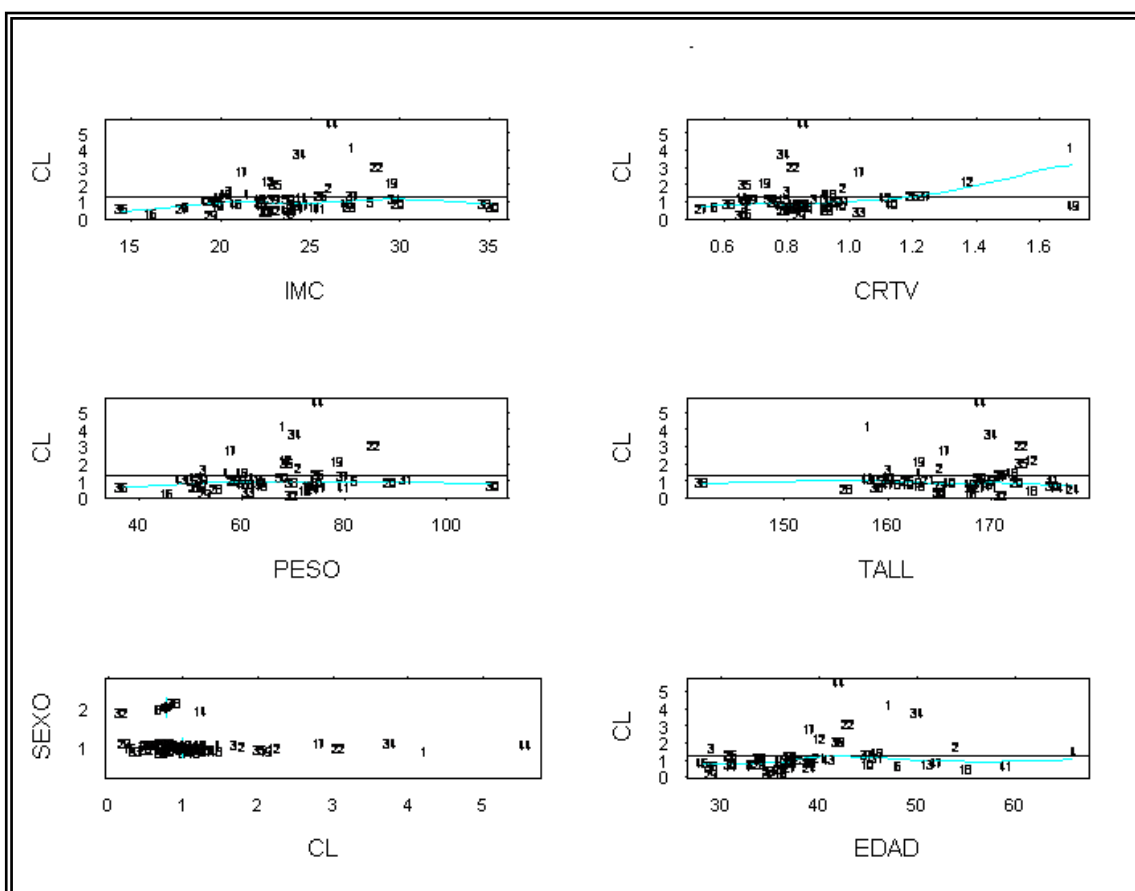


Figura 29. Exploración gráfica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la depuración.

En la figura 29 se observa que las covariables probadas y la influencia de las mismas sobre la depuración. Se observó que la mejor correlación con la depuración de lopinavir está dada por la EDAD y la concentración de ritonavir

(CRTV) ya que los valores dados por estas covariables se acercan al estimado inicial obtenido que fue CL/F 14.53 L. Además en cuanto a la variable categórica género (SEXO) mostró una depuración menor en el género femenino con respecto al género masculino. Por el contrario el resto de las variables probadas se observa que se distribuyen alrededor de la media estimada para la depuración, lo que nos indicó una menor correlación.

Con respecto al volumen de distribución el análisis gráfico proporcionó las siguientes gráficas que muestra la figura 30.

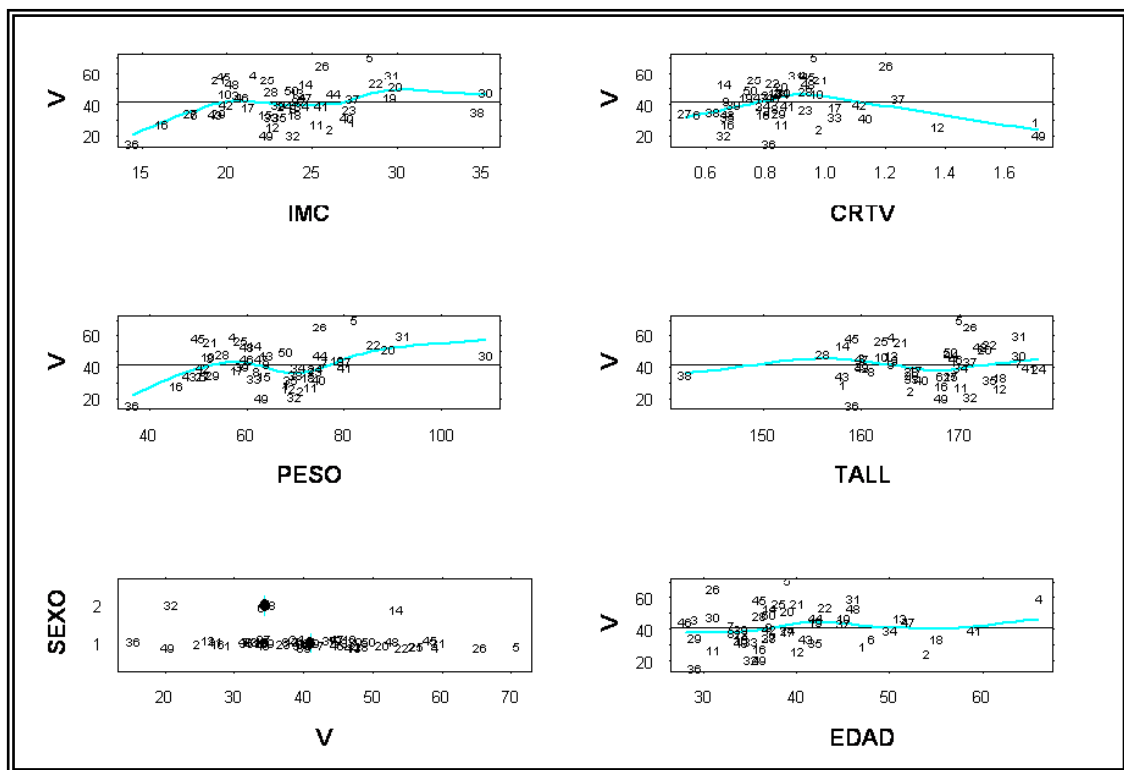


Figura 30. Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con el volumen de distribución.

En la figura 30 se muestran las gráficas del análisis GAM de la relación entre las covariables probadas y la influencia de las mismas sobre la depuración. Se observa que la mejor correlación con el volumen de distribución de lopinavir estuvo dada por el PESO, esto es notorio ya que los valores dados por esta covariable permite que los datos se aproximen de forma lineal al

estimado inicial obtenido que fue 40.9 L. Además que el género muestra un Vd menor en el género femenino con respecto al género masculino. En cuanto al resto de las variables probadas se observó que se distribuyen alrededor de la media estimada para el Vd, lo que nos indicó una menor correlación.

En lo que se refirió a la constante de absorción tenemos que el análisis gráfico que se muestra en la en la figura 31 muestra las gráficas del análisis GAM de la relación entre las covariables probadas y la influencia de las mismas sobre la Ka. Se observa que la mejor correlación con la constante de absorción de lopinavir está dada por la concentración de ritonavir (CRTV). Esta influencia muy notable puesto que los valores dados por esta covariable permite que los datos se aproximen a la media del estimado inicial obtenido que fue 2.42 (h⁻¹). Además que el género muestra una constante de absorción ligeramente menor en el género femenino con respecto al género masculino. Por el contrario el resto de las variables probadas se observó que se distribuyen alrededor de la media estimada para el Ka, lo que nos indicó una menor correlación.

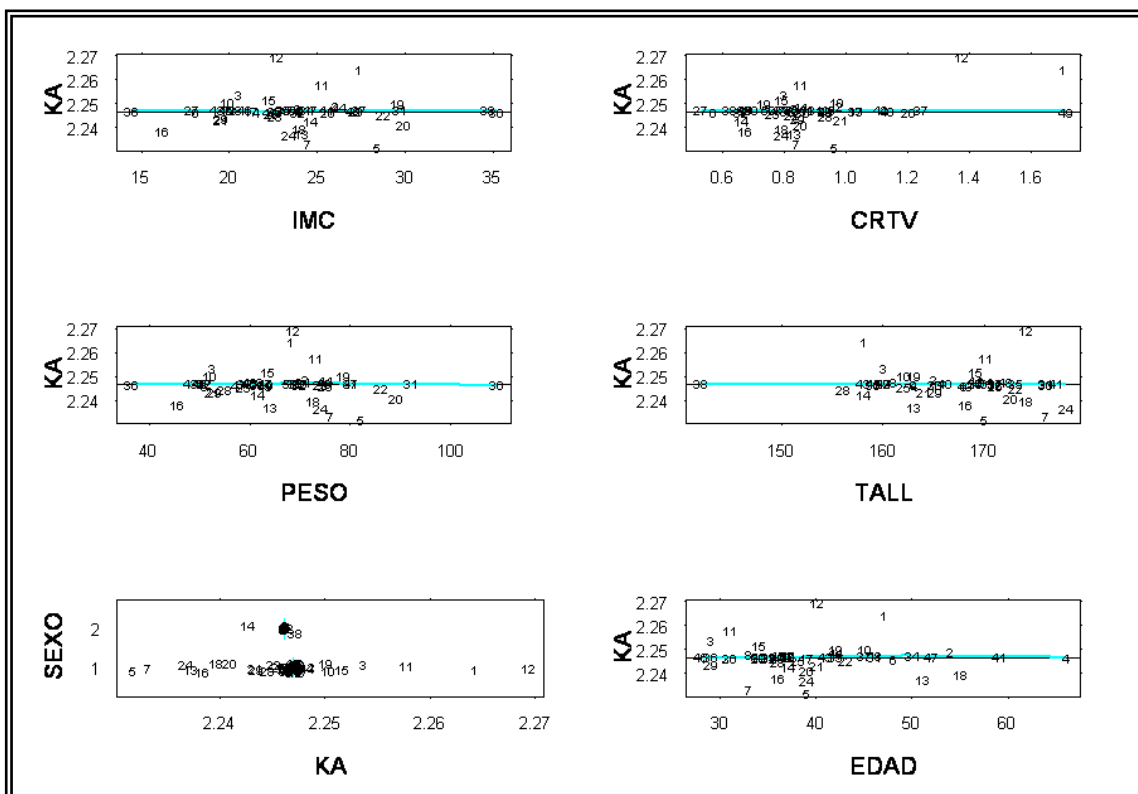


Figura 31. Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la constante de absorción.

Después de hacer una preselección inicial, se seleccionaron las covariables más importantes y se exploró la relación existente entre la covariable y el parámetro farmacocinético. Finalmente, con base en el criterio estadístico de *Akaike* que nos indica que tanta correlación existe entre el parámetro farmacocinético poblacional y las covariables evaluadas, se seleccionó aquella combinación de covariables que produjo el menor valor del criterio de Akaike (Akaike, 1974), ya que un valor menor en este criterio nos indicó una mayor correlación entre el parámetro farmacocinético y las covariables evaluadas.

En la tabla 27 se muestra cada uno de los modelos GAM obtenidos para la depuración y el valor de Akaike (AIC) para cada una de las combinaciones de covariables.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH-Cortisol/Cortisol

Modelo Aditivo General (GAM)	AIC
Modelo Estructural	54.558
CL ~ GENERO (SEXO)	55.502
CL ~ EDAD	53.564
CL ~ PESO	55.0699
CL ~ CRTV	52.917
CL ~ GENERO + CRTV	54.824
CL ~ EDAD + CRTV	52.2284
CL ~ PESO + CRTV	53.9729
CL ~ TALLA + CRTV	55.0568

Tabla 27. Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de Akaike con depuración (CL).

Se observó que la combinación de covariables que mejor correlacionó con la depuración o dicho de otra manera las covariables que pueden explicar la variabilidad en la depuración son la edad (EDAD) y la concentración de ritonavir (CRTV), lo cual se sustentó con un valor menor en el número de AIC de 52.2284, de acuerdo al GAM proporcionado por el Xpose.

La figura 32 muestra de forma gráfica el modelo de combinación de covariables para la depuración y como se vió la disminución del valor de *Akaike* al seleccionar la mejor combinación de covariables.

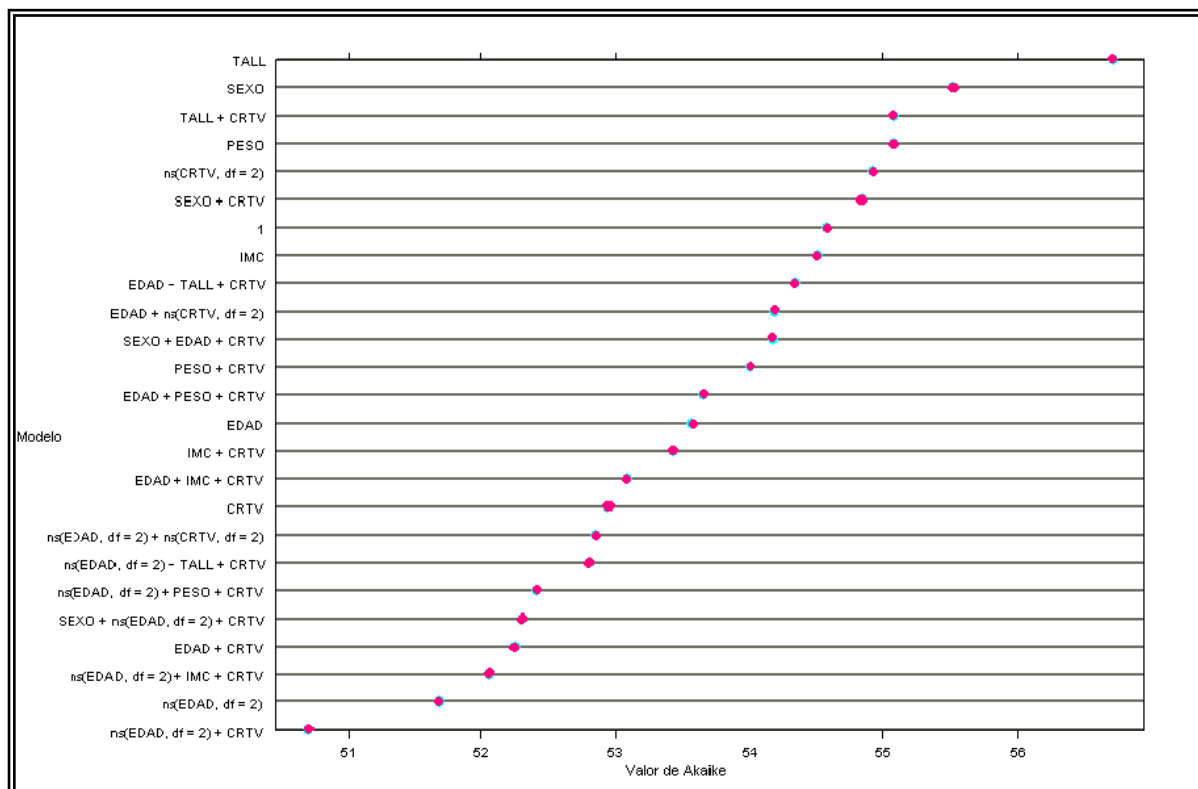


Figura 32. Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la depuración.

Al igual que para la depuración, se realizó el análisis de GAM en el Xpose para probar que covariables correlacionan con el volumen de distribución. De esta manera en la tabla 28 se muestra cada modelo propuesto para el volumen de distribución y el valor de Akaike (AIC) para cada una de las combinaciones de covariables.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6βOHCortisol/Cortisol

Modelo Aditivo General (GAM)	AIC
Modelo Estructural V=1	7213.23
V ~ GENERO (SEXO)	7357.592
V~ EDAD	7367.2238
V ~ PESO	7031.739
V ~ TALLA	7472.074
V ~ IMC	7054.479
V ~ CRTV	7443.843
V ~ GENERO + PESO	7206.965
V ~ EDAD + PESO	7236.55
V ~ TALLA + PESO	7251.902
V ~ IMC + PESO	7298.287
V ~ CRTV + PESO	7214.657

Tabla 28. Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con el volumen de dsitribución (V).

Para el caso del volumen de distribución la covariable que correlacionó con este parámetro fue el PESO, lo cual indicó que esta covariable puede explicar la variabilidad en el volumen de distribución.

En este análisis, la figura 33 muestra de forma gráfica el modelo de combinación de covariables para el volumen de distribución y como se vió la disminución del valor de *Akaike* al seleccionar la mejor combinación de covariables.

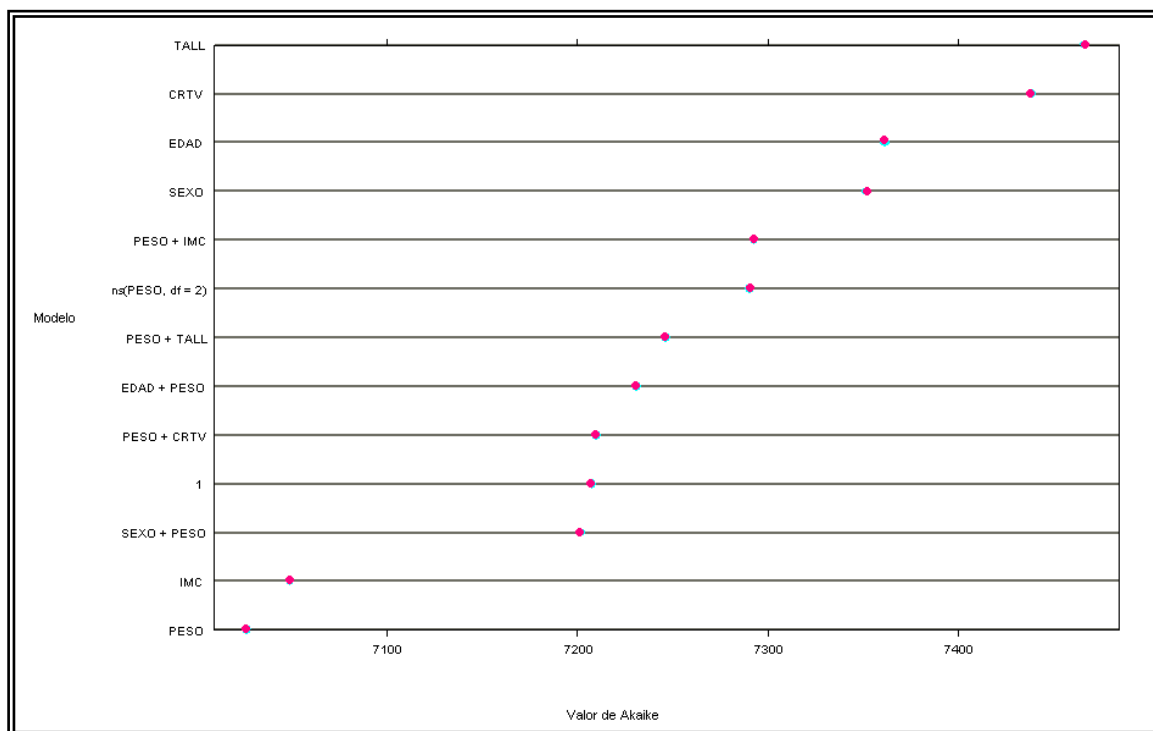


Figura 33. Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para el volumen de distribución.

Respecto al parámetro de constante de absorción se realizó un análisis de GAM para probar que covariables correlacionan con este parámetro. En la tabla 29 se muestra cada modelo propuesto para la constante de absorción y el valor de Akaike (AIC) para cada una de las combinaciones de covariables. Para el caso de la constante de absorción la covariable que correlacionó con este parámetro fue la concentración de ritonavir, lo cual indicó que estas covariables pueden explicar la variabilidad en la constante de absorción.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

Modelo Aditivo General (GAM)	AIC
Modelo Estructural KA=1	0.0019
KA ~ GENERO	0.002
KA~ EDAD	0.002
KA ~ PESO	0.002
KA ~ TALLA	0.002
KA ~ CRTV	0.0017
KA ~ GENERO + CRTV	0.0018
KA~ EDAD + CRTV	0.0018
KA ~ PESO + CRTV	0.0018
KA ~ TALLA + CRTV	0.0017
KA ~ IMC + CRTV	0.0018

Tabla 29. Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con la constante de absorción.

La figura 34 muestra de forma gráfica el modelo de combinación de covariables para la constante de absorción y como se vió la disminución del valor de *Akaike* al seleccionar la mejor combinación de covariables.

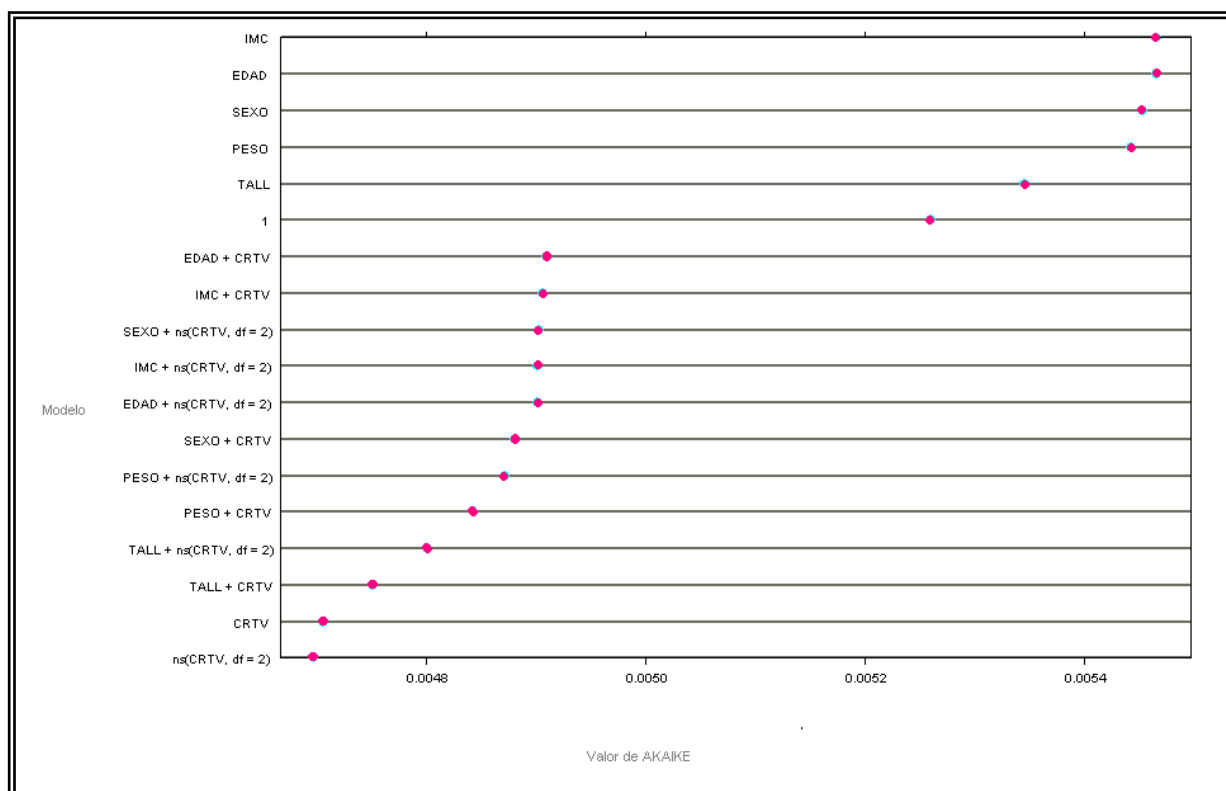


Figura 34. Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la constante de absorción.

7.6.3 Tercera etapa: Construcción del modelo poblacional final

Desde el Modelo Estructural Intermedio se pasa a un Modelo estructural Final que incluye las variables que son estadísticamente significativas, como se observa en la tabla 30. En esta etapa se incorpora el valor de la intersección que proporciona el análisis de GAM a través del programa Xpose y se corroboró la influencia de variable propuesta por el GAM el modelo realizado en el NONMEM

Para la depuración, al iniciar el análisis GAM, se inició con un modelo inicial donde CL=1, al finalizar este análisis se arrojó un modelo final en función de las covariables que mayor correlación mostraron. El modelo final proporcionado para la depuración fue Cl= EDAD + CRTV. El modelo final arrojó un valor de la intersección para cada una de las covariables estadísticamente

significativas en este caso los valores de la intersección fueron: -0.003 y 1.06 para la EDAD y CRTV, respectivamente. El valor de estas intersecciones se incorporó uno a uno en el modelo final en el NONMEN. Sin embargo estas variables no correlacionaron significativamente con los parámetros y no se estimó la varianza y covarianza en el NONMEN.

Respecto al volumen de distribución, al iniciar el análisis GAM, se inició con un modelo inicial donde $V=1$, al finalizar este análisis se arrojó un modelo final en función de la covariable que mayor correlación mostró. El modelo final proporcionado para la el volumen de distribución fue $V=$ PESO. El modelo final arrojó un valor de la intersección para la covariable estadísticamente significativa en este caso el valor de la intersección fue: 0.2307 para el PESO. El valor de esta intersección se incorporó en el modelo final en el NONMEN. Esta covariable logró explicar la variabilidad para el volumen de distribución y al incorporarse en el modelo de NONMEN se estimó la varianza y covarianza, con lo que se concluyó el análisis estadístico de manera satisfactoria, obteniendo un valor para la variable de 0.493 para el PESO, con una $F_{OBJ}=488.225$ la cual fue menor que la inicial $F_{OBJ}=499.35$.

Finalmente en el análisis GAM realizado para la constante de absorción, se inició con un modelo inicial donde $Ka=1$, al finalizar este análisis se arrojó un modelo final en función de la covariable que mayor correlación mostró. El modelo final proporcionado para la constante de absorción fue $Ka=$ CRTV. El modelo final arrojó un valor de la intersección para la covariable estadísticamente significativa en este caso el valor de la intersección fue: 0.013 para la CRTV. El valor de esta intersección se incorporó en el modelo final en el NONMEN. Sin embargo esta variable no correlacionó significativamente con los parámetros y no se estimó la varianza y covarianza en el NONMEN.

De esta manera el modelo final se obtuvo al incluir la covariable PESO, en el volumen de distribución. Los estimados finales del modelo

farmacocinético poblacional para lopinavir se muestran en la tabla 30. También se realizó un ejercicio incluyendo el valor de la covariable sobre la ecuación final:

$$V = 10.4 \text{ (L)} + (0.493 * \text{PESO})$$

Modelo	F _{OBJ} (FO)	Variabilidad Interindividual	Variabilidad Residual
Básico TVCL = 14.53 (L/h) TVVd = 40.9 (L) TVKa = 2.25 (h ⁻¹)	499.35	140% 40.12% 1.21%	35.21%
Final TVCL= 11.85 (L/h) TVVd = 10.4 (L) + (0.493* PESO) TVKa = 2.42 (h ⁻¹)	488.225	146.28% 36.19% 36.87%	34.92%
Ecuación $V = 10.4 \text{ (L)} + (0.493 * \text{PESO})$ $V = 10.4 \text{ (L)} + (0.493 * 65.96 \text{ kg}) = \underline{42.91L}$ Ajuste Poblacional Final.			

Tabla 30. Los valores se presentan como los estimados poblacionales medios de los parámetros farmacocinéticos. F_{OBJ} es el valor de la función objetivo proporcionada por NONMEM. Se muestran los datos generados por el modelo inicial y el modelo final donde la variable que mejor predicción presentó fue el peso.

En la figura 35 se muestra la bondad de ajuste para el modelo poblacional final de lopinavir.

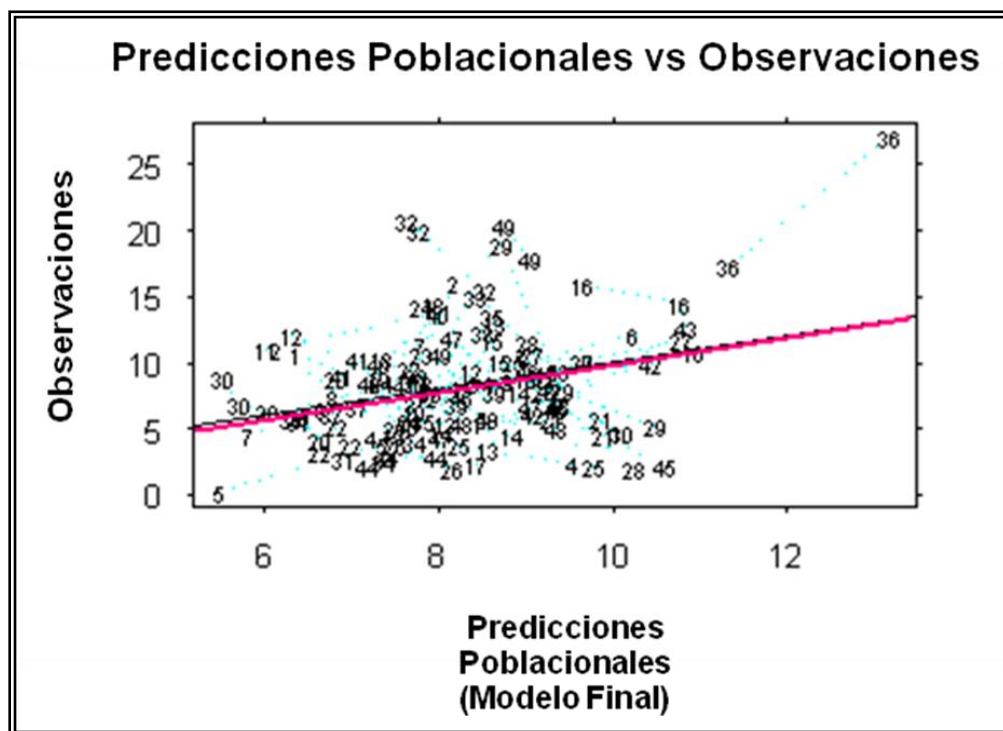


Figura 35. Gráfica de bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales finales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados en el modelo final de lopinavir.

Una vez realizado el modelo farmacocinético poblacional para lopinavir, se buscó de manera independiente, que covariables influyen en la concentración de ritonavir (CRTV). Si la CRTV influye sobre los parámetros de lopinavir, se sospechó que alguna de las covariables probadas pudo influir en las concentraciones de ritonavir de manera directa, para que estas concentraciones influyan a su vez indirectamente sobre los parámetros farmacocinéticos de lopinavir en la población de estudio. El análisis se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente:

7.7. Construcción del modelo Farmacocinético Poblacional de Ritonavir

7.7.1. Primera Etapa: Modelo Poblacional Básico de ritonavir en Pacientes VIH positivos.

En esta etapa se optimizaron poblacionalmente los parámetros del modelo farmacocinético par ritonavir (aclaramiento, volumen aparente de distribución y en este caso se decidió fijar el valor para la constante de absorción del modelo farmacocinético) es decir, los parámetros comunes a toda la población de estudio.

El modelo farmacocinético que describió mejor el curso temporal de las concentraciones de ritonavir fue un modelo monocompartamental con absorción de primer orden. Las subrutinas utilizadas fueron *ADVAN 2* y *TRANS 2*. Los parámetros estimados fueron depuración (Cl/F), volumen de distribución (Vd/F) y la constante de absorción (Ka) permaneció con un valor fijo. En la figura 36 se observa la gráfica representativa de un modelo monocompartamental con absorción y eliminación de primer orden.

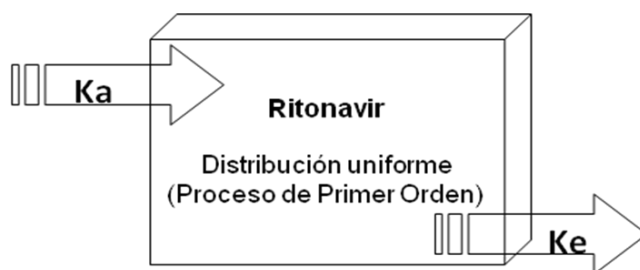


Figura 36. Modelo farmacocinético monocompartamental de primer orden con absorción y eliminación de primer orden.

Posteriormente se probaron varios modelos de error interindividual y residual, y el mejor modelo para evaluar la variabilidad interindividual y la variabilidad residual en los parámetros fue el modelo de error exponencial, en ambos casos. El modelo poblacional básico antes descrito estimó los valores

típicos de la población para los parámetros cinéticos de ritonavir y fueron: CL 42.9 L/h, el volumen de distribución 149 L y la constante de absorción 0.18 h⁻¹ Fix (Fijo). En la tabla 31 se muestran los estimados señalados.

Parámetros	Estimado	Variabilidad Interindividual (%)	Variabilidad Residual (%)
Cl/F (L/h)	42.9	44.94	69.57
V/F (L)	149	82.46	
Ka (h ⁻¹)	0.18 (Fix)	2.11	

Tabla 31. Parámetros estimados por el modelo básico o estructural generado por el NONMEM.

La variación interindividual que se obtuvo para cada uno de los parámetros promedio estimados fue de 44.94% para el CL/F, 82.46% para el V/F y 2.11% para la Ka, con una variabilidad residual interindividual del 69.57%. Lo que indicó que la mayor variabilidad en los parámetros farmacocinéticos de ritonavir está dada tal vez por la amplia variabilidad existente en el volumen de distribución. El valor de la función objetivo (F_{OBJ}) en este modelo básico de ritonavir fue de -79.94.

Se realizó también un análisis gráfico con la ayuda del programa Xpose2, se observaron las siguientes gráficas que aparecen en las figuras 37, 38, 39 y 40, donde se calcula la bondad de ajuste entre la predicción media y las observaciones (mediciones) y los residuales ponderados.

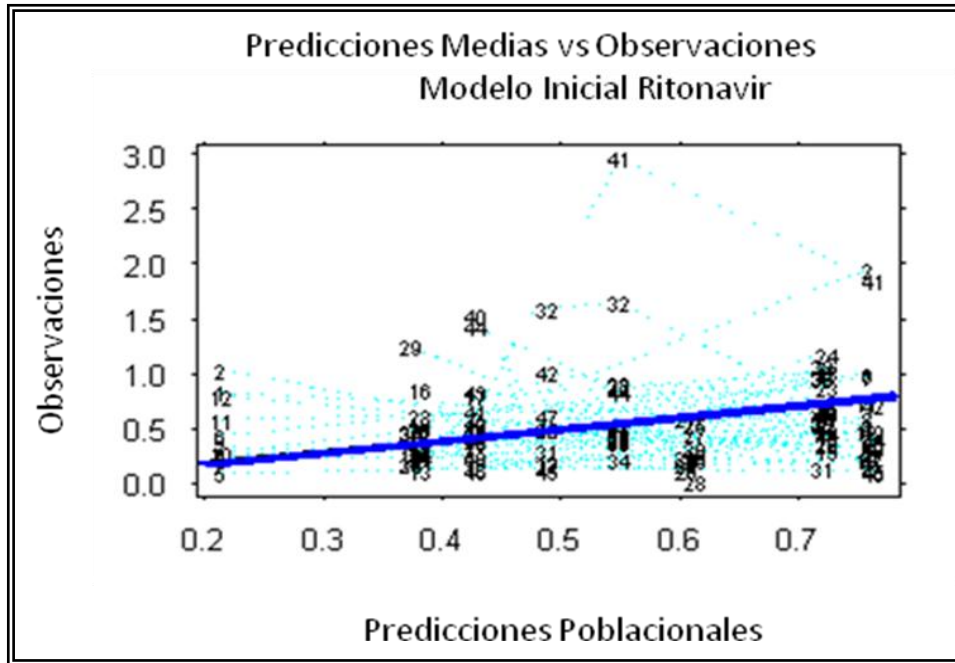


Figura 37. Bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados de ritonavir

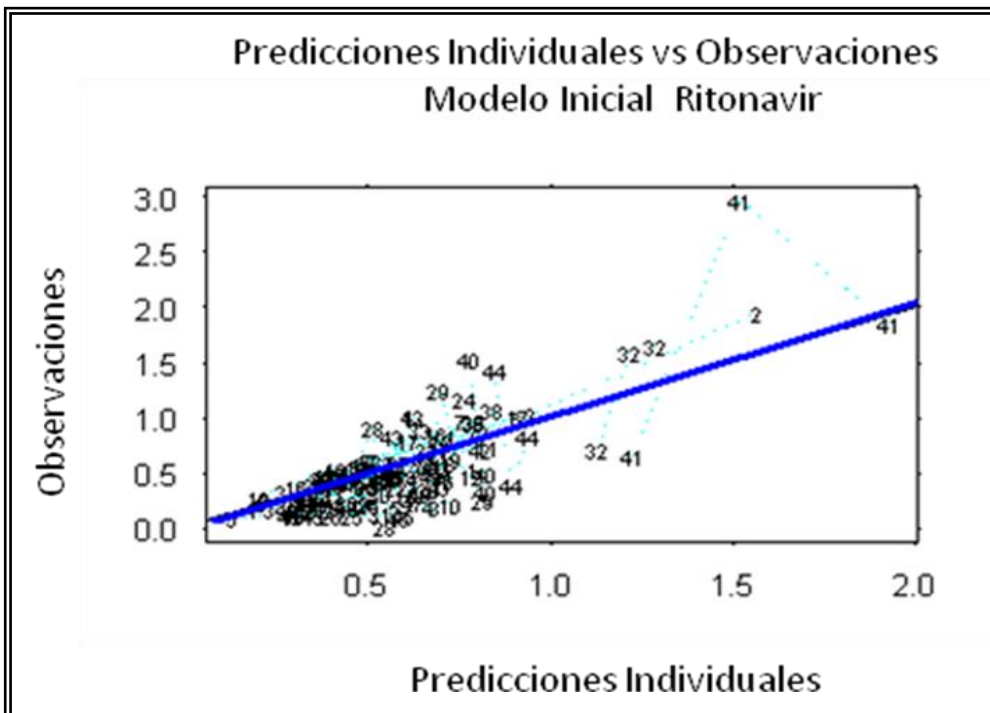


Figura 38. Bondad de ajuste de las predicciones individuales y las observaciones medidas, de los datos analizados de ritonavir.

y su posible correlación con la excreción urinaria del $6\beta\text{OHCortisol/Cortisol}$

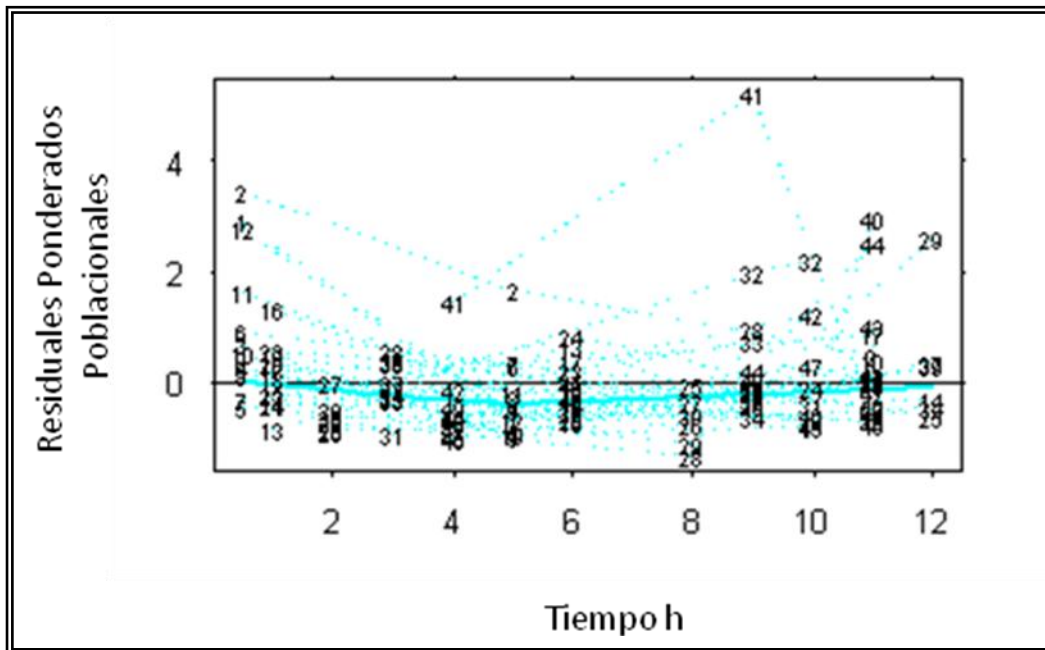


Figura 39. Bondad de ajuste de los residuales ponderados poblaciones en función del tiempo, de los datos analizados de ritonavir.

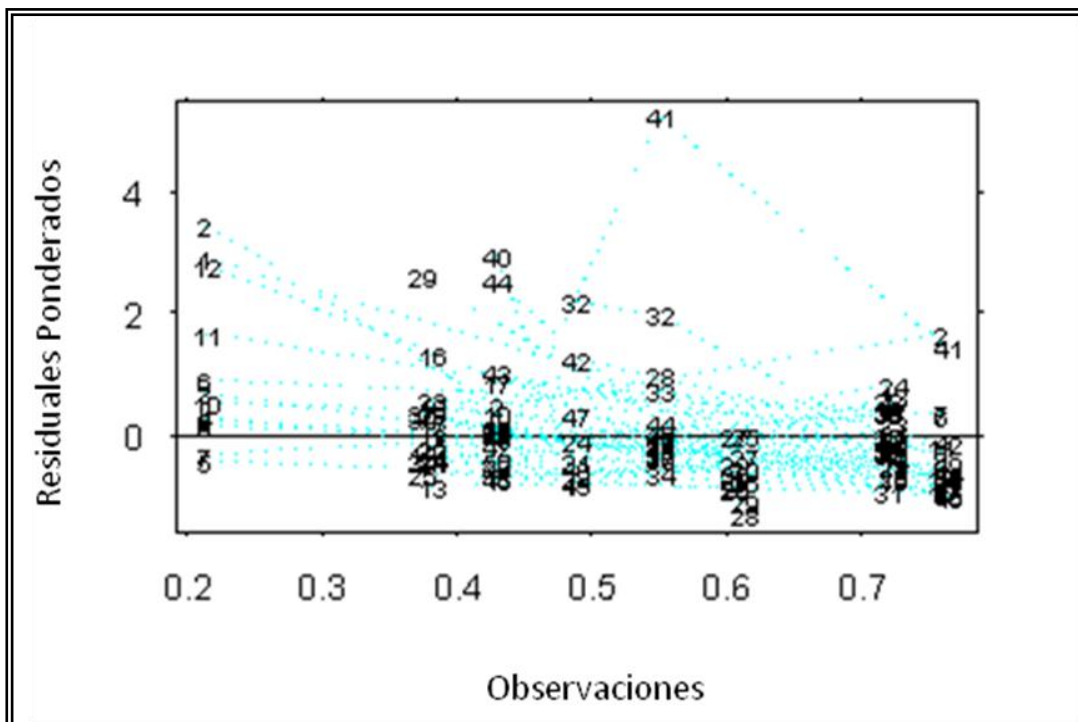


Figura 40. Bondad de ajuste de los residuales ponderados y las observaciones de los datos analizados de ritonavir.

Del Modelo Estructural Básico de ritonavir se pasó a una segunda etapa, en la que se construye un Modelo Estructural Intermedio en el cual se incorporaron las covariables que son estadísticamente significativas.

7.7.2 Segunda etapa: modelo intermedio de ritonavir. Estudio y selección de las variables predictoras o covariables.

En esta etapa se realizó la selección preliminar de las covariables individuales que pudieran afectar los procesos de depuración y distribución ya que la constante de absorción se fijó en un valor referido por la literatura. Esta selección se realizó de forma automatizada con el programa XPOSE (Mandema y cols, 1991; Jonsson y Carlsson, 1999), y los modelos propuestos por Xpose se probaron en el NONMEM. El procedimiento empleado en el Xpose se llama análisis por modelos aditivos generalizados o GAM (*Generalized Additive Model*), con el objeto de establecer las posibles correlaciones con las covariables incluidas en el estudio. La forma en que se analizaron fue adicionando covariable por covariable y evaluando la significancia que generó para explicar la varianza. Posteriormente, se adicionó más de una covariable a la vez, hasta que se realizaron todas las posibles combinaciones de covariables. (Mandema y cols., 1991; Herrera Carranza, 2006).

En este análisis para ritonavir se exploró la relación entre los parámetros volumen de distribución y depuración con las covariables continuas peso corporal (kg, PESO), estatura (cm, TALL), índice de masa corporal (kg/cm^2 , IMC), edad (años, EDAD). De igual manera se exploró la influencia de las variables categóricas género (hombres, mujeres; SEXO), formulación farmacéutica (capsula=1, tableta=2; FF), administración de otros medicamentos (0 = ausencia, 1 = presencia, MED), y la relación del $6\beta\text{OHCortisol}$ /Cortisol (CORT) como indicador de la actividad del CYP3A4, como se realizó en el modelaje anterior.

El análisis gráfico en Xpose proporcionó las siguientes gráficas que se muestran en la figura 41 sobre la influencia de las covariables probadas sobre los parámetros farmacocinéticos. Es importante señalar que la covariable de la relación del $6\beta\text{OHCortisol/Cortisol}$ (CORT) no mostró una influencia significativa.

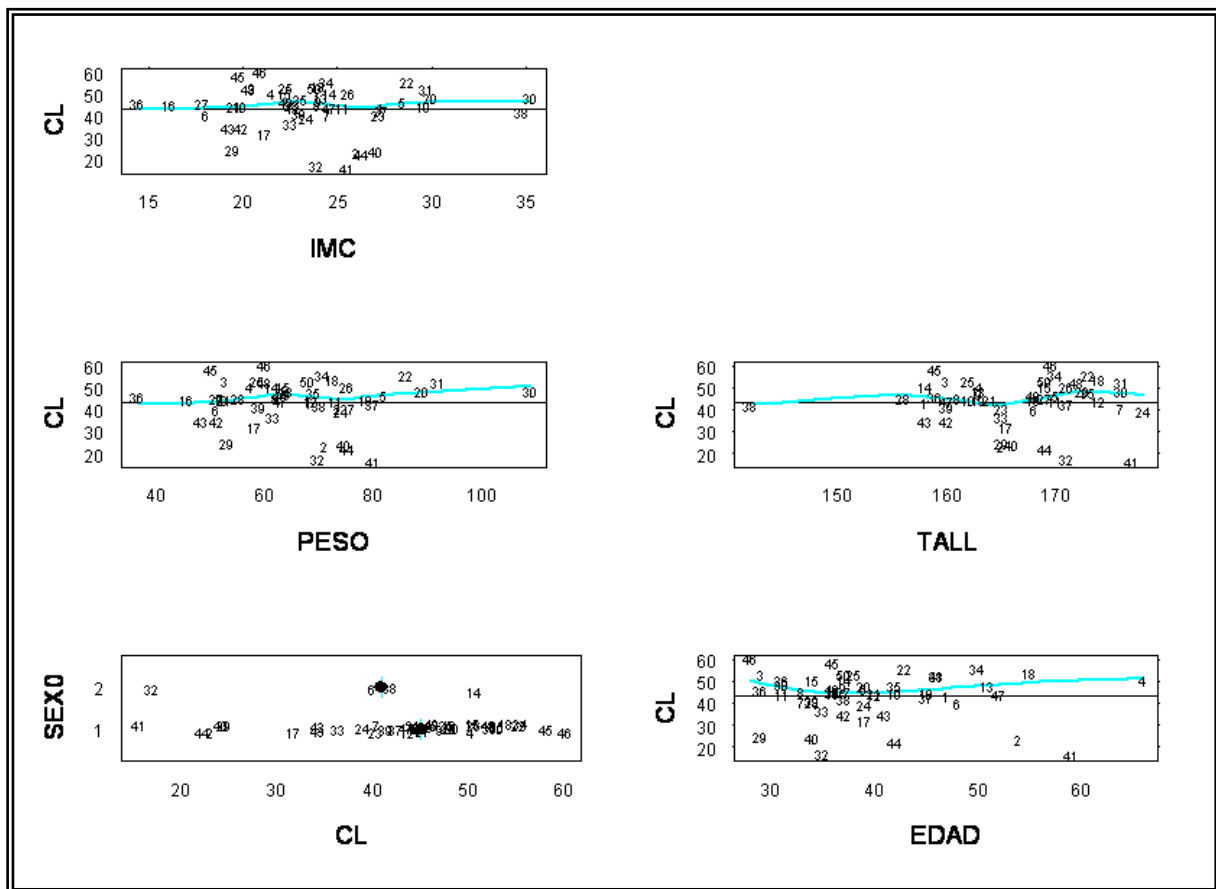


Figura 41. Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la depuración del ritonavir.

En la figura 41 se observa que las covariables probadas y la influencia de las mismas sobre la depuración del ritonavir. Se observó que la mejor correlación con la depuración de lopinavir está dada por la variable categórica

GENERO (SEXO), ya que los valores dados por estas covariables se acercan al estimado inicial obtenido que fue CL/F 42.9 L. Además en cuanto al valor medio muestra una depuración menor en el género femenino con respecto al género masculino. Por el contrario el resto de las variables probadas se observa que se distribuyen alrededor de la media estimada para la depuración, lo que nos indicó una menor correlación.

Con respecto al volumen de distribución el análisis gráfico proporcionó las siguientes gráficas que muestra la figura 42

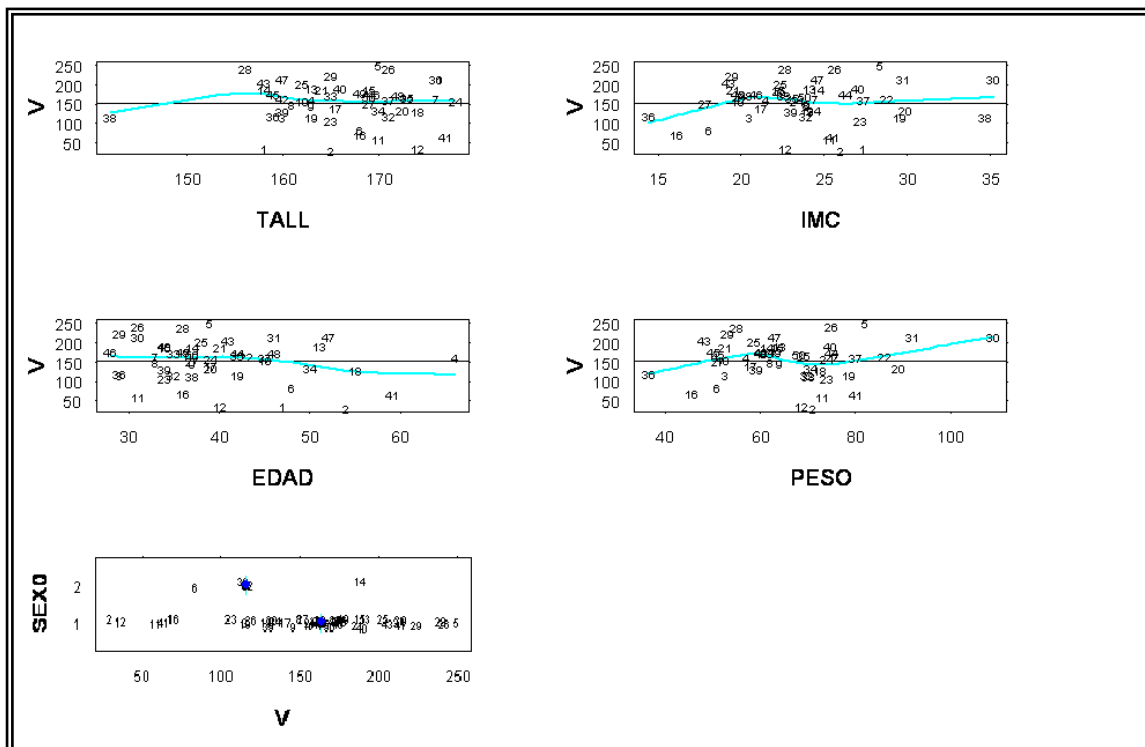


Figura 42. Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con el volumen de distribución del ritonavir.

En la figura 42 se muestran la gráficas del análisis GAM de la relación entre las covariables probadas y la influencia de las mismas sobre la el volumen de distribución. Se observó que la mejor correlación con el volumen de distribución de ritonavir está dada por la EDAD, esto es notorio ya que los valores dados por esta covariable permite que los datos se aproximen de forma

lineal al estimado inicial obtenido que fue 149 L, esta aproximación se observa en el intervalo de edades de 30 a 45 años. Además que el género mostró un Vd mucho menor en el sexo femenino con respecto al sexo masculino. En cuanto al resto de las variables probadas se observó que se distribuyen alrededor de la media estimada para el Vd, lo que nos indicó una menor correlación.

En lo que refirió a la constante de absorción tenemos que el análisis gráfico que se observa en la en la figura 43, muestra las gráficas del análisis GAM de la relación entre las covariables probadas y la influencia de las mismas sobre la Ka. Se observó que la mejor correlación con la constante de absorción de ritonavir estuvo dada por la EDAD. Esta influencia muy notable puesto que los valores dados por esta covariable permiten que los datos se aproximen a la media del estimado inicial que permaneció fijo con un valor de 0.18 (h⁻¹). Además que el género muestra una constante de absorción ligeramente menor en el sexo femenino con respecto al género masculino. Por el contrario el resto de las variables probadas se observa que se distribuyen alrededor de la media estimada para el Ka, lo que nos indicó una menor correlación.

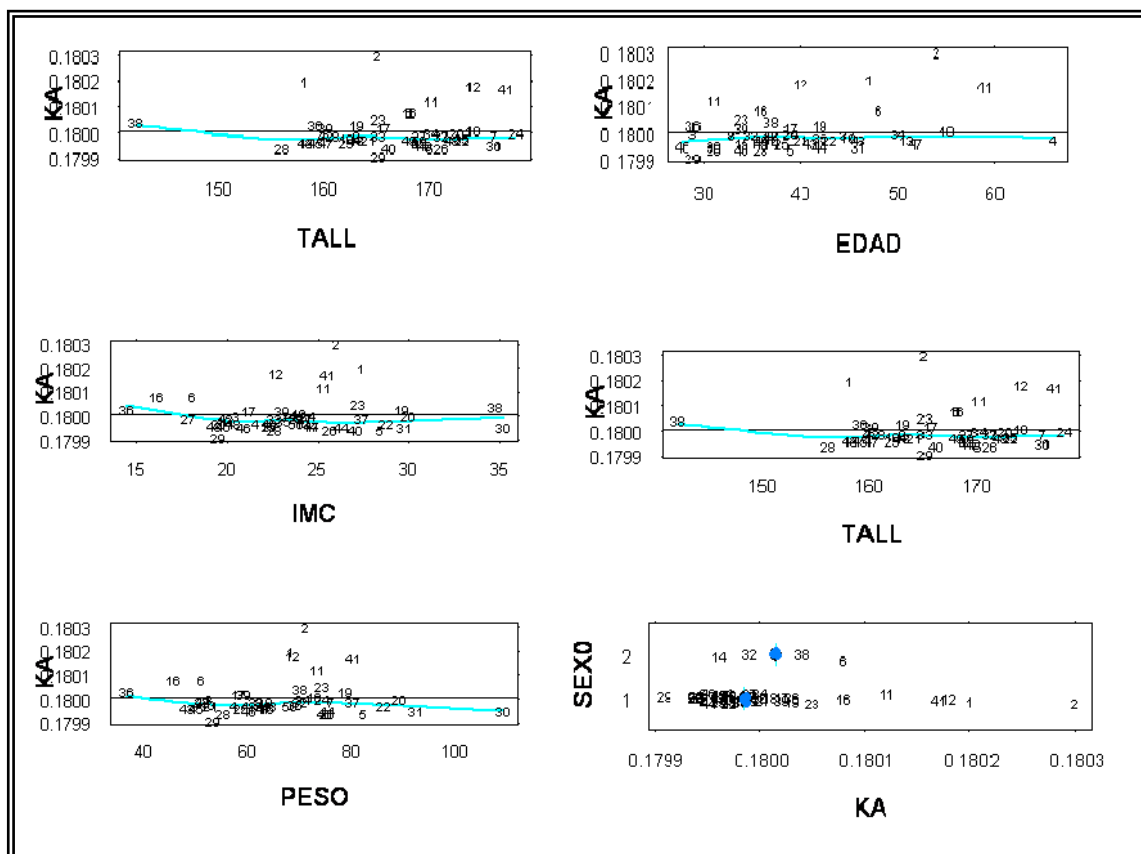


Figura 43. Exploración grafica realizada en Xpose de la relación que guardan las covariables analizadas con la constante de absorción a la cual se le asignó un valor fijo.

Después de hacer una preselección inicial, se seleccionaron las covariables más importantes y se exploró la relación existente entre la covariable y el parámetro farmacocinético. Finalmente con base al criterio estadístico de *Akaike* que nos indicó que tanta correlación existe entre el parámetro farmacocinético poblacional y las covariables evaluadas, se seleccionó aquella combinación de covariables que produjo el menor valor del criterio de Akaike (Akaike, 1974), ya que un valor menor en este criterio nos indica una mayor correlación entre el parámetro farmacocinético y las covariables evaluadas.

En la tabla 32 se muestra cada uno de los modelos GAM obtenidos para la depuración de ritonavir y el valor de Akaike (AIC) para cada una de las combinaciones de covariables.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6βOHCortisol/Cortisol

Modelo Aditivo General (GAM)	AIC
Modelo Estructural	5337.575
CL ~ GENERO (SEXO)	-2437.036
CL ~EDAD	-2221.012
CL ~PESO	-2128.266
CL ~TALLA	-2128.414
CL ~ IMC	-2128.715
CL ~ EDAD + SEXO	-2347.748
CL ~ PESO + SEXO	-2230.427
CL ~ TALLA + SEXO	-2253.269
CL ~ IMC + SEXO	-2228.016

Tabla 32. Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con depuración (CL) del ritonavir.

Se observó que la variable que mejor correlacionó con la depuración o dicho de otra manera la covariable que puede explicar la variabilidad en la depuración es el GENERO (SEXO), lo cual se sustenta con un valor menor en el número de AIC de -2437.036, de acuerdo al GAM proporcionado por el Xpose.

La figura 44 muestra de forma gráfica el modelo de combinación de covariables para la depuración y como se vió la disminución del valor de *Akaike* al seleccionar la mejor combinación de covariables.

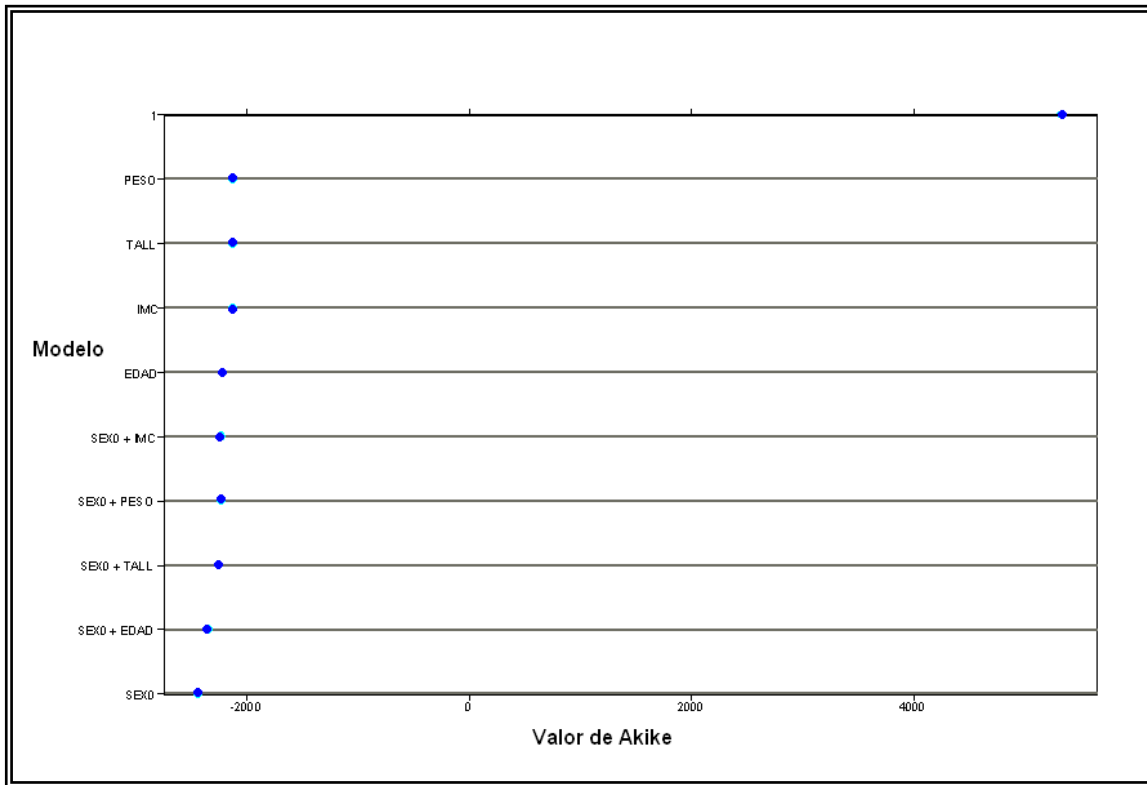


Figura 44. Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la depuración del ritonavir.

Al igual que para la depuración, se realizó el análisis de GAM en el Xpose para probar que covariables correlacionan con el volumen de distribución. De esta manera en la tabla 33 se muestra cada modelo propuesto para el volumen de distribución y el valor de Akaike (AIC) para cada una de las combinaciones de covariables.

Modelo Aditivo General (GAM)	AIC
Modelo Estructural V=1	143234.9
V ~ GENERO (SEXO)	-99838.39
V~ EDAD	-1170881.1
V ~ PESO	-96374.15
V ~ TALLA	-98034.96
V ~ IMC	-96837.38
V ~ GENERO + EDAD	-116875.3
V ~ EDAD + PESO	-113229.8
V ~ EDAD + TALLA	-112226.5
V ~ EDAD + IMC	-113643.9

Tabla 33. Modelos proporcionados por Xpose para explorar la correlación de las covariables a través del criterio de akaike con el volumen de distribución (V).

Para el caso del volumen de distribución la covariable que correlacionó con este parámetro fue la EDAD, lo cual indicó que esta covariable puede explicar la variabilidad en el volumen de distribución.

En este análisis la figura 45 muestra de forma gráfica el modelo de combinación de covariables para el volumen de distribución y como se vió la disminución del valor de *Akaike* al seleccionar la mejor combinación de covariables.

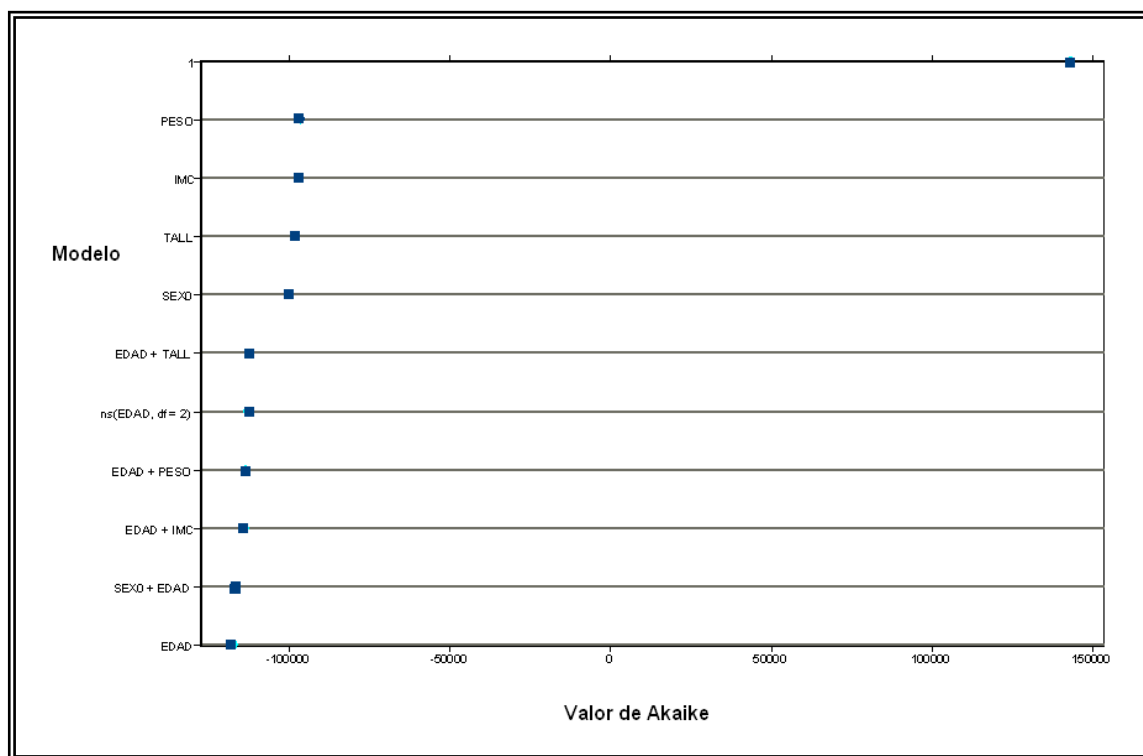


Figura 45. Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para el volumen de distribución del ritonavir.

Respecto al parámetro de constante de absorción se realizó un análisis de GAM para probar que covariables correlacionan con este parámetro. Sin embargo en este análisis el resumido GAM no concluyó satisfactoriamente, puesto que la variable se estableció con la indicación de “fijo”, aun cuando gráficamente si llevo a cabo el análisis.

La figura 46 muestra de forma gráfica el modelo de combinación de covariables para la constante de absorción y como se vió la disminución del valor de *Akaike* al seleccionar la mejor combinación de covariables.

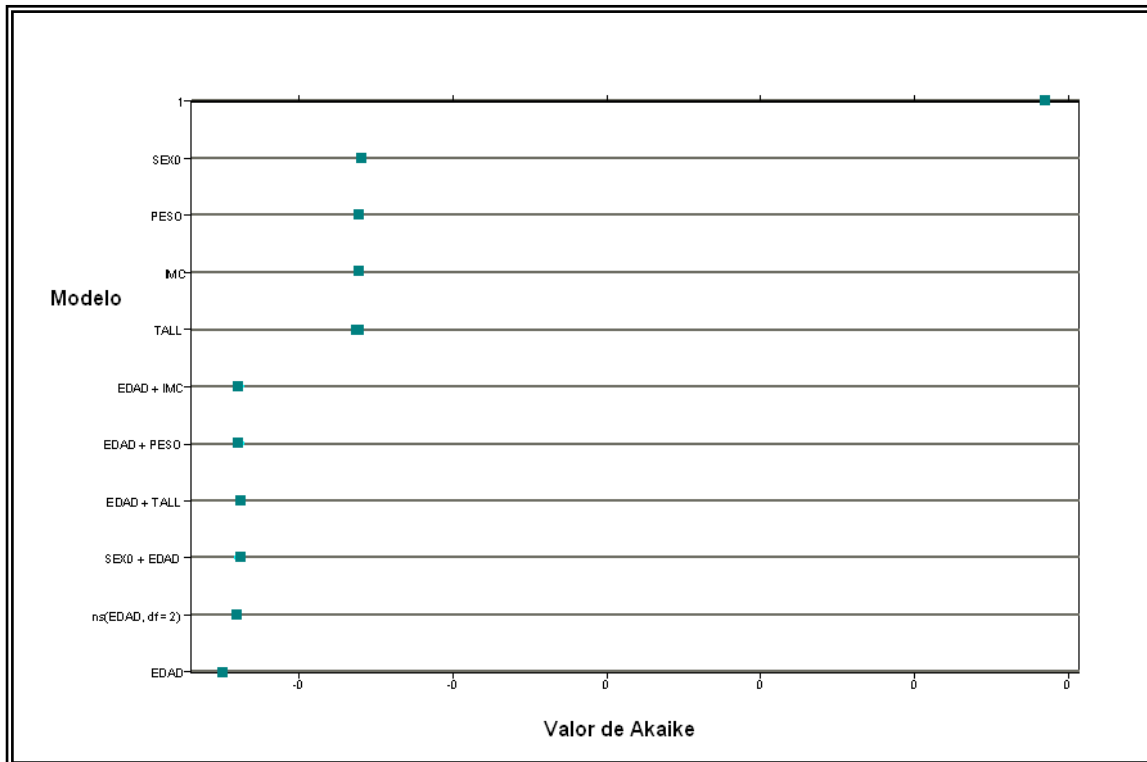


Figura 46. Representación gráfica del análisis GAM realizado en el Xpose para la constante de absorción del ritonavir.

7.7.3 Tercera etapa: Construcción del modelo poblacional final

Del Modelo Estructural Intermedio se pasa a un Modelo estructural Final que incluye las variables que son estadísticamente significativas, como se observa en la tabla 33. En esta etapa se adiciona el valor de la intersección que proporciona el análisis de GAM a través del programa Xpose y se corroboró la influencia de variable propuesta por el GAM el modelo realizado en el NONMEM

Para la depuración, al iniciar el análisis GAM, se inició con un modelo inicial donde $CL=1$, al finalizar este análisis se arrojó un modelo final en función de las covariables que mayor correlación mostraron. El modelo final proporcionado para la depuración fue $CL= SEX0$. El modelo final arrojó un valor

de intersección para la covariable estadísticamente significativa en este caso el valor de la intersección fue: -5.5355 para el SEXO. El valor de esta intersección se incorporó en el modelo final en el NONMEN. Sin embargo esta covariable no correlacionó significativamente con la depuración ya que no se estimó la varianza y covarianza en el NONMEN.

Respecto al volumen de distribución, al iniciar el análisis GAM, se inició con un modelo inicial donde $V=1$, al finalizar este análisis se arrojó un modelo final en función de la covariable que mayor correlación mostró. El modelo final proporcionado para la el volumen de distribución fue $V= EDAD$. El modelo final arrojó un valor de intersección para la covariable estadísticamente significativa en este caso el valor de la intersección fue: -1.5931 para la EDAD. El valor de esta intersección se incorporó en el modelo final en el NONMEN. Esta covariable no logró explicar la variabilidad para el volumen de distribución, sin embargo al incorporarse en este modelo el valor de la intersección dada por el SEXO que fue de -0.5351 el modelo de NONMEN estimó la varianza y covarianza, con lo que se concluyó el análisis estadístico de manera satisfactoria, obteniendo un valor para la variable de 14.7 para el SEXO, con una $F_{OBJ} = -79.87$ la cual no fue menor respecto a la inicial $F_{OBJ} = 79.94$.

Finalmente en el análisis GAM realizado para la constante de absorción, se inició con un modelo inicial donde $Ka=1$, al finalizar este análisis se arrojó un modelo final en función de la covariable que mayor correlación mostró. El modelo final proporcionado para la constante de absorción fue $Ka= EDAD$. El modelo final arrojó un valor de la intersección para la covariable estadísticamente significativa en este caso el valor de intersección fue: 3.278×10^{-6} para la EDAD. El valor de esta intersección se incorporó en el modelo final en el NONMEN. Sin embargo esta variable no correlacionó significativamente con los parámetros y no se estimó la varianza y covarianza en el NONMEN.

De esta manera el modelo final se obtuvo al incluir la covariable SEXO, en el volumen de distribución. Los estimados finales del modelo farmacocinético poblacional para ritonavir se muestran en la tabla 34. También

se realizó un ejercicio incluyendo el valor de la covariable sobre la ecuación final:

$$V = 10.4 (L) + (14.7 * SEXO)$$

Modelo	F _{OBJ} (FO)	Variabilidad Interindividual	Variabilidad Residual
Básico			
TVCL = 42.9 (L/h)		44.94%	
TVVd = 149 (L)	-79.94	86.42%	69.57%
TVKa = 0.18 (h ⁻¹)FIX		2.11%	
Final			
TVCL= 42.8 (L/h)		44.83%	
TVVd = 133 (L) + (14.7* SEXO)	-79.87	81.24%	69.71%
TVKa = 0.18 (h ⁻¹)FIX		0.45%	
Ecuación			
V= 133 (L) + (14.7* SEXO)			
V=133 (L) + (14.7*1) = <u>147.7L</u>			
<i>Ajuste Poblacional Final.</i>			

Tabla 34. Los valores se presentan como los estimados poblacionales medios de los parámetros farmacocinéticos. F_{OBJ} es el valor de la función objetivo proporcionada por NONMEM. Se muestran los datos generados por el modelo inicial y el modelo final donde la variable que mejor predicción presentó fue el sexo.

En la figura 47 se muestra la bondad de ajuste para el modelo poblacional final de ritonavir.

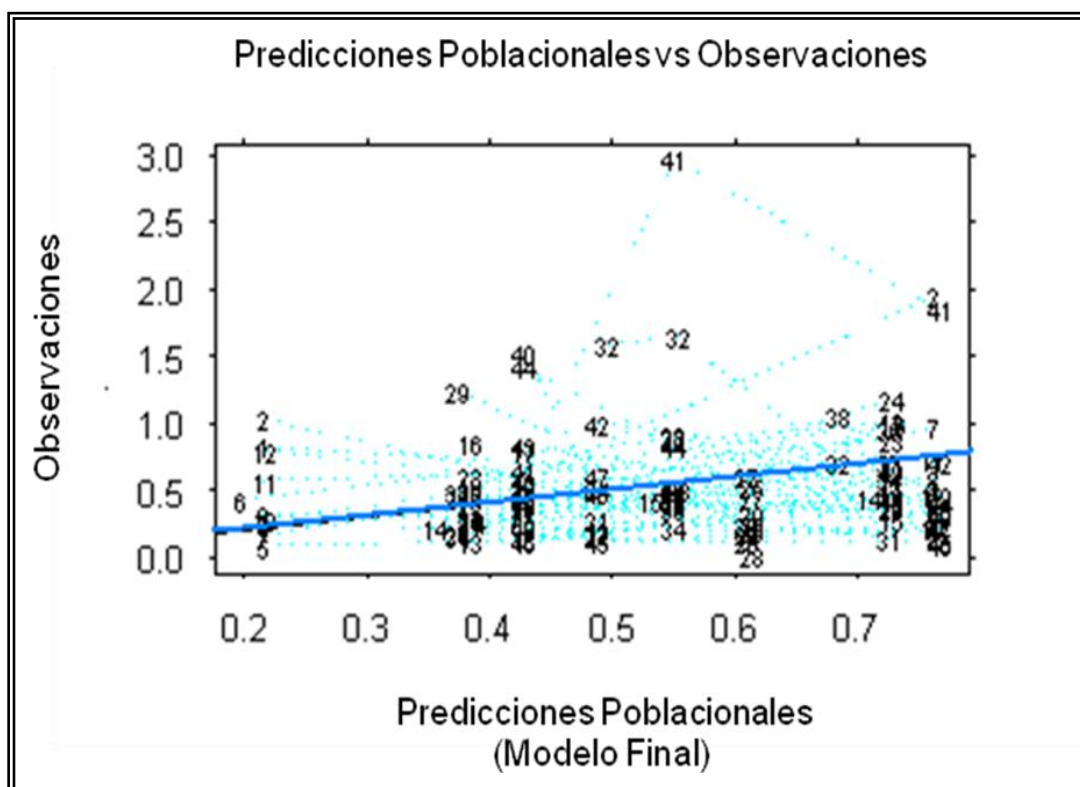


Figura 47. Gráfica de bondad de ajuste de las predicciones medias poblacionales finales estimadas para toda la población y las observaciones medidas, de los datos analizados en el modelo final del ritonavir.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

VIII. Discusión

La farmacocinética se ha consolidado durante los últimos 30 años como una disciplina de gran interés sanitario. Su aplicación se centra principalmente en dos grandes áreas: el desarrollo de nuevos medicamentos y la optimización de regímenes de dosificación de los tratamientos farmacológicos (Domenech, 1997). Los resultados obtenidos en los estudios farmacocinéticos, junto con los procedentes de los ensayos clínicos de eficacia y seguridad, configuran el perfil farmacológico de un nuevo medicamento, permitiendo establecer las directrices para su correcta utilización en la práctica clínica (Gibaldi, 1991).

El éxito de un tratamiento farmacológico depende en gran medida del régimen de dosificación utilizado, pero la selección del mismo se ve dificultada por las variaciones o diferencias interindividuales en el perfil farmacocinético del medicamento. En consecuencia, la respuesta observada tras la administración de una dosis fija de un medicamento a una población de pacientes es, con frecuencia, difícil de prever siendo posible obtener efectos terapéuticos, ineficacia e incluso respuestas tóxicas en un porcentaje variable de pacientes.

Para que la farmacocinética aplicada sea clínicamente útil se requiere un modelo farmacocinético que describa la concentración plasmática de fármaco en el tiempo tras una determinada pauta de administración (Witting B y cols, 1885; Calvo y Benítez, 2004). Un modelo es la relación entre los valores observados (por ejemplo, concentraciones plasmáticas) y todos aquellos factores que afectan a dicho valor (como función renal, hepática, etc.) (Beal SL, 1984; Calvo y Benítez 2004).

En un inicio los estudios farmacocinéticos estaban enfocados hacia el individuo y se diseñaban para obtener la máxima información de la disposición de los fármacos en un individuo concreto. Posteriormente, se incrementó el

interés en la determinación de parámetros farmacocinéticos poblacionales, los cuales definen el comportamiento farmacocinético típico de un fármaco en un gran número de pacientes. Desde los primeros trabajos de Sheiner y colaboradores (Sheiner LB y cols., 1972; Calvo y Benítez, 2004) cada vez se ha hecho más evidente que el conocimiento de los parámetros farmacocinéticos promedios, es insuficiente para determinar la dosis apropiada en un paciente individual. Es también importante conocer la magnitud de la variabilidad interindividual en la cinética de población de los pacientes. Por lo tanto, el análisis de los parámetros farmacocinéticos, deberá proporcionar no sólo los parámetros individuales, sino también las estimadas de las características de la población (medias y varianzas) de dichos parámetros.

Un buen modelo de población es importante, no sólo para poder predecir las concentraciones séricas de los pacientes, sino también para poder elaborar regímenes de dosificación en los que no se posee información previa sobre los parámetros farmacocinéticos individuales, por lo que se debe recurrir al conocimiento poblacional. Por estas dos razones el estudio farmacocinético poblacional cobra cada vez más importancia en el medio hospitalario (Witting y cols, 1985; Calvo y Benítez, 2004).

Es una experiencia muy frecuente el hecho de que las mismas dosis de un mismo fármaco administrado a distintos pacientes, que tienen la misma enfermedad, pueden producir efectos muy diferentes. Los factores que condicionan la respuesta a los fármacos pueden ser de naturaleza muy diversa y depender no sólo del paciente, sino también de factores ambientales y del propio fármaco. Las variaciones que pueden influir en la respuesta farmacológica pueden ser de orden farmacocinético, farmacodinámico o farmacogenético.

La respuesta de los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) es muy variable, por lo que el tratamiento, tras el primer año fracasa entre el 20 y el 88% de los pacientes (Lowe y cols., 2004; Peralta y cols., 2006). Los factores que influyen en este fracaso son diversos y se relacionan con el propio virus, con el tratamiento farmacológico o con el paciente. Aspectos relacionados directamente con el paciente y de gran importancia son los factores genéticos que determinan la gran variabilidad en la farmacocinética y farmacodinamia de los antirretrovirales (Quirk y cols., 2004).

La familia de los IP se caracteriza por presentar variabilidad en la biodisponibilidad oral, que se traduce en variabilidad en la respuesta terapéutica. Es por ello, que el comportamiento farmacocinético de esta familia es de relevante importancia, así como la identificación de aquellos factores que pueden determinar dicha variabilidad. Esto es importante en el tratamiento clínico de la infección por VIH, debido a la necesidad de pautar un tratamiento crónico y a la elevada prevalencia de eventos adversos asociados (Rotger y cols., 2006).

Con el mejor conocimiento de estos fármacos se ha comenzado a abrir un campo de nuevas posibilidades, como la terapia combinada de dos IP, con el fin de obtener perfiles de efectividad de tratamiento potenciados, como es el caso de la coformulación de lopinavir/ritonavir.

En concreto la combinación de lopinavir y ritonavir dos antirretrovirales que pertenecen al grupo de inhibidores de la proteasa (IP) del VIH-1, que se indican en el tratamiento de la infección por VIH y en la manifestación clínica de la misma, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

De forma particular la combinación lopinavir/ritonavir resulta de las más interesantes, dada la baja y variable biodisponibilidad oral del lopinavir sin administrar ritonavir; se estima que la concentración plasmática de lopinavir es

mucho menor, por su metabolismo de primer paso. Tanto este metabolismo como la eliminación sistémica de lopinavir son muy sensibles a la inhibición que produce el ritonavir. Una sola dosis de 100 mg de ritonavir aumenta 155 veces el ABC del lopinavir. La concentración máxima de lopinavir es potenciada 50 a 100 veces cuando se administra simultáneamente con dosis bajas del ritonavir (en concentraciones subterapéuticas) (Cvetkovic y cols, 2003).

La variabilidad en la biodisponibilidad del lopinavir se ha atribuido en parte a un amplio metabolismo mediado por el CYP3A4 (Cvetkovic y cols. 2003). Varios estudios reportados han evaluado el comportamiento cinético de esta combinación dado su amplio uso en el tratamiento antirretroviral.

Van Heeseijk y colaboradores en el 2004 reportaron un estudio farmacocinético de lopinavir en presencia de ritonavir realizado con pacientes del género masculino, donde utilizaron dosis de 800/200 mg de LPV/RTV administrada una vez al día, ellos reportaron para lopinavir una depuración CL_{LPV} de 5.61 L/h, un Vd_{LPV} de 51.1 L, además de una $C_{max LPV}$ de 12.8 (10.3-17.2) μ g/ml. Con respecto a ritonavir se obtuvo una depuración con un valor CL_{RTV} de 24.1 L/h, un Vd_{RTV} de 160 L y respecto a la $C_{max RTV}$ fue de 1.05 (0.58-1.98) μ g/ml. Ellos evaluaron las dosis administradas por la mañana y administradas por la noche y no encontraron diferencias significativas (Van Heeseijk y col, 2004).

Respecto a las diferencias en género, un estudio farmacocinético poblacional de indinavir fármaco del grupo de inhibidores de la proteasa, realizado por Kappelhoff Bregt y colaboradores en el 2004, se encontró que el género influyó de manera importante sobre la farmacocinética de indinavir. Los pacientes del género femenino presentaron una biodisponibilidad 48% más alta que los pacientes del género masculino, indicando que las mujeres

presentaron concentraciones plasmáticas más elevadas (Kappelhoff y cols., 2004). Esto pone de manifiesto que algunos fármacos antirretrovirales específicamente del grupo de inhibidores de proteasa presentan cierta variabilidad farmacocinética influenciada por el género.

Sin embargo, un estudio farmacocinético realizado por Oftokun y colaboradores en el 2007 en pacientes norteamericanos, evaluó el impacto del sexo sobre la farmacocinética de lopinavir/ritonavir. Los valores obtenidos para mujeres y hombres primeramente en el caso de lopinavir el ABC_{LPV} , $C_{max LPV}$ y CL_{LPV} no hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos para ambos grupos. Por otra parte en el caso de los resultados obtenidos de ritonavir donde evaluaron los mismos parámetros aunque se encontró que la $C_{max RTV}$ es menor en hombres que en mujeres, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

A la fecha y nuestro conocimiento la literatura solo reporta dos estudios del abordaje poblacional de la combinación lopinavir en presencia de ritonavir y en ellos se describen los siguientes datos:

Un estudio retrospectivo sobre la farmacocinética poblacional de lopinavir en presencia de ritonavir, realizado por Crommentuyn y colaboradores en el 2005 reporta que la mayor variabilidad interindividual estuvo dada por la constante de absorción, reportando un valor de Ka_{LPV} de $0.564 h^{-1}$ con una variabilidad interindividual del 97.8%, un CL/F_{LPV} de 14.8 L/h con una variabilidad del 17.2% y un Vd/F_{LPV} de 61.6 L con una variabilidad interindividual del 63.8%. Ellos encontraron que la depuración de lopinavir se encuentra influenciada por las concentraciones de ritonavir (Crommentuyn y cols, 2005).

Recientemente un estudio realizado por Mólto y colaboradores en el 2008, sobre el abordaje poblacional de la farmacocinética de lopinavir y

ritonavir, mostró que la mayor variabilidad interindividual estuvo dada por el volumen de distribución reportando un V_d/F_{LPV} de 91.6 L con una variabilidad interindividual del 38% y un CL/F_{LPV} de 11 L/h con una variabilidad interindividual de 12%. Para el caso de ritonavir también la mayor variabilidad interindividual estuvo dada por el volumen de distribución reportando en este caso un V_{dRTV} de 54.7 L con una variabilidad interindividual del 81% y un CL/F de 18.8 L/h. Ellos reportaron que la concentración de alfa glicoproteína ácida (AGA) fue una covariable importante en la explicación en parte de la variabilidad estimada para el V_{dLPV} , y CL_{LPV} ; para ritonavir la presencia de fibrosis pulmonar elevada explicó la variabilidad en el CL (Mólto y col., 2008).

En nuestro estudio de abordaje poblacional de lopinavir en presencia de ritonavir donde participaron 50 pacientes VIH positivos, adultos, de ambos géneros encontramos datos importantes que en parte coinciden con lo señalado anteriormente por la literatura y por otra parte datos que difieren importantemente de lo anteriormente descrito por otros autores en las diferentes poblaciones de estudio.

Analizando los valores de las concentraciones medidas podemos ver que tenemos valores mayores que la concentración máxima reportada en la literatura de 9.6 $\mu\text{g/ml}$ de lopinavir en presencia de ritonavir (LPV/RTV) (Bertz y cols., 1999; Murphy y cols., 2001; Hsu y cols., 2002). En nuestro estudio se alcanzaron concentraciones de 31.92 $\mu\text{g/ml}$ de lopinavir, es decir tres veces más elevadas que la C_{max} reportada. De hecho más del 50% de la población participante mostró concentraciones por arriba de la C_{max} reportada en la literatura. Respecto a las concentraciones de ritonavir tenemos datos que rebasan la C_{max} reportada en la bibliografía 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ya que se obtuvieron datos de hasta 2.96 $\mu\text{g/ml}$ de ritonavir, es decir poco menos de tres veces la C_{max} reportada (Heeswijk y cols.2004).

Estos resultados por una parte nos hablan de una posible diferencia en el comportamiento cinético de la combinación en la población mexicana estudiada con lo que la literatura refiere.

Estos resultados se complementan al integrar los datos generados en el estudio al abordaje poblacional de la combinación a través del modelaje poblacional tanto de lopinavir como de ritonavir.

En el análisis farmacocinético poblacional, se utilizó un *modelo no lineal de efectos mixtos* a través del programa NONMEM como herramienta en el análisis de los datos. Estos modelos permiten, con mayor fiabilidad, la determinación de los parámetros poblacionales a partir de los datos obtenidos en la práctica clínica. Se estiman los parámetros farmacocinéticos y su variabilidad en una sola etapa.

En este trabajo de tesis se utilizó el programa NONMEM versión V (Beal y cols, 1998), que asume que los parámetros en estudio se ajustan a una distribución conocida (normal o logaritmo normal), caracterizada por una media y sus correspondientes medidas de dispersión. La estimación de los parámetros se realiza mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados extendidos.

El **modelo farmacocinético** describió la evolución de las concentraciones de lopinavir en función del tiempo. Se consideró como un modelo monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden. Este modelo farmacocinético que obtuvimos en este estudio corresponde con lo descrito por Crommentuyn y colaboradores y también lo que refiere Mólto y colaboradores en los estudios anteriormente descritos.

El objetivo del **modelo de regresión** fue identificar aquellas covariables, independientes entre sí o con una covarianza moderada, que pudieran afectar a los parámetros farmacocinéticos. Evaluamos los datos demográficos, antropométricos y clínicos de la población de estudio.

Las covariables estudiadas se incorporaron de forma secuencial, seleccionando aquellas que suponen una mejora significativa en el ajuste obtenido. Inicialmente la EDAD y la CRTV correlacionaron para el CL/F; el PESO correlacionó con el Vd/F y la CRTV correlacionó con Ka. Para evaluar la bondad del ajuste de estas variables se consideró: (García, 1995)

Una disminución en la función objetivo (F_{OBJ}). Para ello, se comparó la diferencia entre las funciones mínimas objetivo (F_{OBJ}) obtenidas con el valor de χ^2 tabulado, para los grados de libertad correspondientes a la diferencia entre el número de parámetros de los modelos y el nivel de significación elegido. Donde un cambio en la función mínima objetivo mayor de 6.63 está asociado a un valor de $p < 0,01$ con $gl=1$.

En nuestro estudio se vio una reducción de la F_{OBJ} en 11.125 unidades, de iniciar con $F_{OBJ}=499.35$ al incluir la variable significativa proporcionada por el PESO sobre el Vd/F se obtuvo una $F_{OBJ}=488.225$, por lo que en nuestro modelo final de lopinavir es estadísticamente significativo al incluir la covariable dada por el PESO. Al incluir la covariable dada por el PESO, disminuyó la variabilidad aleatoria (interindividual o residual) que se reflejó en un descenso de sus respectivas varianzas (ω^2 , σ^2) y esto se confirmó con el análisis gráfico en el Xpose2, donde se representaron las concentraciones predichas (PRED) con las observadas (DV) o con los residuales ponderados (WRES).

El **modelo estadístico** nos proporcionó información acerca del grado de dispersión asociado a cada uno parámetro de los parámetros evaluados, depuración, volumen de distribución y constante de absorción para el caso de lopinavir, esto mediante el análisis de varianza interindividual y residual.

El **modelo de varianza interindividual** definió la discrepancia entre el valor esperado del parámetro, para un individuo de la población, y el valor que presentó en el estudio. Esto corresponde a la variabilidad que siendo aleatoria, no está explicada por el modelo de regresión. En el modelo inicial se obtuvo una variabilidad interindividual en CL_{LPV} de 140%, en Vd_{LPV} de 40.12% y para la Ka_{LPV} de 1.21%. Una vez que incorporamos las variable que mayor correlación tuvo con el volumen de distribución que fue el PESO y que se confirmó al reducir de manera importante la F_{OBJ} del modelo final tenemos que se obtuvo una variabilidad interindividual en CL_{LPV} de 146%, en Vd_{LPV} de 36.19% y para la Ka_{LPV} de 36.87%.

Los datos de nuestro estudio difieren a lo citado por Crommentuyn y colaboradores ya que la mayor variabilidad interindividual estaba dada por la variabilidad en la Ka en la población holandesa, por otra parte coincidimos con lo que refiere Mólto y colaboradores donde la mayor variabilidad interindividual está dada por la amplia variabilidad en Vd/F en la población española.

Finalmente, el **modelo de varianza residual** explicó la discrepancia entre la concentración de fármaco observada y la predicha de acuerdo a los parámetros farmacocinéticos del individuo. En esta, se incluyó una serie de posibles fuentes de error como son el método de valoración, tiempo de muestreo, inadecuado modelo farmacocinético y la propia variabilidad intraindividual, entre otros. La variabilidad residual en el modelo básico fue de 35.21% misma que fue reducida al realizar el modelo final donde obtuvimos una variabilidad residual interindividual del 34.92%, esta reducción se generó al

incorporar en el modelo la covariable que mayor diferencia significativa mostró que fue el PESO.

Con lo anterior comentamos los parámetros farmacocinéticos poblacionales obtenidos en nuestra población mexicana con respecto a la depuración coincide con lo descrito en otras poblaciones, ya que se obtuvo una depuración de CL/F_{LPV} 11.85 L/h, y la reportada por otros autores es de 11 L/h en españoles (Molto y cols., 2008), 14.18 L/h en holandeses (Crommentuyn y cols., 2004) y en estudios de farmacocinética clásica si existe una diferencia entre los valores reportados de 5.61 L/h en canadienses (Heeswijk y cols., 2004), 4.76 L/h en norteamericanos (Ighovwertha y cols., 2007) y 4.8 L/h también en españoles (Molto y cols., 2007) respecto a los datos obtenidos en este estudio.

Respecto al volumen de distribución obtenido en nuestro estudio se encuentra dentro del promedio con respecto a lo que refiere la literatura reportada por otros autores que es de 91.6 L en españoles (Molto y cols., 2008), 61.6 L en holandeses (Crommentuyn y cols., 2004) y en estudios de farmacocinética clásica de 51.1 L en canadienses (Heeswijk y cols., 2004) y 44 L también en españoles (Molto y cols., 2007), ya que al considerar la covariable de mayor correlación con este parámetro que fue el PESO como se indica en la tabla 30 tenemos un Vd/F_{LPV} de 42.91 L, lo que reduce de manera importante la variabilidad en el valor del volumen de distribución y se encuentra entre el valor medio de volumen de distribución reportado por los autores ya mencionados, difiriendo solamente de Molto y cols., en el 2008.

Con respecto al papel del PESO en los parámetros farmacocinéticos, es importante señalar que por lo general los hombres pesan más que las mujeres, (Schwartz JB, 2003) pero la mayor parte de las dosis de los medicamentos no

se corrigen según el peso corporal. Para aquellos fármacos evaluados por la FDA, no realizar estos ajustes resulta en 20% a 88% de aumento de las ABC en las mujeres comparadas con los hombres. Para fármacos con márgenes terapéuticos estrechos o con curvas dosis-concentración empinadas o con ambas características, esto puede aumentar significativamente el perfil de efectos adversos en las mujeres.

Las mujeres presentan mayor porcentaje de grasa corporal que los hombres, lo que puede afectar el volumen de distribución (V_d) de ciertos fármacos. El V_d es importante para el cálculo de las dosis de carga y puede afectar la C_{max} , la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) y la duración de efecto. Por ejemplo, el aumento del V_d disminuirá la C_{max} , aumentará la $t_{1/2}$ y la duración de efecto cuando la misma dosis se administra a una mujer en comparación con un hombre.

Respecto al parámetro de constante de absorción obtenido en nuestro estudio $Ka_{LPV} = 2.42 \text{ h}^{-1}$ tenemos que difiere de manera importante a lo descrito por la literatura que muestra valores de 0.86 h^{-1} en españoles (Mólto y cols., 2008) y 0.564 L en holandeses (Crommentuyn y cols., 2004)

Por otra en cuanto al modelaje de ritonavir se realizó el mismo procedimiento de análisis que en lopinavir.

El **modelo farmacocinético** describió la evolución de las concentraciones de lopinavir en función del tiempo. Se consideró como un modelo monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden. Este modelo farmacocinético que obtuvimos en este estudio corresponde con lo descrito también refiere Mólto y colaboradores en el estudio anteriormente descrito.

Las covariables estudiadas se incorporaron de forma secuencial, seleccionando aquellas que suponen una mejora significativa en el ajuste

obtenido. Inicialmente la SEXO correlacionaron para el CL/F; la EDAD correlacionó con el Vd/F y la EDAD correlacionó con Ka aunque se decidió fijar este valor considerando un el valor descrito por la bibliografía. Para evaluar la bondad del ajuste de estas variables se consideró la misma logista descrita en el modelaje anterior (García, 1995).

En nuestro estudio para el modelaje de ritonavir no se vió una reducción de la F_{OBJ} en el modelo final respecto al modelo inicial, de iniciar con $F_{\text{OBJ}} = -79.94$ al incluir la variable significativa proporcionada por el SEXO sobre el Vd/F se obtuvo una $F_{\text{OBJ}} = -79.87$, por lo que en nuestro modelo final de ritonavir no es estadísticamente significativo al incluir la covarible dada por el SEXO. Sin embargo, al incluir la covariable dada por el SEXO, disminuyó modestamente la variabilidad aleatoria interindividual, pero no fue el caso para la variabilidad interindividual residual.

El **modelo estadístico** nos proporcionó también en este modelaje del ritonavir información acerca del grado de dispersión asociado a cada uno parámetro de los parámetros evaluados, depuración, volumen de distribución y constante de absorción para el caso de ritonavir, esto mediante el análisis de varianza interindividual y residual.

El **modelo de varianza interindividual** para ritonavir definió la discrepancia entre el valor esperado del parámetro, para un individuo de la población, y el valor que presentó en el estudio. Esto corresponde a la variabilidad que siendo aleatoria, no está explicada por el modelo de regresión. En el modelo inicial se obtuvo una variabilidad interindividual en CL_{RTV} de 44.94%, en Vd_{RTV} de 86.42% y para la $Ka_{\text{LPV Fijo}}$ de 2.11%. Una vez que incorporamos las variable que mayor correlación tuvo con el volumen de distribución que fue el SEXO, en el modelo final tenemos que se obtuvo una

variabilidad interindividual en CL_{RTV} de 44.83%, en Vd_{RTV} de 81.24% y para la Ka_{RTV} de 0.45%.

Los datos de nuestro estudio, coinciden con lo que refiere Mólto y colaboradores donde la mayor variabilidad interindividual para el modelo de ritonavir está dada por la amplia variabilidad en Vd/F en la población española.

Finalmente, el **modelo de varianza residual** explicó la discrepancia entre la concentración de fármaco observada y la predicha de acuerdo a los parámetros farmacocinéticos del individuo. En esta, se incluyó una serie de posibles fuentes de error como son el método de valoración, tiempo de muestreo, inadecuado modelo farmacocinético y la propia variabilidad intraindividual, entre otros. La variabilidad residual en el modelo básico de ritonavir fue de 69.57 % misma que se incremento modestamente al realizar el modelo final donde obtuvimos una variabilidad residual interindividual del 69.71%.

Analizando los datos de nuestro estudio referentes al modelo poblacional del ritonavir comentamos que existe un notable aumento de la depuración en nuestra población mexicana CL/F_{RTV} 42.8 L, con respecto a la reportada por otros autores que es de 18.8 L en españoles (Molto y cols., 2008), 10.5 L en holandeses (Kappelhoff y cols., 2004) y en estudios de farmacocinética clásica de 24.5 (20.1- 40.7) L en canadienses (Heeswijk y cols., 2004) y 19.7 (15.2- 24.7) L también en españoles (Mólto y cols.,2007).

Respecto al volumen de distribución obtenido en nuestro estudio es mayor con un valor de $Vd/F_{RTV}= 133$ L con respecto a lo que refiere la literatura reportada por otros autores que es de 54.7 L en españoles (Mólto y cols., 2008), 96.6 L en holandeses (Kappelhoff y cols., 2004) y en estudios de farmacocinética clásica de 160 L en canadienses (Heeswijk y cols., 2004) y 107 (61.1-182.3) L también en españoles (Mólto y cols., 2007). Sin embargo, al

considerar la covariable de mayor correlación con este parámetro que fue el SEXO como se indica en la tabla 33 tenemos un V_d/F_{RTV} de 147.7 L, con este ajuste se amplía más la variabilidad en el valor del volumen de distribución con lo descrito por Kappelhoff y cols., 2004; Mólto y cols., en el 2008 y solo se coincide con un estudio en españoles también realizado por Mólto y colaboradores en el estudio canadiense donde se utilizó una dosis de 800/200 mg una vez al día.

Respecto al parámetro de constante de absorción en nuestro estudio $K_{aRTV} = 0.18 \text{ h}^{-1}$ se obtuvo de la literatura y se mantuvo fijo por lo que no podemos realizar comparaciones con lo que describen otros autores.

Con respecto al papel del GENERO (sexo) según los últimos datos, las diferencias en la farmacocinética de los fármacos entre ambos sexos es de casi un 28%. Si bien una parte de estas diferencias podría deberse al tamaño corporal, pueden persistir después del ajuste basado en el índice de masa corporal. El papel relativo del sexo sobre la farmacocinética comparado con la genética, la edad, la patología, los hábitos y sus posibles interacciones en la práctica clínica no son enteramente conocidos, pero deberían ser considerados rutinariamente en los estudios.

El CYP3A4 es el citocromo más abundante del hígado y tracto gastrointestinal humano, contribuye con aproximadamente el 30% de las CYP hepáticas. El CYP3A4 metaboliza los esteroides endógenos y exógenos, por lo que las diferencias dependientes del sexo no son sorprendentes y fueron demostradas para fármacos como eritromicina, metilprednisolona, prednisolona, tirilidaz, metadona, tacrolimus, modafinilo, diltiazem, nifedipina, triazolam, ciclosporina y verapamilo. Las mujeres exhiben en promedio 20% a 50% mayor de actividad que los varones. Las mujeres asiáticas presentan,

asimismo, una disminución significativa de dicha actividad comparadas con las de la raza blanca.

Por otra parte es importante mencionar que, de los diferentes factores, el polimorfismo genético de las enzimas como el CYP3A4, que como mencionamos participan en la biotransformación de los medicamentos desempeña el papel principal en la variabilidad del metabolismo de los fármacos observada en diferentes personas, así como en los efectos tóxicos de algunos de esos fármacos y su fracaso terapéutico. Esta variación genética permite clasificar a la población en tres grupos: metabolizadores lentos, rápidos y ultrarrápidos.

Nosotros evaluamos la actividad del CYP3A4 hepático, mediante la excreción urinaria del Cortisol y su metabolito por esta vía que es el 6 β OH Cortisol. Esta evaluación se realizó considerando la relación entre la cantidad de la sustancia endógena y su respectivo metabolito en la orina, obteniendo un cociente de actividad o índice de actividad.

En nuestro estudio obtuvimos una relación de 3.875, este valor coincide con lo descrito anteriormente en un estudio realizado en pacientes mexicanos diabéticos donde se obtuvo una relación de 3.7 (Gutiérrez y cols., 2006). Coincidiendo también en que la población mexicana posee un metabolismo reducido por esta vía del CYP3A4, ya que comparada con la relación documentada en población caucásica describe una relación de 8.3 ± 4.4 (Nowack y cols, 2002), mientras que en los chinos se reporta un valor de 3.54 ± 2.32 y en japoneses se describe un valor de esta relación de 6 ± 1.4 (Ohno y cols, 2000)

Sin embargo, aunque la actividad de la isoenzima CYP3A4 hepática, demuestra estar reducida en la población mexicana, esta covariable no logró explicar la amplia variabilidad en los parámetros farmacocinéticos de lopinavir y ritonavir. Pero se evidencia en los datos de las concentraciones obtenidas de lopinavir y ritonavir.

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

IX. Conclusiones

■ Se desarrolló un modelo de farmacocinética poblacional que describió adecuadamente el comportamiento de lopinavir y ritonavir en nuestra población, observándose los siguientes aspectos relevantes:

■ Las concentraciones plasmáticas de lopinavir y ritonavir encontradas en la población mexicana VIH positiva son mayores a las reportadas en otras poblaciones (españoles y holandeses), lo que implica que es necesario revalorar los regímenes de dosificación tomando en cuenta este aspecto.

■ A pesar de que se ha descrito que la relación de la excreción urinaria del $6\beta\text{OHCortisol/Cortisol}$ es un marcador de la actividad de CYP3A4, en este estudio no fue capaz de explicar la variabilidad farmacocinética observada con ninguno de los dos fármacos.

■ El peso corporal fue una covariable que contribuyó significativamente a explicar la variabilidad farmacocinética, aunque no la explicó completamente.

■ La trascendencia clínica de nuestro modelo debe ser explorada a través de estudios prospectivos donde se use el modelo para ajustar la dosificación de lopinavir en presencia de ritonavir en la población a la que va dirigido este fármaco, valorando simultáneamente la eficacia y la seguridad clínica del tratamiento..

y su posible correlación con la excreción urinaria del 6 β OH Cortisol/Cortisol

X. Bibliografía

A

- Aarons, L.. "Population pharmacokinetics: theory and practice." Br J Clin Pharmacol 1991. **32**(6): 669-70.

- Abbott Laboratories 2005.: www.abbott.com.

- Akaike, H. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans Automat Contr 1974;19:716-723

- Alfonso Domínguez-Gil ,M^a José García, M^a Dolores Santos, M^a del Mar Fernández de Gatta, M^a José Otero. Farmacocinética de poblaciones: una aproximación a la optimización del tratamiento con antimicrobianos. Manuscrito recibido el 5-09-2000; aceptado el 27-09-2000. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 219-228.

B

- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W.yMontagnier, L. "Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)". Science1983: **220**(4599): 868-71.

- Beal, S.L. y Sheiner, L.B. Users supplemental guide. NONMEM users guide. California, U.d. San Francisco. 1984.

- Beal SL, Sheiner LB. NONMEM, User's Guides. NONMEM Project Group. University of California at San Francisco 1998.

- Boffito, M., Hoggard, P.G., Reynolds, H.E., Bonora, S., Meaden, E.R., Sinicco, A., Di Perri, G.yBack, D.J. "The unbound percentage of saquinavir and

indinavir remains constant throughout the dosing interval in HIV positive subjects." *Br J Clin Pharmacol* 2002;**54**(3): 262-8.

■ Bonfanti, P., Valsecchi, L., Parazzini, F., Carradori, S., Pusterla, L., Fortuna, P., Timillero, L., Alessi, F., Ghiselli, G., Gabbuti, A., Di Cintio, E., Martinelli, C., Faggion, I., Landonio, S.yQuirino, T. "Incidence of adverse reactions in HIV patients treated with protease inhibitors: a cohort study. Coordinamento Italiano Studio Allergia e Infezione da HIV (CISAI) Group." *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;**23**(3): 236-45.

■ Broder, S.y Gallo, R.C. "A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS." *N Engl J Med* :1984;**311**(20): 1292-7.

■ Burk O, Wojnowski L. Cytochrome P450 and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369(1):105-124.

C

■ Carr A. The HIV / AIDS epidemic: the next ten years. *Natl AIDS Bull.* 1991 Jul;**5**(6):9-13.

■ Castañeda-Hernández G, Hoyo-Vadillo C, Palma-Aguirre JA, Flores-Murrieta FJ. Pharmacokinetics of oral nifedipine in different populations. *J Clin Pharmacol.* 1993 Feb;**33**(2):140-5.

■ Chen Z, Dunning LA, Anderson KE, Holtzman JL, Zheng W. Within-person variability of urinary 6beta-hydroxycortisol to urinary ratios in Caucasian women. *Steroids.* 2004 Jan;**69**(1):67-70.

■ Clavel F, Montagnier L. Viral etiology of AIDS. *Rev Prat.* 1986 Apr 11;36(21):1163-7.

■ Colburn, W.A.yOlson, S.C. Classic and population pharmacokinetics. *Pharmacokinetics: Regulatory, industry, academic perspectives.* Welling, P.G.yTse, F.L. New York, Marcel Dekker. 1988: 337-384.

■ Cvetkovic RS, Goa KL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2003;63(8):769-802.

D

■ Deeks, S.G., Smith, M., Holodniy, M.yKahn, J.O. "HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians." *Jama* 1997; 277(2): 145-53.

■ Debouck C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. *DS Res Hum Retroviruses.* 1992 Feb;8(2):153-64.

■ "Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee." *Lancet* 1996. **348**(9023): 283-91.

■ Dietrich A. HIV testing of inmates. *NCSL Legisbrief.* 2001 Aug-Sep;9(35):1-2.

■ Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P4503A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet.* 2000; 38(1):41-57.

■ Domenech BJ, Martínez Lanao J, Plá Delfina JM, *Biofarmacia y Farmacocinética.* Volumen I: Farmacocinética. Editorial Síntesis. 1997.

■ Domenech BJ, Martínez Lanao J, Plá Delfina JM, *Biofarmacia y Farmacocinética.* Volumen II: Biofarmacia. Editorial Síntesis. 1997.

E

■ Erickson B, Wasserheit JN, Rompalo AM, Brathwaite W, Glasser D, Hook EW 3rd. Routine voluntary HIV screening in STD clinic clients: characterization of infected clients. *Sex Transm Dis.* 1990 Oct-Dec;17(4):194-9.

■ Eron, J.J., Jr. (2000). "HIV-1 protease inhibitors." *Clin Infect Dis* 30 Suppl 2: S160-70.

■ Eron, J.J., Jr. "HIV-1 protease inhibitors." *Clin Infect Dis* 30 Suppl2: 2000. S160-70.

F

■ FDA "Guidance for Industry and Reviewers. Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers." 2002.

■ F.D.A. U.S. Food and Drug Administration- Center for Drug Evaluation and Research. 2005: www.fda.gov/cder/.

■ Fischl, M.A., Richman, D.D., Hansen, N., Collier, A.C., Carey, J.T., Para, M.F., Hardy, W.D., Dolin, R., Powderly, W.G., Allan, J.D. et al. "The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group." 1990. *Ann Intern Med* **112**(10): 727-37.

■ Fitzsimmons, M.E. y Collins, J.M. (1997). "Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-

intestinal cytochrome P4503A4: potential contribution to high first-pass metabolism." *Drug Metab Dispos* **25**(2): 256-66

■ Flores-Murrieta FJ, Castañeda-Hernández G, Granados-Soto V, Herrera JE. Increased bioavailability of sildenafil in Mexican men. *JAMA*. 2000 Apr 12;283(14):1825-6.

G

■ Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. et al. "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.". *Science* 1984; **224**(4648): 500-3.

■ Garcia de Olalla, P., Knobel, H. y Carmona, A. " Impact of adherence and HAART on survival in HIV-infected patients." *J Acquir Imm Defic Syndr* 2002. **30**: 105-10.

■ Gibaldi, M. y Perrier, D. "Pharmacokinetics." Marcel Dekker Inc. Nueva York. 1982.

■ Grasela T.H y Sheiner L.B. Pharmacostatistical modelling for observational data. *J Pharmacokin Biopharm.*, 1991; 19: 25S – 36S. 10, 11.

■ Grasela, T.H. y Sheiner, L.B. "Pharmacostatistics modeling for observational data." *J Pharmacokin Biopharm* 1991; **19**: 11-24.

■ Grasela, T.H., Sheiner, L.B., Rambeck, B., Boenigk, H.E., Dunlop, A., Mullen, P.W., Wadsworth, J., Richens, A., Ishizaki, T., Chiba, K. et al. (1983). "Steady-state pharmacokinetics of phenytoin from routinely collected patient data." *Clin Pharmacokin* **8**(4): 355-64.

- Grasela, T.H.ySheiner, L.B. "Pharmacostatistical modeling for observational data." J Pharmacokinet Biopharm :1991:19: 11-24.

- Geletko, S.M.yErickson, A.D. "Decreased methadone effect after ritonavir initiation." Pharmacotherapy 2000:20(1): 93-4.

- Góngora Biachi Renan A. La epidemia del VIH y el SIDA en Yucatán, México: un enfoque basado en la investigación (1985-2004) Rev Biomed 2005; 16(1) : 29-43.

- Góngora Biachi Renan A. La epidemia del VIH y el SIDA en Yucatán, México: un enfoque basado en la investigación (1985-2004) Rev Biomed 2005; 16(1): 29-43.

- Guengerich FP, Parikh A, Turesky RJ, Josephy PD. Inter-individual differences in the metabolism of environmental toxicants: cytochrome P450 1A2 as a prototype. Mutat Res. 1999 Jul 16;428(1-2):115-24.

- Guiard-Schmid, J.B., Poirier, J.M., Meynard, J.L., Bonnard, P., Gbadoe, A.H., Amiel, C., Calligaris, F., Abraham, B., Pialoux, G., Girard, P.M., Jaillon, P.yRozenbaum, W. "High variability of plasma drug concentrations in dual protease inhibitor regimens." Antimicrob Agents Chemother 2003;47(3): 986-90.

- Gulick, R.M., Mellors, J.W., Havlir, D., Eron, J.J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D.D., Valentine, F.T., Jonas, L., Meibohm, A., Emini, E.A.yChodakewitz, J.A.. "Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy." N Engl J Med 1997: 337(11): 734-9.

■ Gustavson L, Lam W, Bertz R, et al. Assessment of the bioetesting in antiretroviral naive patients treated with once-daily quivalence and food effects for liquid and soft elastic capsule lopinavir/ritonavir plus tenofovir and emtricitabine: 48-week co-formulations of ABT-378/ritonavir (ABT-378/r) in healthy results from study 418 [abstract no. WePeB5701 plus poster]. subjects [poster]. 40th Interscience Conference on Antimicro15th International AIDS Conference; 2004 Jul 11-16; Bangkok bial Agents and Chemotherapy; 2000 Sep 17-20; Toronto (ON)

H

■ Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Jr., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Jr., Deyton, L.R., Chodakewitz, J.A.yFischl, M.A. "A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team." N Engl J Med 1997: 337(11): 725-33.

■ Hammer, S.M., Katzenstein, D.A., Hughes, M.D., Gundacker, H., Schooley, R.T., Haubrich, R.H., Henry, W.K., Lederman, M.M., Phair, J.P., Niu, M., Hirsch, M.S. y Merigan, T.C. (1996). "A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team." N Engl J Med 1996: **335**(15): 1081-90.

■ Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Jr., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Jr., Deyton, L.R., Chodakewitz, J.A.yFischl, M.A. "A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team." 1997. N Engl J Med **337**(11): 725-33.

■ Herrera Carranza Joaquin, Manual de Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica. Editorial ELSEVIER. España, 2006.

■ Hoffman, C., Kamps, B.S.yRocstroh, J.K. HIV-Medicine, Flying Publisher. 2005.

■ Hsu, A., Granneman, G.R.yBertz, R.J. "Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents." Clin Pharmacokinet **35**(4): 275-91.

■ Hsu, A., Granneman, G.R., Witt, G., Locke, C., Denissen, J., Molla, A., Valdes, J., Smith, J., Erdman, K., Lyons, N., Niu, P., Decourt, J.P., Fourtillan, J.B., Girault, J.yLeonard, J.M. (1997). "Multiple-dose pharmacokinetics of ritonavir in human immunodeficiency virusinfected subjects." Antimicrob Agents Chemother 1998;**41**(5): 898-905.

■ Hsu A, Bertz R, Renz C, Lam W, Rode R, Deetz C, Schweitzer SM, Bernstein B, Brun S, Granneman GR, Sun E. Assessment of the pharmacokinetic interaction between lopinavir/ritonavir and nevirapine in HIV-infected pediatric subjects. 5th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection 22–26 October, 2000, Glasgow, UK, P 292.

■ <http://www.fda.gov/oashi/aids/virals.html>.

■ Hurst M, Faulds D. Lopinavir. Drugs. 2000 Dec;60(6):1371-9.

J

■ Jelliffe RW, Schumitzky A, Van Guilder M, Liu M, Hu L, Maire P, Gomis P, Barbaut X, Tahani B. Individualizing drug dosage regimens: roles of population

pharmacokinetic and dynamic models, Bayesian fitting, and adaptive control. *Ther Drug Monit.* 1993 Oct;15(5):380-93.

■ Joellenbeck L, Qian Z, Zarba A, Groopman JD. Urinary 6 beta-hydroxycortisol/cortisol ratios measured by high-performance liquid chromatography for use as a biomarker for the human cytochrome P-450 3A4. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992 Nov-Dec;1(7):567-72.

K

■ Kappelhoff BS, Crommentuyn KM, de Maat MM, Mulder JW, Huitema AD, Beijnen JH. Practical guidelines to interpret plasma concentrations of antiretroviral drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(13):845-53.

■ Karlsson, M.O., Molnar, V., Bergh, J., Freijs, A.yLarsson, R. "A general model for time-dissociated pharmacokineticpharmacodynamic relationship exemplified by paclitaxelmyelosuppression." *Clin Pharmacol Ther* 1998. 63(1): 11-25.

■ Kempf, D.J., Marsh, K.C., Denissen, J.F., McDonald, E., Vasavanonda, S., Flentge, C.A., Green, B.E., Fino, L., Park, C.H., Kong, X.P.yet al. "ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(7): 2484-8.

L

■ LLedó-García, R., Nácher, A., Prats, L., Casabó, V.yMerino-Sanjúan, M. "Bioavailability and pharmacokinetic model for ritonavir in the rat." *J Pharm Sci.* Aceptado 2006.

■ Luo, G., Cunningham, M., Kim, S., Burn, T., Lin, J., Sinz, M., Hamilton, G., Rizzo, C., Jolley, S., Gilbert, D., Downey, A., Mudra, D., Graham, R., Carroll, K., Xie, J., Madan, A., Parkinson, A., Christ, D., Selling, B., LeCluyse, E. y Gan, L.S. "CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* 2002; 30(7): 795-804.

■ Lykkesfeldt J, Loft S, Poulsen HE. Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 beta-hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994 Oct 3;660(1):23-9.

M

■ Mallet, A. "A maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models." *Biometrika* 1986; **73**: 645-656.

■ Mandema, J.W. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacokinetics: regulatory, industrial academic perspectives.* Welling, P.G. y Tse, F.L. New York, Marcel Dekker:1995: 411-450

■ Mannheimer, S., Friedland, G., Matts, J., Child, C. y Chesney, M. (2002). "The consistency of adherence to antiretroviral therapy predicts biologic outcomes for human immunodeficiency virus-infected persons in clinical trials." *Clin Infect Dis* **34**(8): 1115-21.

■ Martínez Lanao Jose. Capítulo de Farmacología Clínica. Herrera Carranza Joaquin, *Manual de Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica.* Editorial ELSEVIER. España, 2006.

■ Mirghani RA, Ericsson O, Tybring G, Gustafsson LL, Bertilsson L Eur J Clin Pharmacol. Quinine 3-hydroxylation as a biomarker reaction for the activity of CYP3A4 in man. 2003 May;59(1):23-8. Epub 2003 Mar 11.

■ Molla, A., Vasavanonda, S., Kumar, G., Sham, H.L., Johnson, M., Grabowski, B., Denissen, J.F., Kohlbrenner, W., Plattner, J.J., Leonard, J.M., Norbeck, D.W.yKempf, D.J. "Human serum attenuates the activity of protease inhibitors toward wild-type and mutant human immunodeficiency virus." Virology 1998: **250**(2): 255-62.

■ Mocroft, A., Vella, S., Benfield, T.L., Chiesi, A., Miller, V., Gargalianos, P., d'Arminio Monforte, A., Yust, I., Bruun, J.N., Phillips, A.N.yLundgren, J.D. "Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group." Lancet 1998: 352(9142): 1725-30.

■ Moltó J, Santos JR, Negro E, Miranda C, Videla S, Clotet B. Lopinavir/ritonavir monotherapy as a simplification strategy in routine clinical practice. Antimicrob Chemother. 2007 Aug;60(2):436-9. Epub 2007 Jun 7.

■ Moltó J, Clotet B. Lopinavir/ritonavir monotherapy as a simplification strategy in antiretroviral therapy in clinical practice. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008 Dec;26 Suppl 16:24-6.

O

■ Oldfield V, Plosker GL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. Drugs. 2006;66(9):1275-99.

■ Oh, S.K., Cruikshank, W.W., Raina, J., Blanchard, G.C., Adler, W.H., Walker, J.yKornfeld, H. "Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients." J AcquirImmune Defic Syndr 1992;5(3): 251-6.

P

■ Palella, F.J., Jr., Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., Aschman, D.J.yHolmberg, S.D.. "Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators." 1998. N Engl J Med **338**(13): 853-60.

■ Palma-Aguirre JA, Gonzalez-Llaven J, Flores-Murrieta FJ, Castañeda Hernández G. Bioavailability of oral cyclosporine in healthy mexican volunteers: Evidence for interethnic variability. *J Clin Pharmacol.* 1997; 37:630-634.

■ Pérez-Guillé G, Guillé-Pérez A, Toledo-López A, Juárez-Olguín H, Flores Pérez C, Flores-Préz J, Carrasco-Portugal M, Lares-Asseff I, Camacho-Vieyra A. Effect of age on the pharmacokinetics of ranitidine in healthy Mexican volunteers. *Proc West Pharmacol Soc.* 2005;48:84-8.

■ Piscitelli SC. Antiretroviral pharmacology issues and management. *BETA.* 1999;12(4):9-15.

Q

■ Quirk E, McLeod H, Powderly W. The pharmacogenetics of antiretroviral therapy: a review of studies to date. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 1;39(1):98-106. Epub 2004 Jun 1.

R

■ Renán A. Góngora-Biachi¹, Orlando Sosa-Cantón², Norma Pavía-Ruz¹, Ligia Vera-Gamboa¹, Dora Lara-Perera¹. Factores asociados con el riesgo de infección por retrovirus (VIH-1 y HTLV-I/II) y su prevalencia en

sexotrabajadoras de Campeche, México, en 1996-1997. Rev Biomed 2003; 14:239-246.

■ Robbins, G.K., De Gruttola, V., Shafer, R.W., Smeaton, L.M., Snyder, S.W., Pettinelli, C., Dube, M.P., Fischl, M.A., Pollard, R.B., Delapenha, R., Gedeon, L., van der Horst, C., Murphy, R.L., Becker, M.I., D'Aquila, R.T., Vella, S., Merigan, T.C.yHirsch, M.S. "Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection." N Engl J Med 2003;349(24): 2293-303.

■ Rowland M y Tozer TN. Clinical Pharmacokinetics Concepts and Applications. William & Wilkins. 3rd Edition. PA, USA. 1995. 230-247 p.p.

■ Rodriguez, J. "Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia (I).Conceptos generales." Cienc Pharm 1996;6: 96-106

■ Rodriguez, J. "Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia (II).Métodos paramétricos." Cienc Pharm 1996;6: 152-162.

■ Rotger M, Lubomirov R, Rodríguez-Novoa S, Barreiro P; on behalf of the AIDS Study Group (Grupo de Estudio del Sida [GeSIDA]). Pharmacogenetics of antiretroviral therapy. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006 Nov;24 Suppl 2:13-8.

S

■ Schwartz JB. Pharmacogenetics: has it reached the clinic?. J Gender Specif Med. 2002; 5(2):13-18.

■ Schwartz JB. The influence of sex on pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet. 2003;42(2):107-21

■ 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, Salvidar A, Wideburg N, Chen X, Niu P, Park C, Jayanti V, Grabowski B, Granneman GR, Sun E, Japour AJ, Leonard JM, Plattner JJ, Norbeck DW. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3218–24.

■ Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. y Guengerich, F.P. "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." *J Pharmacol Exp Ther* 1994. 270(1): 414-23.

■ Sheiner, L.B., Rosenberg, B. y Marathe, V.V. "Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data." *J Pharmacokinet Biopharm* 1977; 5(5): 445-79.

■ Sheiner, L.B. y Beal, S.L. "Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data." *J Pharmacokinet Biopharm* 1980; 8(6): 553-71.

■ Sheiner, L.B. y Beal, S.L. "Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and 1981: 9(5): 635-51.

■ Sheiner, L.B. y Beal, S.L. "Some suggestions for measuring predictive performance." *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9(4): 503-12.

■ Steimer, J.L., Mallet, A., Golmard, J.L. y Boisvieux, J.F. "Alternative approaches to estimation of population pharmacokinetic parameters: comparison with the nonlinear mixed-effect model." *Drug Metab Rev* 1984; 15(1-2): 265-92.

- Sheiner, L.B. Modeling pharmacokinetic/pharmacodynamic variability. Variability in drug therapy. Description, estimation and control. Rowland, M., Sheiner, L.B.ySteimer, J.L. New York, Raven Press: 1985:51-64.

- Sheiner LB. The intellectual health of clinical drug evaluation. Clin Pharmacol Ther. 1991 Jul;50(1):4-9.

- Sheiner L.B y Grasela T.H. An introduction to mixed effect modeling: concepts, definitions and justification. J Pharmacokinet Biopharm 1991;19: 11S – 24 S.

- Slain D, Pakyz A, Israel DS, Monroe S, Polk RE. Variability in activity of hepatic CYP3A4 in patients infected with HIV. Pharmacotherapy. 2000 Aug;20(8):898-907.

- Staszewski, S., Morales-Ramirez, J., Tashima, K.T., Rachlis, A., Skest, D., Stanford, J., Stryker, R., Johnson, P., Labriola, D.F., Farina, D., Manion, D.J.yRuiz, N.M. "Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team." N Engl J Med 1999: 341(25): 1865-73.

- Sunila, I., Vaccarezza, M., Pantaleo, G., Fauci, A.S.y Orenstein, J.M. (1997). "gp120 is present on the plasma membrane of apoptotic CD4 cells prepared from lymph nodes of HIV-1-infected individuals: an immunoelectron microscopic study." Aids 11(1): 27-32.

T

■ Tod M, Mentré F, Merlé Y, Mallet A. Robust optimal design for the estimation of hyperparameters in population pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1998 Dec;26(6):689-716.

■ Totsuka S, Watanabe T, Koyanagi F, Tanaka K, Yasuda M, Manabe S. Increase in urinary excretion of 6beta-hydroxycortisol in common marmosets as a marker of hepatic CYP3A induction. *Arch Toxicol.* 1999 Jun-Jul;73(4-5):203-7.

U

■ UNAIDS (2004). AIDS Epidemic. <http://hiv.net/link.php?id=227>.

V

■ Volberding, P.A., Lagakos, S.W., Koch, M.A., Pettinelli, C., Myers, M.W., Booth, D.K., Balfour, H.H., Jr., Reichman, R.C., Bartlett, J.A., Hirsch, M.S. et al.

■ Van Heeswijk RP, Khaliq Y, Gallicano KD, Bourbeau M, Seguin I, Phillips EJ, Cameron DW. The pharmacokinetics of nelfinavir and M8 during pregnancy and post partum. *lin Pharmacol Ther.* 2004 Dec;76(6):588-97.

W

■ Whiting B, Kelman AW, Grevel J. Population pharmacokinetics, theory and clinical application. *Clin Pharmacokinet.* 1986; 11:387-401.

Y

■ Yazdanpanah, Y., Sissoko, D., Egger, M., Mouton, Y., Zwahlen, M. y Chene, G. "Clinical efficacy of antiretroviral combination therapy based on protease inhibitors or non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors: indirect comparison of controlled trials." *Bmj* 2004;328(7434): 249.

■ Yeates RA, Scharpf F, Laufen H, Zimmermann T. Screening for cytochrome P450 3A in man: studies with midazolam and nifedipine. *J Pharm Pharmacol.* 1996 Sep;48(9):933-4.

Z

■ "Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.". *N Engl J Med* **322**(14): 941-9.

■ Zeldin, R.K. y Petruschke, R.A. "Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients." *J Antimicrob Chemother* 2004: **53**(1): 4-9.