



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

## TESIS DOCTORAL

# EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE EL EEG, SEDACIÓN Y RENDIMIENTO PSICOMOTOR DE DIAZEPAM Y DESMETILDIAZEPAM EN VOLUNTARIOS SANOS. APLICACIÓN DE MODELADO FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO POBLACIONAL.

Autor: M<sup>a</sup> Rosa Ballester Verneda

Firma \_\_\_\_\_

Director: Dra. Marta Valle Cano

Firma \_\_\_\_\_

Programa de Doctorado: Farmacología

Departamento: Farmacología, Terapéutica y Toxicología

Universidad: Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, Diciembre de 2015



*Al Nil, el meu tresor*



## *Viatge a Ítaca*

*Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
ple d'aventures, ple de coneixences.  
has de pregar que el camí sigui llarg,  
que siguin moltes les matinades,  
que entraràs en un port que els teus ulls ignoraven,  
i vagis a ciutats per aprendre dels que saben.  
tingues sempre al cor la idea d'Ítaca,  
has d'arribar-hi, és el teu destí,  
però no forçis gens la travessia.  
és preferible que duri molts anys,  
que siguis vell quan fondegis l'illa,  
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,  
sense esperar que et doni més riqueses.  
Ítaca t'ha donat el bell viatge,  
sense ella no hauries sortit.  
i si la trobes pobre, no és que Ítaca  
t'hagi enganyat. Savi com bé t'hauràs fet,  
sabràs el que volen dir les Ítaques.*

*Poema de Konstantinos Kavafis, 1911  
(traduït per Carles Riba i musicat per Lluís Llach, 1975)*



---

## AGRAÏMENTS

El meu sincer agraïment a totes aquelles persones que han contribuït d'una o altra manera a que aquesta tesi sigui una realitat.

Als meus pares Joan i Carme. Gràcies per donar-me la oportunitat de viure, per la educació que m'heu donat, per la vostra dedicació, amor i respecte.

A la meva germana Marta, una llum a la meva vida. Gràcies per ser com ets i pels teus consells.

Als meus avis, especialment a l'àvia Rosa, una persona excepcional. Gràcies per omplir de felicitat els meus anys d'infantesa.

Al Jordi i el Nil, la meva petita família. Gràcies per ser-hi en els bons i en els mals moments.

A la Marta Valle, per guiar-me en el món de la farmacocinètica/farmacodinamia poblacional, pel teu ajut i la teva paciència. Gràcies pels bons moments compartits, innumerables hores de feina, il·lusions i també decepcions.

A la Rosa M<sup>a</sup> Antonijoan, perquè sempre hi has estat quan ho he necessitat. Gràcies per confiar en mi i per reconèixer i valorar la meva feina.

A l'Ignasi Gich, per les teves ensenyances i el teu suport. La estadística és molt més divertida si la expliques tu i les partides nadalenques de quinto també!. Gràcies per creure en mi.

Al Jordi Riba, per tot el que m'has ensenyat sobre la Electroencefalografia i per mostrar-me un altre món de la farmacologia. Gràcies per permetre'm formar part dels teus estudis amb les substàncies d'abús.

A la Mercedes Yritia, amb qui vaig tenir la sort de treballar uns quants anys. Sense tu, aquest treball tampoc hagués estat possible. Gràcies pel teu meticulós treball en la quantificació dels fàrmacs.

Al Sergio Romero, company de feina durant alguns anys al CIM. Gràcies per contribuir a que aquest treball sigui possible.

A la Helena Colom, per introduïr-me al desconegut món que aleshores (a 5è de carrera) era per a mi la farmacocinètica poblacional, tu em vas fer venir les ganes d'explorar més a fons aquest món, així que, infinites gràcies.

---

A la família Cortés-Bosch de Basea. Excel·lents persones i grans amics. Gràcies per ser com sou.

A tots els companys, amics i amigues del Centre d'Investigació del Medicament de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau que hi han estat durant tots aquests anys, en especial a la Eva Grassa, la Clara Juandó, la Susanna Clos, la Consuelo García, la Montse Punes, la Mireia González, la Maribel Martínez, l'Esteve Mercader, la Sara Mora i l'Angy Funes. Gràcies pel vostre impagable treball i pels bons moments compartits.

Als meus amics i amigues, en especial la M<sup>a</sup> Carmen i la Mia. Gràcies per ser-hi sempre.

Al Manel Barbanoj, perseverant i incansable en la seva recerca de coneixement. Segur que haguéssis aportat la teva genialitat a la discussió d'aquesta tesi. Gràcies per donarme la possibilitat de treballar en l'àrea de la farmacologia humana i confiar en mi desde l'inici, per tot el que em vas ensenyar, per deixar-me aprendre de tu i amb tu.

També estic en deute amb el Francesc Jané, actualment ex cap de Servei de Farmacologia Clínica. Gràcies per fer-ho possible.

Als voluntaris, ja que sense ells, no s'hagués pogut realitzar aquest treball. Gràcies per col·laborar a que la ciència i el coneixement continuïn avançant.

Gràcies a tots per formar part del meu viatge, de tots conservo moments inoblidables.

---

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Cantidad de fármaco en el compartimento de absorción
AA	Acontecimiento Adverso
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AIC	Criterio de Información de Akaike
Algoritmo BSS	Algoritmo de Separación Ciega de Fuentes
ANOVA	Análisis de la Varianza
ATC	Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química
AUC	Área Bajo la Curva
$AUC_0^t$	Área Bajo la Curva desde tiempo 0 hasta tiempo t
$AUC_0^\infty$	Área Bajo la Curva desde tiempo 0 hasta infinito
$AUC_0^{12}$	Área Bajo la Curva desde tiempo 0 hasta 12 horas
$\beta$ -HCG	Hormona Gonadotropina Coriónica
CCI	Coefficiente de Correlación Intraclase
Cl	Cloro
Cl	Aclaramiento
Cl/F	Aclaramiento aparente de eliminación
Cl <sub>d</sub> /F	Aclaramiento aparente de distribución
$C_{last}$	Última concentración de fármaco superior al límite de cuantificación
$C_{max}$	Concentración máxima
$C_p$	Concentración en plasma
CV	Coefficiente de Variación
CRD	Cuaderno de Recogida de Datos
CYP	Citocromo P450
d2	Test de cancelación d2
D	Dosis
DE	Desviación Estándar
DE <sub>50</sub>	Dosis Eficaz 50
DMDZ	Desmetildiazepam
DMDZ1	Desmetildiazepam tras la primera ocasión en que se administra DZ
DMDZ2	Desmetildiazepam tras la segunda ocasión en que se administra DZ
DZ	Diazepam
DZ1	Diazepam administrado en la primera ocasión
DZ2	Diazepam administrado en la segunda ocasión
E	Efecto
$E_0$	Efecto en estado basal
$E_{max}$	Efecto Máximo
EC <sub>50</sub>	Concentración de analito que produce la mitad del efecto máximo
ECG	Electrocardiograma

---

EEG	Electroencefalograma
EER	Error Estándar Relativo
EOG	Electrooculograma
EOG-V	Electrooculograma vertical
EOG-H	Electrooculograma horizontal
fEEG	Fármaco-Electroencefalografía
fEEGc	Fármaco-Electroencefalografía cuantitativa
F	Biodisponibilidad
FC	Frecuencia Cardíaca
FC/FD	Farmacocinética/Farmacodinamia
FO	<i>First Order</i>
FOCE	<i>First Order Conditional Estimation</i>
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAM	Modelos Aditivos Generalizados
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSCSP	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Hz	Hercios
IPRED	Predicción individual
iv	Intravenoso
k <sub>0</sub>	Constante de velocidad de orden cero
k <sub>a</sub>	Constante de velocidad de absorción de primer orden
k <sub>e</sub>	Constante de velocidad de eliminación de primer orden
k <sub>i</sub>	Constante de Inhibición
k <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
k <sub>PD</sub>	Afinidad estimada in vivo
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LLT	Término de Nivel Menor
NONMEM	Nonlinear Mixed Effects Modeling
NC	No converge
NE	No estimado
OBJ	Función Objetiva
OBS	Observaciones
PDS	Densidad de Potencia Espectral
PRED	Predicción poblacional
PT	Término Preferente
qEEG	EEG cuantitativa
RES	Residuales
rpm	Revoluciones por minuto
S <sub>0</sub>	E <sub>max</sub> /EC <sub>50</sub>

---

---

SLP	Pendiente
SNC	Sistema Nervioso Central
SOC	Sistema de Clasificación de Órganos
T	Temperatura
TAS	Tensión Arterial Sistólica
TAD	Tensión Arterial Diastólica
$t_{lag}$	Tiempo de Latencia
$t_{max}$	Tiempo en que se alcanza la concentración máxima
$t_{1/2}$	Tiempo de semivida de eliminación
VAS	Escala Analógica Visual
V/F	Volumen aparente de distribución
$V_c$	Volumen de distribución del compartimento central
$V_c/F$	Volumen aparente de distribución del compartimento central
$V_p$	Volumen de distribución del compartimento periférico
$V_p/F$	Volumen aparente de distribución del compartimento periférico
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VII	Variabilidad interindividual
VIO	Variabilidad interocasiones
VPC	Visual Predictive Check
$V_{Max}$	Velocidad Máxima
WRES	Residuales ponderados
$\theta_{p,pop}$	Valor típico poblacional del parámetro
$\eta$	Variabilidad interindividual
$\omega$	Desviación estándar de la variabilidad interindividual
$\varepsilon$	Variabilidad residual
$\sigma$	Desviación estándar de la variabilidad residual

---



---

# INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.- BENZODIAZEPINAS .....</b>	<b>3</b>
1.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA .....	3
1.2.- FARMACOCINÉTICA .....	4
1.3.- FARMACODINAMIA .....	5
1.3.1.- Mecanismo de acción de las benzodiazepinas .....	5
1.3.2.- GABA .....	6
1.3.2.1.- Receptor benzodiazepínico (GABA <sub>A</sub> ) .....	6
1.3.2.2.- GABA <sub>B</sub> .....	8
1.3.2.3.- GABA <sub>A-D</sub> .....	9
1.3.3.- Efectos farmacológicos.....	9
1.3.4.- Efectos de las benzodiazepinas sobre el EEG.....	10
1.3.5.- EEG como biomarcador .....	12
1.3.6.- Clasificación de las benzodiazepinas .....	13
<b>2.- DIAZEPAM.....</b>	<b>14</b>
2.1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS .....	14
2.2.- FARMACOCINÉTICA .....	14
2.2.1.- Absorción .....	15
2.2.2.- Distribución .....	15
2.2.3.- Metabolismo.....	16
2.2.4.- Eliminación.....	17
2.3.- FARMACODINAMIA .....	19
2.3.1.- Mecanismo de acción de DZ .....	19
2.3.2.- Indicações terapéuticas y posología.....	19
2.3.3.- Reacciones adversas .....	20
<b>3.- DESMETILDIAZEPAM (DMDZ) .....</b>	<b>22</b>
3.1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS .....	22
3.2.- FARMACOCINÉTICA .....	22
3.2.1.- Absorción .....	22
3.2.2.- Distribución .....	23
3.2.3.- Metabolismo.....	23
3.2.4.- Eliminación.....	23
3.3.- FARMACODINAMIA .....	24
3.3.1.- Mecanismo de acción de DMDZ.....	24
3.3.2.- Indicações terapéuticas y posología.....	24
3.3.3.- Reacciones adversas .....	24
<b>4.- MODELIZACION FARMACOCINETICA / FARMACODINAMICA POBLACIONAL .....</b>	<b>25</b>
4.1.- RELACIONES FARMACOCINÉTICAS/FARMACODINÁMICAS .....	25
4.2.- MODELOS FARMACOCINÉTICOS .....	25
4.2.1.- Modelo de un compartimento .....	26
4.2.2.- Modelo de dos compartimentos.....	26
4.2.3.- Modelos de tres o más compartimentos.....	26
4.3.- MODELOS FARMACODINÁMICOS.....	26
4.4.- COMPLEJIDADES.....	28
<b>II. HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>

---

<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
1.- ELECCIÓN DE LA DOSIS .....	39
2.- SUJETOS.....	39
2.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	40
2.2.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	41
3.- DISEÑO DEL ESTUDIO .....	42
3.1.- EXPLORACIÓN PRE-ESTUDIO .....	42
3.2.- INSTITUCIONALIZACIÓN Y SUPERVISIÓN DE LOS SUJETOS.....	43
3.3.- OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS .....	43
4.- EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA Y EL EEG .....	44
4.1.- DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE DZ Y DMDZ .....	44
4.1.1.- Condiciones cromatográficas .....	44
4.1.2.- Preparación de las soluciones estándar .....	44
4.1.3.- Procedimiento de extracción .....	45
4.1.4.- Validación del método analítico .....	45
4.2.- EVALUACIÓN DEL EEG .....	48
4.2.1.- Cartografía topográfica .....	48
4.2.1.1.- Adquisición de las señales .....	48
4.2.1.2.- Análisis espectral de los cambios observados en el EEG .....	49
4.3.- ANÁLISIS MODELO INDEPENDIENTE.....	49
4.3.1.- Análisis exploratorio de los datos .....	49
4.3.2.- Generación de variables.....	49
4.3.2.1.- Farmacocinéticas.....	50
4.3.2.2.- Farmacodinámicas .....	50
4.3.3.- Análisis estadístico .....	50
4.3.3.1.- Farmacocinética .....	51
4.3.3.2.- Farmacodinamia .....	51
4.3.3.2.1.- Evaluación de la situación basal .....	51
4.3.3.2.2.- Efecto global de los tratamientos .....	52
4.3.3.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto .....	53
4.3.3.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado .....	53
4.4.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO / FARMACODINÁMICO POBLACIONAL.....	53
4.4.1.- Etapas del desarrollo del modelo farmacocinético / farmacodinámico poblacional .....	55
4.4.1.1.- Farmacocinética .....	55
4.4.1.1.1.- Análisis exploratorio de datos.....	55
4.4.1.1.2.- Desarrollo del modelo farmacocinético .....	55
4.4.2.- Farmacodinamia .....	65
4.4.2.1.- Análisis exploratorio de datos.....	65
4.4.2.2.- Desarrollo del modelo farmacodinámico .....	66
4.4.3.- Criterios de selección del modelo.....	67
4.4.4.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo.....	68
4.4.5.- Simulaciones.....	68
4.4.5.1.- Contribución del DMDZ en el efecto observado tras administrar una dosis de 30 mg de DZ .....	68
4.4.5.2.- Efecto predicho por el modelo sobre el EEG en el estado equilibrio estacionario tras administrar dosis clínicas de DZ de 5 mg/12 h y contribución de DMDZ en dicho efecto .....	69
4.4.5.3.- Búsqueda de la dosis de DMDZ equivalente a 5 mg /12 h de DZ .....	69

---

---

5.- RENDIMIENTO PSICOMOTOR (test de cancelación d2) y VAS.....	<b>70</b>
5.1.- TEST DE CANCELACIÓN d2.....	70
5.2.- ESCALAS ANALOGICAS VISUALES (VAS).....	70
5.3.- ANÁLISIS DE DATOS .....	71
5.3.1.- Análisis exploratorio.....	71
5.3.2.- Generación de variables.....	71
5.3.3.- Análisis estadístico .....	72
5.3.3.1.- Evaluación de la situación basal .....	72
5.3.3.2.- Efecto global de los tratamientos .....	72
5.3.3.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto. ....	73
5.3.3.4.- Reproducibilidad del efecto observado .....	73
6.- SEGURIDAD.....	<b>74</b>
6.1.- ACONTECIMIENTOS ADVERSOS .....	74
6.2.- EFECTOS CARDIOVASCULARES.....	74
6.2.1.- Análisis estadístico .....	74
6.2.1.1.- Evaluación de la situación basal .....	75
6.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos .....	75
6.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	75
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
1.- SUJETOS.....	<b>79</b>
2.- ANALISIS MODELO INDEPENDIENTE .....	<b>79</b>
2.1.- FARMACOCINÉTICA .....	79
2.1.1.- Análisis exploratorio de los datos .....	79
2.1.2.- Análisis farmacocinético modelo independiente (no compartimental) .....	83
2.2.- VARIABLES DERIVADAS DE LA ELECTROENCEFALOGRAFIA.....	84
2.2.1.- Poder relativo alfa.....	84
2.2.1.1.- Evaluación de la situación basal .....	86
2.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos .....	86
2.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	87
2.2.1.4.- Reproducibilidad del efecto observado .....	88
2.2.2.- Poder relativo beta.....	89
2.2.2.1.- Evaluación de la situación basal .....	91
2.2.2.2.- Efecto global de los tratamientos .....	91
2.2.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	92
2.2.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado .....	93
3.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO POBLACIONAL.....	<b>95</b>
3.1.- FARMACOCINÉTICA .....	95
3.1.1.- Desarrollo del modelo FC de DMDZ tras administración de DMDZ.....	95
3.1.1.1.- Análisis exploratorio de datos.....	95
3.1.1.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	97
3.1.1.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico .....	98
3.1.1.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables .....	101
3.1.1.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo.....	105
3.1.2.- Desarrollo del modelo FC poblacional de DZ tras su administración por vía oral.....	105
3.1.2.1.- Análisis exploratorio de datos.....	105
3.1.2.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	107
3.1.2.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico .....	107
3.1.2.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables .....	111
3.1.2.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo.....	116

---

---

3.1.3.- Desarrollo del modelo FC poblacional de DMDZ tras la administración de DZ por vía oral, fijando DZ.....	117
3.1.3.1.- Análisis exploratorio de datos.....	117
3.1.3.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	119
3.1.3.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico.....	119
3.1.4.- Desarrollo del modelo FC poblacional de DZ y DMDZ simultáneamente.....	123
3.1.4.1.- Análisis exploratorio de datos.....	123
3.1.4.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	123
3.1.4.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico.....	124
3.1.4.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables.....	127
3.1.4.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo.....	134
3.2.- FARMACODINAMIA.....	137
3.2.1.- Desarrollo del modelo FD poblacional de DMDZ tras su administración por vía oral.....	137
3.2.1.1.- Análisis exploratorio de datos.....	137
3.2.1.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	138
3.2.1.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico.....	139
3.2.1.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables.....	141
3.2.1.5.- Modelo seleccionado.....	141
3.2.1.6.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo.....	142
3.2.2.- Desarrollo del modelo FD poblacional de DZ tras su administración por vía oral.....	143
3.2.2.1.- Análisis exploratorio de datos.....	143
3.2.2.2.- Análisis PD fijando los estimados bayesianos de DMDZ.....	146
3.2.2.2.1.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	146
3.2.2.2.2.- Desarrollo del sub-modelo estadístico.....	147
3.2.2.2.3.- Desarrollo del sub-modelo de covariables.....	148
3.2.2.2.4.- Modelo seleccionado.....	149
3.2.2.2.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo.....	152
3.2.2.3.- Análisis PD fijando los estimados poblacionales de DMDZ.....	153
3.2.2.4.- Análisis farmacodinámico de DZ y DMDZ simultáneamente.....	154
3.2.2.4.1.- Desarrollo del sub-modelo estructural.....	154
3.2.2.4.2.- Desarrollo del sub-modelo estadístico.....	155
3.2.2.4.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico de covariables.....	155
3.3.- SIMULACIONES.....	157
3.3.1.- Contribución del DMDZ en el efecto observado tras administrar una dosis de 30 mg de DZ.....	157
3.3.2.- Efecto predicho por el modelo sobre el EEG en el estado de equilibrio estacionario tras administrar dosis clínicas de DZ (5 mg/12h) y contribución de DMDZ en dicho efecto.....	158
3.3.3.- Búsqueda de dosis de DMDZ equivalente a 5 mg/12 h de DZ.....	160
4.- EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO PSICOMOTOR Y VAS.....	162
4.1.- Rendimiento Psicomotor (Test de cancelación d2).....	162
4.1.1.- d2t.....	162
4.1.1.2.- Evaluación de la situación basal.....	163
4.1.1.3.- Efecto global de los tratamientos.....	163
4.1.1.4.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	165
4.1.1.5.- Reproducibilidad del efecto observado.....	166
4.1.2.- d2c.....	167
4.1.2.1.- Evaluación de la situación basal.....	168
4.1.2.2.- Efecto global de los tratamientos.....	169
4.1.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	170
4.1.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado.....	171

---

---

4.2.- Pruebas de valoración subjetiva .....	172
4.2.1.- VAS (Activo- Pasivo) .....	172
4.2.1.1.- Evaluación de la situación basal .....	174
4.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos .....	174
4.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto .....	175
4.2.1.4.- Reproducibilidad del efecto observado .....	177
4.2.2.- VAS (Somnoliento-Despierto) .....	177
4.2.2.1.- Evaluación de la situación basal .....	179
4.2.2.2.- Efecto global de los tratamientos .....	179
4.2.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto .....	180
4.2.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado .....	182
<b>5.- EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD .....</b>	<b>183</b>
5.1.- ACONTECIMIENTOS ADVERSOS .....	183
5.2.- CONSTANTES VITALES.....	190
5.2.1.- Tensión arterial sistólica .....	192
5.2.1.1.- Evaluación de la situación basal .....	192
5.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos .....	192
5.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	192
5.2.2.- Tensión arterial diastólica .....	193
5.2.2.1.- Evaluación de la situación basal .....	193
5.2.2.2.- Efecto global de los tratamientos .....	193
5.2.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	193
5.2.3.- Frecuencia cardíaca .....	194
5.2.3.1.- Evaluación de la situación basal .....	194
5.2.3.2.- Efecto global de los tratamientos .....	194
5.2.3.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.....	195
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>197</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>219</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>223</b>



---

---

I.

# Introducción

---

---



## 1.- BENZODIAZEPINAS

Las benzodiazepinas son una clase de fármacos que actúan en el sistema nervioso central (SNC). Fueron descubiertas en 1957 por Sternbach en Roche (Sternbach, 1979) y dos grupos independientes elucidaron sus sitios de unión en 1977 (Mohler and Okada, 1977; Squires and Brastrup, 1977). Estos fármacos desplazaron el uso de los barbitúricos y el meprobamato en el tratamiento de la ansiedad por ser más efectivos y seguros (Harvey and Champe, 2008) y en la actualidad son los fármacos ansiolíticos más ampliamente utilizados (AEMPS, 2014). Producen su efecto como consecuencia de su interacción con un lugar específico localizado en el complejo molecular del receptor GABA<sub>A</sub> conocido como receptor benzodiazepínico (Mohler, 2012; Rudolph et al., 1999).

### 1.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA

Las benzodiazepinas están compuestas por un anillo bencénico (A) unido a un anillo diazepínico (B). La mayoría de fármacos incluidos en este grupo derivan del anillo 1,4-benzodiazepínico, representado en la Figura 1. Este anillo es el responsable de la afinidad de las benzodiazepinas por el receptor benzodiazepínico (Fryer et al., 1982) y constituye la estructura fundamental para que el compuesto tenga actividad y además debe estar sustituido en posición 7 ya que es la más efectiva para aumentar la afinidad del compuesto por el sitio de unión benzodiazepínico (Wang et al., 1999). Concretamente, se ha relacionado el tener un grupo con carácter electronegativo en esta posición con un aumento en la afinidad por el lugar de unión benzodiazepínico. El radical alquílico en posición 1 no influye en la actividad farmacológica, pero condiciona procesos farmacocinéticos. Por ejemplo, la desalquilación de aquellas benzodiazepinas con un radical alquilo en esta posición origina metabolitos activos. La presencia de distintos sustituyentes en otras posiciones del anillo provocan cambios en la potencia del fármaco y en sus propiedades farmacocinéticas que determinan la intensidad de la acción, la duración y la aparición de efectos adversos (Flórez, 2003). La potencia se aumenta mediante la incorporación de elementos halógenos (flúor, cloro) en posición 2, pero se reduce fuertemente con un sustituyente en posición 4 (Gerecke, 1983). Un grupo carbonilo en posición 2 y el doble anillo 4-5 contribuyen de manera sustancial a la afinidad de unión del compuesto. La eliminación del grupo carbonilo en posición 2 produce una disminución en la afinidad de la unión del compuesto, mientras que la saturación del doble enlace 4-5 provoca una pérdida completa de la afinidad *in vitro* (Borea and Bonora, 1983; Gupta et al., 1992; Loew et al., 1984). La presencia de sustituyentes de mayor tamaño que un grupo hidroxilo o metilo en posición 3, provoca una pérdida de actividad (Gerecke, 1983).

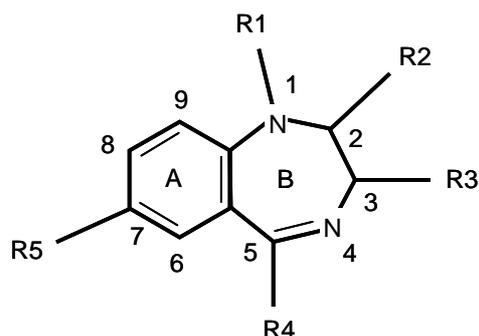


Figura 1: Estructura química general de benzodiazepinas

## 1.2.- FARMACOCINÉTICA

Como la velocidad de absorción, volúmenes de distribución, y constantes de eliminación son tan distintos entre benzodiazepinas, cada benzodiazepina tiene un perfil único de curva de concentraciones plasmáticas (Altamura 2013). Generalmente, todas las benzodiazepinas se absorben bien por vía oral aunque algunas lo hacen más rápidamente que otras dependiendo del grado de liposolubilidad (Riss et al., 2008). Su absorción puede verse retrasada o enlentecida cuando se administran con comida debido a un incremento del tiempo de vaciado gástrico (Greenblatt et al., 1978; Welling, 1984, 1989). Este retraso en la absorción se ha observado en algunas benzodiazepinas como alprazolam (Erdman et al., 2007), clobazam (Divoll et al., 1982), midazolam (Bornemann et al., 1986), nitrazepam (Yamazaki et al., 2007) y diazepam (Yamazaki et al., 2007) y puede producir una disminución en la velocidad de absorción de hasta el 50% (Divoll et al., 1982).

Otra causa que puede modificar la absorción de algunas benzodiazepinas es la interacción con antiácidos cuya coadministración es bastante habitual. Esta interacción se ha descrito para DZ (Greenblatt et al., 1978; Nair et al., 1976) y clordiazepóxido, reduciendo su velocidad de absorción pero sin afectar la magnitud de la absorción (Greenblatt et al., 1976) y para el desmetildiazepam generado a partir de clorazepato, reduciendo la velocidad y la magnitud en la absorción de desmetildiazepam (Shader et al., 1978) Pero no se ha observado ningún efecto sobre la absorción de temazepam (Kroboth et al., 1985). La edad también puede afectar a la absorción de las benzodiazepinas (Hammerlein et al., 1998).

Las benzodiazepinas se distribuyen mostrando un perfil bifásico (Altamura et al., 2013; Greenblatt, 1987). Para la mayoría de las benzodiazepinas, una vez se ha alcanzado el equilibrio de distribución, el 95% del fármaco en el cuerpo se encuentra en los tejidos (ej: compartimentos periféricos). Las benzodiazepinas se unen en elevada proporción al sitio II de la albúmina humana,

siendo la fracción libre independiente de la concentración plasmática total (Flórez, 2003; Herve et al., 1994; Moschitto and Greenblatt, 1983; Sudlow et al., 1976).

El metabolismo de estos fármacos es muy complejo, siendo las 2 vías metabólicas principales de biotransformación, la oxidación a través de microsomas hepáticos (N-desalquilación o hidroxilación y la glucuronoconjugación (Court et al., 2002; Mandrioli et al., 2008; Olkkola and Ahonen, 2008). Las reacciones de oxidación son catalizadas por el citocromo P450 (CYP), por las isoenzimas 3A4/3A5 y 2C19 (Olkkola and Ahonen, 2008). Normalmente las benzodiazepinas que sufren primero oxidación a través del citocromo P450 (CYP), generan metabolitos activos que posteriormente se tienen que glucuronizar para ser excretados, y su duración de acción puede ser muy larga. Contrariamente, la glucuronoconjugación directa del fármaco produce metabolitos inactivos que se excretan rápidamente y generalmente tienen una duración de la acción corta (Mandrioli et al., 2008). La metabolización mediante las vías oxidativas originan metabolitos intermedios activos, de los que cabe destacar el N-desmetildiazepam (DMDZ) por tres razones: la frecuencia con la que aparece como metabolito activo de otras benzodiazepinas, su larga semivida de eliminación y su elevada afinidad y actividad biológica.

### **1.3.- FARMACODINAMIA**

#### **1.3.1.- Mecanismo de acción de las benzodiazepinas**

Las benzodiazepinas actúan de manera selectiva sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, que intervienen en la transmisión sináptica inhibitora rápida de todo el sistema nervioso central (SNC) (Rang and Dale, 2008). Actúan como moduladores alostéricos de los receptores GABA<sub>A</sub>. Pueden actuar como agonistas, antagonistas, agonistas-antagonistas y agonistas inversos, aunque en este documento nos referiremos a las benzodiazepinas como agonistas gabaérgicos. Cuando las moléculas de GABA (ácido  $\gamma$  aminobutírico) se unen al receptor GABA<sub>A</sub>, provocan una interacción con el canal de cloro que ocasiona su leve apertura y como consecuencia rápidamente se produce un aumento de conductancia al cloro en la neurona. La entrada de iones de cloro ocasiona una ligera hiperpolarización que desplaza el potencial postsináptico lejos de su umbral de disparo e inhibe la formación de potenciales de acción (Rang and Dale, 2008). Cerca de este receptor para el GABA, no solo se encuentra el canal de cloro sino también el sitio de unión al receptor de las benzodiazepinas. La unión de sustancias al receptor benzodiazepínico no afecta a la conductancia de cloro directamente modulando este canal, sino alostéricamente modulando el sitio de unión del GABA, que a su vez modula el canal de cloro. En consecuencia, cuando una benzodiazepina se une a su propio sitio de unión del receptor benzodiazepínico, no se desencadena ninguna respuesta a menos que el GABA se una a su propio sitio de unión del receptor GABA<sub>A</sub>.

### 1.3.2.- GABA

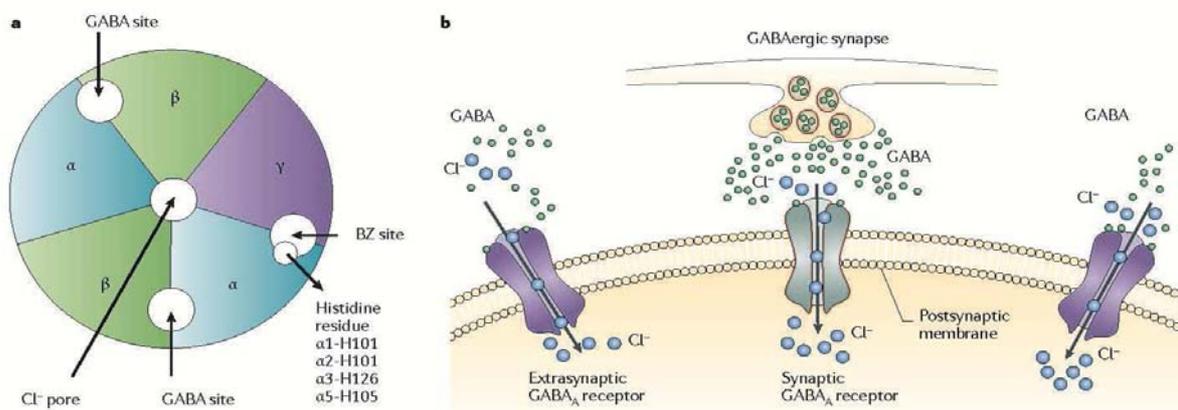
El GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del encéfalo, es una molécula flexible de bajo peso molecular, que puede alcanzar un gran número de conformaciones de baja energía (Crittenden et al., 2005). Presenta una amplia distribución en el SNC (Froestl, 2011) y fue descubierto en el cerebro en 1950 por 3 grupos independientes (Awapara et al., 1950; Roberts and Frankel, 1950; Udenfriend, 1950) y reconocido como un neurotransmisor inhibitorio en 1967 (Krnjevic and Schwartz, 1967). Se sintetiza a partir del glutamato a través del enzima ácido glutámico descarboxilasa. El glutamato, es un aminoácido no esencial, generado a partir de depósitos intraneuronales de aminoácidos, y constituye el aminoácido libre más abundante en el SNC.

El GABA actúa sobre tres tipos distintos de receptores, el receptor GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>A-ρ</sub>. Los subtipos GABA<sub>A</sub> y ρ GABA<sub>C</sub>, son receptores ionotrópicos y GABA<sub>B</sub>, es un receptor metabotrópico (Froestl, 2011).

#### 1.3.2.1.- Receptor benzodiazepínico (GABA<sub>A</sub>)

En 1987 se clonó por primera vez el receptor GABA<sub>A</sub> (Schofield et al., 1987). Este receptor es una proteína macromolecular que contiene sitios de unión específicos para GABA, barbituratos, benzodiazepinas, esteroides, anestésicos y picrotoxina (Mehta and Ticku, 1999) y es una diana para fármacos validada (Whiting, 2003).

El receptor GABA<sub>A</sub>, es un canal iónico controlado por Cl<sup>-</sup>. Está formado por una estructura pentamérica (Nayeem et al., 1994) de unos 275 kDa (Macdonald and Olsen, 1994) como se muestra en la Figura 2.



Reproducido con permiso de "Nature Publishing Group".

**Figura 2:** Receptor GABA<sub>A</sub> con sus 5 principales subunidades. a) la mayoría de receptores GABA<sub>A</sub> contienen 2 subunidades  $\alpha$ , 2 subunidades  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ , con 2 sitios de unión GABA formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . b) Los efectos mediados por el receptor GABA<sub>A</sub> tienen 2 efectos en la membrana postsináptica: un aumento en la conductancia de la membrana postsináptica y un cambio en el potencial de membrana que permite el movimiento de los iones  $\text{Cl}^-$  a través de la membrana (inhibición hiperpolarizante).

Hasta el momento se han descrito 8 familias de subunidades, aunque de algunas existen múltiples isoformas, lo que genera 19 subtipos conocidos:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  y  $\rho_{1-3}$  (Amin and Weiss, 1994; Mehta and Ticku, 1999; Olsen et al., 2012; Olsen and Sieghart, 2008, 2009; Rudolph et al., 2001; Rudolph and Knoflach, 2011). Aunque la combinación de estas subunidades puede resultar en una gran diversidad en la composición del receptor, la mayoría de los receptores GABA<sub>A</sub> están compuestos por dos subunidades alfa, una beta y una gamma (Olsen and Sieghart, 2008), variando la composición en las subunidades en diferentes partes del cerebro (Luscher et al., 2012; Sieghart and Sperk, 2002) con funciones diferentes. Los receptores que contienen las subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  o  $\alpha_5$  con alguna de las subunidades  $\beta$  y la subunidad  $\gamma_2$  son los más prevalentes en el cerebro (Mohler et al., 2005; Rang and Dale, 2008). Aproximadamente el 60% de todos los receptores GABA<sub>A</sub> tiene la combinación de subunidades  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , del 15 al 20% tienen la combinación  $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ , del 10 al 15% presentan la combinación  $\alpha_3\beta_n\gamma_2$ , el 5% tienen la combinación  $\alpha_4\beta_n\gamma / \alpha_4\beta_n\delta$ , menos del 5% tienen la combinación  $\alpha_5\beta_{1/3}\gamma_2$ , y  $\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$  y una pequeña población tienen la combinación  $\alpha_6\beta_n\delta$  (Mohler et al., 2002; Mohler et al., 2005).

La complejidad de la farmacología de las benzodiazepinas se ilustra por la observación de que sólo la co-expresión de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  generan receptores que pueden ser potenciados por benzodiazepinas, teniendo además una influencia relevante las diferentes isoformas de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_5, \text{ o } \alpha_6$ ) en el sitio de unión benzodiazepínico (Luscher et al., 2012). Además, la farmacología del receptor no dependerá sólo de estas 3 subunidades, sino también de las 2 restantes, que conjuntamente constituyen la estructura pentamérica (Foreman and Johansen,

2003). La existencia de al menos 16 espacios accesibles dentro del mismo receptor, explica la extremadamente compleja farmacología de los receptores GABA<sub>A</sub> (Sieghart et al., 2012).

Los receptores GABA<sub>A</sub>, que contienen la subunidad  $\alpha_1$  son responsables del efecto sedante (McKernan et al., 2000), amnésico y anticonvulsivante de las benzodiazepinas y además esta subunidad está implicada en la plasticidad cortical prematura y la adicción de las benzodiazepinas (Rudolph and Knoflach, 2011; Tan et al., 2010). Juntamente con la subunidad  $\alpha_2$  están involucrados en los mecanismos de reducción del miedo que provocan las benzodiazepinas (Smith et al., 2012). Los receptores que contienen la subunidad  $\alpha_2$  son responsables de la acción ansiolítica y miorrelajante (Low et al., 2000) y, junto con la subunidad  $\alpha_3$ , de la acción analgésica local de las benzodiazepinas en la médula espinal (Mirza and Munro, 2010). La subunidad  $\alpha_2$  está relacionada con la antihiperalgnesia, antidepresión y discapacidad cognitiva en esquizofrenia (Rudolph and Knoflach, 2011). Incluso se ha propuesto que estos receptores podrían ser dianas interesantes como ansiolíticos sin efectos hipnóticos (Kopp et al., 2004). La subunidad  $\alpha_3$  del GABA<sub>A</sub>, media la acción de miorrelajación (Crestani et al., 2001), ansiolítica (Atack et al., 2005; Dias et al., 2005) y se relaciona con la antihiperalgnesia (Rudolph and Knoflach, 2011). La subunidad  $\alpha_4$  también está implicada en la regulación de la ansiedad (Gulinello et al., 2001). La subunidad  $\alpha_5$  tiene un papel importante en los efectos en la memoria temporal y los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria que se encuentran en el hipocampo (Collinson et al., 2002; Crestani et al., 2002a; Crestani et al., 2002b; Rudolph and Knoflach, 2011) y se relaciona con el desarrollo de tolerancia a la acción sedante de las benzodiazepinas (van Rijnsoever, Tauber et al., 2004). La subunidad  $\gamma_2$  también está implicada en la regulación de la ansiedad y se ve afectada durante el tratamiento hormonal y el embarazo (Crestani et al., 1999; Essrich et al., 1998). La subunidad  $\delta$  es importante para la modulación neurosteroides (Stell et al., 2003).

### 1.3.2.2.- GABA<sub>B</sub>

En 1980 (Bowery et al., 1980), mostraron la presencia de un nuevo receptor llamado GABA<sub>B</sub> tanto a nivel presináptico como postsináptico. Es un receptor metabotrópico acoplado a proteína G, constituido por 7 hélices transmembrana (Hill et al., 1984). Es un heterodímero constituido por combinaciones de 2 subunidades, GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub> (Bowery et al., 2002), con 2 isoformas de la subunidad GABA<sub>B1</sub>, el GABA<sub>B1a</sub> y el GABA<sub>B1b</sub> (Jacobson et al., 2007). La combinación GABA<sub>B1b</sub>/GABA<sub>B2</sub> media la inhibición postsináptica y la combinación GABA<sub>B1a</sub>/GABA<sub>B2</sub> median la inhibición presináptica. El GABA, los agonistas de los receptores GABA<sub>B</sub> y los antagonistas se unen en la región N-terminal de los receptores GABA<sub>B1b</sub>. Las diferencias espaciales y temporales en la expresión de las subunidades GABA<sub>B1a</sub> y GABA<sub>B1b</sub> sugieren diferentes papeles funcionales. En concreto, las isoformas GABA<sub>B1</sub> contribuyen en los procesos cognitivos (Jacobson et al., 2007). La activación de los receptores GABA<sub>B</sub> provoca relajación de la musculatura lisa, epileptogénesis,

supresión del deseo por las drogas, antinocicepción, deterioro cognitivo e inhibición de la liberación hormonal (Bowery et al., 2002). Finalmente, cabe destacar que los receptores GABA<sub>B</sub> no son modulados por benzodiazepinas, barbituratos o esteroides y no son sensibles a bicuculina (Chebib and Johnston, 1999)

### 1.3.2.3.- GABA<sub>A-ρ</sub>

Existe controversia sobre la diferenciación de este tipo de receptor como GABA<sub>C</sub> y los receptores GABA<sub>A</sub>. El receptor, GABA<sub>A-ρ</sub>, llamado previamente receptor "GABA<sub>C</sub>", es un receptor de canal iónico que está compuesto exclusivamente por unidades  $\rho$  relacionadas con las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> y a pesar de que hay autores (Bormann, 2000; Chebib and Johnston, 1999; Lukasiewicz, 1996) que han argumentado que hay suficientes diferencias en cuanto a estructura, función, genética, farmacología y localización celular entre este receptor y el receptor GABA<sub>A</sub> como para mantener la distinción entre ambos como GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>, el comité de nomenclatura de la IUPHAR, recomendó en 2008 llamar a estos receptores  $\rho$  como una subfamilia de los receptores GABA<sub>A</sub>, (GABA<sub>A-ρ</sub>) (Olsen and Sieghart, 2008). No fue hasta principios de los 90 que se descubrió *in vitro* a partir de RNA de la retina (Polenzani et al., 1991) que el llamado "GABA<sub>C</sub>" era funcional. Posteriormente, este nuevo receptor fue clonado por Cutting y colaboradores (Cutting et al., 1991) llamando a esta nueva subunidad como  $\rho_1$ . Hasta la fecha se conocen 2 isoformas que se expresen en humanos,  $\rho_1$  y  $\rho_2$  (Gavande et al., 2013).

La evidencia que existe hasta la fecha respecto a la amplia distribución de receptores GABA<sub>A-ρ</sub> sugiere que están implicados en más funciones de las que se creía previamente y todavía está por determinar su relevancia fisiológica (Martinez-Delgado et al., 2010). Estarían implicados en numerosos procesos relacionados con el SNC, incluyendo la visión (Enz and Cutting, 1998), el sentido del olfato (Chen et al., 2007), la regulación sueño-vigilia (Arnaud et al., 2001), la memoria y funciones cognitivas (Chebib et al., 2009), la secreción de hormonas (Gamel-Didelon et al., 2003) y la percepción del dolor (Klein and Brennan, 2002). Cabe destacar también que las benzodiazepinas y los barbituratos no modulan los receptores GABA<sub>C</sub> (Chebib and Johnston, 1999).

### 1.3.3.- Efectos farmacológicos

Debido a la elevada complejidad del receptor GABA, las benzodiazepinas presentan un amplio rango de acciones dentro del SNC (Rang and Dale, 2008) que en mayor o menor proporción

abarcan la reducción de la ansiedad a dosis bajas, las acciones hipnóticas que mejoran la calidad del sueño, disminuyendo la latencia de sueño, aumentando la duración del sueño y reduciendo el número de despertares (Korpi et al., 1997), la acción sedante que promueve su uso durante procedimientos quirúrgicos y médicos y la relajación de los músculos periféricos, que conlleva a que se utilicen como relajantes musculares en la espasticidad del músculo esquelético y en tétanos. Debido a todos estos efectos, las benzodiazepinas se utilizan en la práctica clínica principalmente como hipnóticos, sedantes y ansiolíticos (Goodman and Gilman's, 2011b) como terapia en la epilepsia debido a su acción anticonvulsivante (Goodman and Gilman's, 2011c) y en trastornos de pánico (Goodman and Gilman's, 2011a).

Las potenciales reacciones adversas asociadas con el uso de benzodiazepinas incluyen modorra, confusión y entorpecimiento de la coordinación motora, especialmente en personas mayores.

#### **1.3.4.- Efectos de las benzodiazepinas sobre el EEG**

La electroencefalografía consiste en el registro de la actividad cerebral eléctrica y espontánea de manera no invasiva, a través de múltiples electrodos colocados en el cuero cabelludo. La actividad de cada electrodo refleja el sumatorio de la actividad eléctrica sincrónica de miles o millones de neuronas localizadas en el córtex, en áreas cercanas al electrodo. El sistema internacional 10-20 que se desarrolló para estandarizar la posición de los electrodos, designa la posición de los electrodos utilizando el nasion e inion como referencias. Las localizaciones se espacian proporcionalmente (en intervalos de 10-20%) respecto de la distancia entre el nasion y el inion (Jasper, 1958).

La actividad eléctrica espontánea del cerebro fue descubierta por primera vez en 1875 por Richard Caton (Goldensohn, 1997). En 1929, Hans Berger pasó a ser considerado el inventor de la electroencefalografía debido a su trabajo en el que describió la actividad eléctrica espontánea en humanos incluyendo la caracterización de la actividad de las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  (Goldensohn, 1997). Trabajos posteriores (Berger, 1938) con registros electroencefalográficos en humanos en los que observó que los fármacos alteraban la actividad electroencefalográfica fueron esenciales en la evolución de los métodos de electroencefalografía (Leiser et al., 2011). A partir de ese momento se iniciaron estudios sistemáticos de electroencefalografía (Bente and Itil, 1954; Fink, 1959; Goldstein et al., 1963), que permitieron establecer que cada fármaco con propiedades psicotrópicas produce efectos persistentes en el funcionalismo del SNC. Los primeros registros electroencefalográficos en animales se citan en 1971 con los experimentos de Galvani (Piccolino, 1997). La evaluación de los cambios de electroencefalografía cuantitativa tras la administración de un fármaco proporciona una medida de modulación farmacológica, conocida como fármaco-EEG. Una de las ventajas de la fármaco electroencefalografía cuantitativa es la posibilidad de determinar

objetiva y cuantitativamente la biodisponibilidad de un fármaco psicoactivo en su órgano diana, el cerebro humano (Itil and Itil, 1986).

El electroencefalograma (EEG) muestra un espectro de frecuencias de oscilación, que se modulan a través del eje vigilia-sueño. Estos patrones de actividad de EEG espontáneo se observan a lo largo del ciclo circadiano (Leiser et al., 2011). La actividad rítmica del (EEG) se divide en 5 bandas de frecuencia. Las ondas delta (de frecuencia por debajo de 4 Hz) que están presentes en adultos sanos en sueño de ondas lentas, las ondas theta (de 4 a 7 Hz) que aparecen con la modorra o la meditación, las ondas alfa (de 8 a 12 Hz) que se observan con los ojos cerrados y con relajación y se atenúan con los ojos abiertos y con esfuerzo mental, las ondas beta (de 12 a 30 Hz) que se asocian con la actividad, el pensamiento ansioso y la concentración activa y por último las ondas gamma (de 30 a 70 Hz) que se observan durante una actividad mental muy intensa.

Las señales de EEG se describen en términos de poder de la señal eléctrica. El poder absoluto es la cantidad de poder en una banda de frecuencia del EEG en un electrodo dado medido en microvoltios al cuadrado ( $\mu V^2$ ). El poder relativo es el porcentaje de poder contenido en una banda de frecuencia en relación con el poder total a lo largo del espectro entero (Iosifescu, 2011).

Los parámetros del EEG poseen algunas de las características que hacen ideal una medida farmacodinámica se considere ideal. Estas son: ser continua, objetiva, sensible y reproducible. Estas características proporcionan la oportunidad de derivar relaciones concentración-efecto para estos fármacos, y gracias ellas se obtiene información cuantitativa importante de su potencia y eficacia intrínseca (Mandema and Danhof, 1992). Se ha visto que los diferentes fármacos que actúan sobre el SNC provocan cambios en el EEG característicos de su grupo farmacológico tanto en animales (Mandema et al., 1991a; Shin et al., 2011) como en humanos (Bührer et al., 1990a; Bührer et al., 1990b; Claria et al., 2011; Greenblatt et al., 1989a; Koopmans et al., 1988). Los cambios característicos de las benzodiazepinas incluyen principalmente: un aumento en la actividad  $\beta$ , una disminución en la actividad  $\alpha$ , que son los parámetros del EEG más sensibles (Mandema et al., 1991b). También se ha observado que concentraciones elevadas de estos fármacos hay un aumento en la actividad  $\delta$  (Mandema et al., 1991b). Esto sugiere que el cambio en la actividad  $\delta$  refleja la acción hipnótica de las benzodiazepinas, mientras que los cambios en la actividad  $\alpha$  y  $\beta$  puede reflejar el perfil anticonvulsivante, ansiolítico y sedante de estos fármacos (Mandema and Danhof, 1992). Desde hace ya algunos años, en numerosos estudios se ha utilizado el aumento en la actividad  $\beta$  para caracterizar la relación concentración-efecto de varias benzodiazepinas tanto en animales (Mandema et al., 1992b; Mandema et al., 1991a; Mandema et al., 1991b, 1992d; Tuk et al., 1999) como en el hombre (Breimer et al., 1990; Ciraulo et al., 1997; Dingemans et al., 1997a; Dingemans et al., 1997b; Friedman et al., 1992; Greenblatt et al., 1983; Greenblatt et al., 1989a; Greenblatt et al., 1994; Hardmeier et al., 2012; Knoester et al., 2002; Laurijssens and Greenblatt, 1996; Lindhardt et al., 2001). De estos estudios se desprende que el cambio en la actividad  $\beta$  del EEG constituye una medida relevante de la intensidad del

efecto farmacológico que refleja la afinidad y eficacia intrínseca de las benzodiazepinas por el receptor GABA<sub>A</sub> (Mandema and Danhof, 1992).

### 1.3.5.- EEG como biomarcador

Las definiciones de biomarcador, respuesta clínica y respuesta subrogada se formalizaron por el grupo de trabajo de definiciones de biomarcadores (Biomarkers Definitions Working Group) dentro del contexto del descubrimiento de fármacos (Atkinson et al., 2001; Biomarkers Definitions, 2001; Kuhlmann, 2007). Un biomarcador es un índice objetivo de respuesta farmacológica o proceso biológico que es cuantificable, preciso y reproducible. Dicho biomarcador se puede utilizar para diagnosticar o evaluar el estadio en el progreso de una enfermedad o para predecir la respuesta clínica a un tratamiento (Kuhlmann and Wensing, 2006).

Cuando se utiliza como sustituto de una respuesta clínica, un biomarcador se puede elevar al estado de respuesta subrogada (Leiser et al., 2011). Existe un gran variedad de biomarcadores, desde marcadores de laboratorio (genéticos, neurotransmisores, hormonas, enzimas, neuropéptidos, citoquinas), marcadores electrofisiológicos (EEG, potenciales evocados, encefalografía magnética, electrocardiograma (ECG), electromiografía facial, conductancia de la piel) hasta técnicas de imagen (tomografía craneal computarizada, resonancia magnética, resonancia magnética funcional, espectroscopía por resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones, tomografía computada por emisión de fotón único) (Wiedemann, 2011).

En la última década, la metodología de la electroencefalografía ha emergido en programas de investigación preclínica y clínica en compañías farmacéuticas como una herramienta útil para el cribado y desarrollo de nuevas terapias ya que posee el potencial para predecir el impacto de los compuestos en desarrollo en los endofenotipos asociados con el progreso de la enfermedad (Leiser et al., 2011). En los programas de desarrollo de fármacos, las medidas de EEG se utilizan para conocer los cambios característicos de algunas patologías, aportar evidencia de la penetración de los fármacos en SNC y para determinar las propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas de los compuestos experimentales. En este sentido, se ha demostrado que existe una relación entre las concentraciones plasmáticas de fármacos que actúan a nivel de SNC y sus efectos en el EEG (Valle et al., 2002). Las características de la actividad cortical, obtenida a través de la electroencefalografía permiten diseñar una estrategia sobre biomarcadores con potencial para ser ampliamente utilizado en múltiples enfermedades del SNC como depresión (Baskaran et al., 2012; Coburn et al., 2006; Steiger and Kimura, 2010), Alzheimer (Jackson and Snyder, 2008; Jeong, 2004), esquizofrenia (Javitt et al., 2008; Micheloyannis et al., 2006; Uhlhaas et al., 2008), trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Snyder and Hall, 2006), dolor (Leiser et al., 2011) y autismo (Murias et al., 2007). En humanos, el análisis de la actividad oscilatoria de alta frecuencia, como las bandas  $\beta$  y  $\alpha$  del EEG puede

proporcionar evidencia funcional para los circuitos neuronales en un cerebro normal y enfermo (Mohler, 2007). Tradicionalmente, en los estudios con benzodiazepinas y antipsicóticos en voluntarios sanos se han utilizado numerosos test y diferentes medidas objetivas y subjetivas para evaluar sus efectos que han resultado ser excesivos y con una baja sensibilidad y reproducibilidad (de Visser et al., 2001). El uso de la electroencefalografía como biomarcador farmacodinámico de la actividad benzodiazepínica es probablemente su aplicación mejor estudiada en farmacología clínica. Concretamente, para la banda  $\beta$  del EEG, existen numerosas investigaciones que han demostrado que las benzodiazepinas con actividad ansiolítica y sedante provocan un aumento robusto de la actividad en esta banda del EEG tanto en modelos animales (Coenen and van Luijtelaar, 1991; Jongsma et al., 2000; van Lier et al., 2004) como en humanos (Gilles and Luthringer, 2007; Saletu et al., 2006). Así, la elevación de la banda  $\beta$  del EEG (11.5 Hz-30 Hz), fue propuesta como un biomarcador cuantitativo validado para la modulación del receptor GABA<sub>A</sub> útil para el modelado FC/FD (Visser et al., 2003). Recientemente, se han publicado datos prometedores (Christian et al., 2015) acerca del uso del EEG como biomarcador clínico traslacional y no invasivo para facilitar el desarrollo de fármacos selectivos del receptor GABA<sub>A $\alpha$ 2,3</sub> con actividad ansiolítica.

### 1.3.6.- Clasificación de las benzodiazepinas

En función de su duración de acción, las benzodiazepinas se clasifican en 4 categorías (Flórez, 2003; Rang and Dale, 2008):

- Benzodiazepinas de acción ultracorta (entre 4 y 6 horas): triazolam, midazolam, zolpidem.
- Benzodiazepinas de acción corta (entre 12 y 18 horas): lorazepam, oxazepam, temazepam y lormetazepam.
- Benzodiazepinas de acción intermedia (24 horas): alprazolam y nitrazepam
- Benzodiazepinas de acción larga (entre 24 y 48 horas): diazepam, clordiazepóxido, flurazepam y clonazepam.

## 2.- DIAZEPAM

### 2.1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Diazepam (DZ), es un fármaco perteneciente al grupo de las benzodiazepinas, con código ATC N05BA01. Dentro del grupo de benzodiazepinas de acción larga es el más ampliamente prescrito en España, según datos de la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios del año 2014 (AEMPS, 2014). Su fórmula molecular es  $C_{16}H_{13}ClN_2O$  (7-Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona), y su peso molecular de 284.7. Es un polvo cristalino casi blanco o blanco, muy poco soluble en agua (1 parte en 333 partes), soluble en alcohol (1 en 16 partes), en cloroformo (1 en 2 partes) y en éter (1 en 39 partes) que es necesario proteger de la luz (Sweetman, 2009). Es una base débil con un  $pK_a$  de 3.4 (Pharmacists, 2000) que posee un núcleo común a todas las benzodiazepinas, el anillo benzodiazepínico, y presenta un N en posición 1 y 4, un Cl en posición 7 y un  $CH_3$  en posición 1 (Flórez, 2003). Su estructura química viene representada en la Figura 3.



Figura 3: Estructura química de DZ

### 2.2.- FARMACOCINÉTICA

Aunque en tras la administración de DZ a dosis de 10 y 20 mg por vía endovenosa, en forma de bolus, en el primer estudio del que tenemos conocimiento, no se observó un aumento lineal en los niveles plasmáticos pasados 15 minutos (Hillestad et al., 1974), estudios posteriores mostraron que tras dosis orales múltiples de DZ su perfil de concentraciones plasmáticas se puede describir correctamente en términos de linealidad en la absorción y disposición a dosis de entre 2 y 30 mg (Eatman et al., 1977; Rutherford et al., 1978). Un estudio algo posterior donde se administró por vía endovenosa en sólo dos pacientes dosis que oscilaron entre 60 a 240 mg / día tampoco detectó no linealidades (Ochs et al., 1982a)

### 2.2.1.- Absorción

Tras la administración de DZ por vía oral, su inicio de absorción es rápido (el tiempo de latencia es de 12 min tras la ingesta de comprimidos) y su biodisponibilidad cercana al 100% (Ochs et al., 1982b). Su cinética de absorción sigue un proceso de primer orden tras su administración por vía oral (Ochs et al., 1982b). A dosis de 10 mg por vía oral, el máximo de concentraciones plasmáticas promedio ( $C_{max}$ ) oscila entre los 317 y 406 ng/mL y se alcanza a un  $t_{max}$  entre 53 y 90 min (Friedman et al., 1992; Greenblatt et al., 1989c; Locniskar et al., 1989; Troy et al., 1995).

La biodisponibilidad de DZ no se ve afectada por la edad, el sexo o por gastrectomía (Ochs et al., 1982b). Sin embargo, Yamazaki y colaboradores (Yamazaki et al., 2007), hallaron un retraso en  $t_{max}$  de DZ tras una dosis única administrada con comida ligera.

### 2.2.2.- Distribución

DZ presenta un coeficiente de partición *in vitro* octanol-fosfato buffer acuoso de 309 (Arendt et al., 1983). Se distribuye en varios tejidos corporales: tejido adiposo, piel, músculo, abdomen, estómago, riñones, hígado, corazón, cerebro, pulmones y testículos (Gueorguieva et al., 2004a). En el hombre, DZ presenta una fracción libre en plasma de 0.032 y el ratio sangre/concentración plasmática es de 1.04, igual que en rata (Naritomi et al., 2001) y el de plasma/sangre es de 1.67 (Jones and Larsson, 2004).

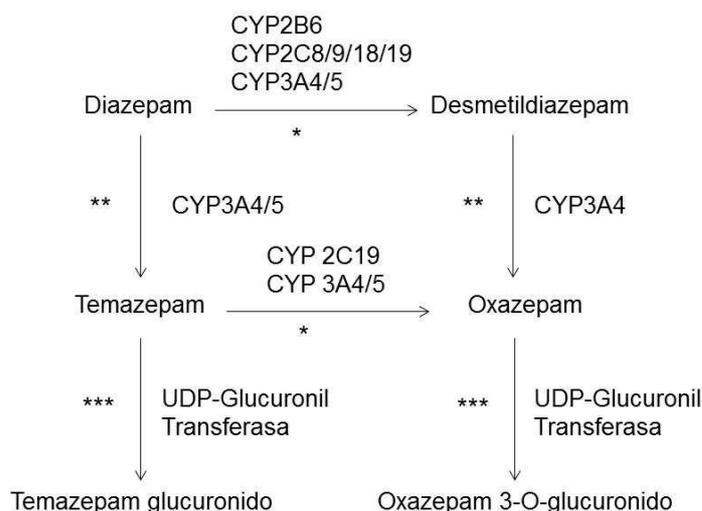
Tras la administración de 10 y 20 mg de DZ por vía endovenosa u oral en forma de comprimidos, el Vd oscila entre los 0.49 L/Kg y 1.4 L/kg (Abernethy and Greenblatt, 1981; Bertilsson et al., 1989; Greenblatt et al., 1988; Greenblatt et al., 1989a; Greenblatt et al., 1989c; Greenblatt et al., 1980b; Herman and Wilkinson, 1996; Klotz et al., 1976a, b; Troy et al., 1995; Zhang et al., 1990) no habiendo diferencias entre los valores encontrados entre ambas vías de administración. El Vss tras administración endovenosa de DZ en dosis única oscila entre 0.89 (Klotz et al., 1976b) y 0.95 L/Kg (Klotz et al., 1976a) y es de 0.91 L/Kg tras administración como dosis única diaria durante 7 días (Klotz et al., 1976a). El volumen de distribución de diazepam aumenta con la edad (1.3 L/kg en jóvenes vs 2.2 L/kg en mayores) (Divoll et al., 1983; Greenblatt et al., 1980a) y con la obesidad (70 L en normopesos vs 228 L en población obesa) (Abernethy et al., 1983).

En humanos, DZ se une a proteínas plasmáticas en una elevada proporción, entre 96 a 99.7% (Greenblatt, 1987; Greenblatt et al., 1980a; Klotz et al., 1976b; Klotz et al., 1975; Obach, 2013; van der Kleijn et al., 1971), siendo el porcentaje de fracción libre independiente de la cantidad total de fármaco presente (Mandelli et al., 1978). Se ha descrito sin embargo un incremento en la fracción libre en plasma de DZ en pacientes con la función renal alterada posiblemente debido a una menor concentración de albúmina plasmática (Viani et al., 1992).

Existe un número elevado de autores que han descrito la disposición de DZ tras su administración por vía oral y/o intravenosa en términos bicompartimentales (Abernethy and Greenblatt, 1981; Eatman et al., 1977; Ghoneim et al., 1981; Klotz et al., 1976a, b; Klotz et al., 1975; Klotz and Reimann, 1981; Mould et al., 1995) y tricompartmentales (Abernethy and Greenblatt, 1981; Ghoneim et al., 1981; Kaplan et al., 1973). En los estudios en los que se emplean modelos de 2 compartimentos, el perfil de disposición de DZ se describe como una fase rápida de distribución de 0.63-1.1 h (Ghoneim et al., 1981; Klotz et al., 1976a, b; Klotz et al., 1975; Klotz and Reimann, 1981) (Klotz et al., 1976b), y una fase más lenta de eliminación de 29-46.6 h (Ghoneim et al., 1981; Klotz et al., 1976a, b; Klotz et al., 1975; Klotz and Reimann, 1981). Otros autores (Ghoneim et al., 1981; Kaplan et al., 1973) propusieron un tercer compartimento de distribución profundo, encontrando valores para las fases rápida, lenta y más lenta de distribución de 0.15-0.3, 2.21-3.23 y 31.2-37.3 h respectivamente.

### 2.2.3.- Metabolismo

Diazepam se metaboliza principalmente por enzimas hepáticos, eliminándose en orina en forma de metabolitos libres o conjugados (Greenblatt et al., 1988). Estudios en hígado humano han mostrado (Figura 4) que las 2 vías principales de biotransformación de DZ son la formación de N-desmetildiazepam (DMDZ) y de 3-hidroxdiazepam (temazepam) (Greenblatt et al., 1980a; Jack and Colburn, 1983), que se catalizan a través de diferentes isoformas de CYP (Inaba et al., 1988). Estudios con diferentes isoformas de CYP indicaron que la formación de temazepam se realiza por C3-hidroxlación de DZ, principalmente a través de CYP3A4/5 (Galetin et al., 2004; Yang et al., 1999), mientras que la formación de DMDZ se realiza principalmente por N1-desmetilación parcialmente por CYP3A4 y S-mefenitoína 4'-hidroxilasa (CYP2C19) (Andersson et al., 1994; Inaba et al., 1988) aunque también participan el CYP2B6 y la subfamilia CYP2C (Ono et al., 1996; Yang et al., 1998; Yasumori et al., 1993) siendo la N1-desmetilación la principal vía de metabolización in vivo tras dosis terapéuticas de DZ (Yasumori et al., 1994).



**Figura 4:** Metabolismo de DZ y DMDZ. \*reacción de oxidación (desmetilación), \*\*reacción de oxidación (hidroxilación) y \*\*\*reacción de glucuronoconjugación.

El hecho de que en la formación del DMDZ estén involucradas dos o más enzimas provoca que la cinética de la reacción de formación de DMDZ resulte compleja y difícil de interpretar (Andersson et al., 1994). En términos porcentuales, se ha descrito que la formación de DMDZ representa de un 50 a un 60% del aclaramiento total de DZ (Bertilsson et al., 1989; Dasberg, 1975; Greenblatt et al., 1988; Jack et al., 1983). No viéndose alterado este porcentaje en voluntarios sanos metabolizadores rápidos y lentos de mefenitoína (marcador de la actividad del isoenzima CYP2C19) (Bertilsson et al., 1989) (Kosuge et al., 2001). Todo ello a pesar de que la velocidad de eliminación de DZ es diferente entre individuos lentos y rápidos para el CYP2C19 (Bertilsson et al., 1989; Qin et al., 1999; Sohn et al., 1992). En este sentido, se ha observado que *in vitro* el aclaramiento de DZ a DMDZ es menor y la  $t_{1/2}$  mayor en metabolizadores lentos de CYP2C19 que en los rápidos (Andersson et al., 1990; Bertilsson et al., 1989).

## 2.2.4.- Eliminación

DZ se excreta en orina, mayoritariamente en forma de glucurónido o sulfato (Mandelli et al., 1978). DZ posee una semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) promedio muy larga de 30 h con un rango de 20 a 100 h (Abernethy and Greenblatt, 1981; Agarwal et al., 2013; Bertilsson et al., 1989; Greenblatt et al., 1989c; Herman and Wilkinson, 1996; Ivaturi et al., 2009; Klotz et al., 1976b; Klotz et al., 1977; Mandelli et al., 1978; Zhang et al., 1990). Tras administrar dosis iv de 5 mg y 10 mg de DZ a voluntarios con un rango de edad entre 62 y 78 años (Divoll et al., 1983; Greenblatt et al., 1980a), la  $t_{1/2}$  se alarga respecto a la observada en voluntarios sanos jóvenes (39 h en jóvenes vs 99 h en mayores). En pacientes obesos, la  $t_{1/2}$  de DZ también se prolonga de las 32 h a las 82 h (Abernethy et al. 1983).

El CI plasmático de DZ oscila entre los 0.014 y 0.035 L/min (Abernethy and Greenblatt, 1981; Bertilsson et al., 1989; Divoll et al., 1983; Greenblatt et al., 1988; Greenblatt et al., 1989a; Greenblatt et al., 1989c; Herman and Wilkinson, 1996; Igari et al., 1983; Klotz et al., 1976a, b; Klotz et al., 1975; Zhang et al., 1990).

Tras administrar dosis iv de 5 mg y 10 mg de DZ a voluntarios con un rango de edad entre 62 y 78 años (Divoll et al., 1983; Greenblatt et al., 1980a), el CI se reduce respecto del observado en voluntarios sanos jóvenes (0.40 mL/min/kg en jóvenes vs 0.26 mL/min/kg en mayores).

Se ha estudiado la excreción biliar de DZ, pero los resultados obtenidos son controvertidos. Mientras algunos autores (Klotz et al., 1976a; Klotz et al., 1975; Mahon et al., 1976), no evidencian circulación enterohepática, y por tanto no se excretaría vía biliar, Sellman et al. (Sellman et al., 1975) en un estudio con pacientes con cirugía biliar, concluyeron que DZ, pero no DMDZ sufría circulación enterohepática.

Se han realizado estudios con dosis múltiples y tratamiento a largo plazo con DZ que sugieren una mayor  $t_{1/2}$  de eliminación y menor variabilidad interindividual respecto de la administración a dosis únicas. Las variaciones, se han relacionado con la acumulación del metabolito activo DMDZ, que podría tener una influencia inhibitoria en la velocidad de metabolización de DZ (Klotz et al., 1976a). Contrariamente, Kanto y colaboradores (Kanto et al., 1974) vieron una disminución de los niveles de DZ y DMDZ en estado estacionario durante un tratamiento continuado de 1 a 6 semanas, sugiriendo un fenómeno de autoinducción y previamente Zingales y colaboradores (Zingales, 1973) habían descrito niveles inferiores de DZ tras dosis múltiple, que explicaron como consecuencia de una posible acumulación de DZ y DMDZ en eritrocitos tras 11 semanas o más de terapia.

La eliminación de DZ puede verse afectada por factores intrínsecos como la edad, el tipo de metabolizador para debrisoquina y mefenitoína (ver apartado 2.2.3, metabolismo) y la raza (Zhang et al., 1990). Con respecto a la edad, se ha descrito un aumento de la  $t_{1/2}$  de eliminación en función de la edad. Klotz y colaboradores (Klotz et al., 1975) describieron un incremento lineal en voluntarios sanos de 20 a 80 años, pasando de 20 h a 90 h respectivamente y otros autores (Herman and Wilkinson, 1996) detectaron un incremento de la  $t_{1/2}$  y el Vd en adultos de 60 a 75 años y jóvenes de 20 a 30 años (71.5 vs 44.5 h y 1.39 vs 0.88 L/kg, respectivamente). El CI no difirió entre ambos grupos (0.26 vs 0.29 ml/min/kg), lo que indica que la causa para el incremento de la semivida de eliminación es la variación en el Vd. Las diferencias étnicas entre orientales y caucásicos relacionadas con la diferente incidencia de metabolizadores lentos de la hidroxilación de mefenitoína es la responsable de que la raza pueda actuar como un factor modificador de la eliminación de DZ (Bertilsson et al., 1989; Zhang et al., 1990). El aclaramiento de DZ disminuye en pacientes con cirrosis hepática (Ochs et al., 1983) aunque la función renal no afecta al CI de DZ (Ochs et al., 1981).

## 2.3.- FARMACODINAMIA

### 2.3.1.- Mecanismo de acción de DZ

DZ es un modulador alostérico positivo que ejerce su acción a través del GABA<sub>A</sub>, interaccionando principalmente con las subunidades  $\alpha_x\beta_2\gamma_2$ ,  $x = 1,2,3,5$  (Low et al., 2000; Mohler et al., 2005). La interacción de DZ con las diferentes subunidades provoca las acciones mencionadas en el apartado 1.3.2.1.

La afinidad de DZ por el receptor GABA en estudios realizados *in vitro* oscila entre 5.0 nM (Nakatsuka et al., 1985), 9.3 nM (Dorow et al., 1982), 9.6 nM (Greenblatt, 1987), 9.8 nM (Obach, 2013) y 59 nM (Kemp, 1987). En los dos estudios en los que además se determina la afinidad de DMDZ esta varía entre 5.4 nM (Nakatsuka et al., 1985) y 13 nM (Dorow et al., 1982). En un estudio llevado a cabo en ratas entrenadas para discriminar el efecto de diazepam y salino, (Young et al., 1986), concluyeron que DMDZ es la mitad de potente que DZ ( $DE_{50} = 2.33$  mg/kg vs. 1.16 mg/kg, respectivamente). Sin embargo, un posterior estudio en que se evaluó la potencia relativa de DMDZ con respecto a DZ en el efecto hipnótico en ratas muestra una potencia relativa inversa de 3:2 (Klockowski and Levy, 1988).

En estudios *in vitro/in vivo*, los parámetros farmacodinámicos estimados en un modelo FC/FD basado en el mecanismo de acción de benzodiazepinas para el poder absoluto beta de diazepam en rata son,  $\alpha = 10.6$   $\mu$ V (actividad intrínseca) y  $EC_{50} = 373$  ng/mL (potencia, expresada como concentración que produce el 50% del máximo efecto) (Visser et al., 2003). La constante de afinidad calculada a partir de datos *in vitro* es de  $k_i = 15.0$  ng/mL, mientras que la estimada por el modelo *in vivo* es de  $k_{PD} = 75.1$  ng/mL (Visser et al., 2003).

### 2.3.2.- Indicaciones terapéuticas y posología

DZ está aprobado para el tratamiento de la ansiedad, privación alcohólica, dolor músculo-esquelético y para los trastornos convulsivos (AEMPS, 2013; Sweetman, 2009), aunque también se utiliza “fuera de indicación” para el insomnio, síndrome de piernas inquietas y sedación pre y post quirúrgica (Calcaterra and Barrow, 2014).

La posología varía en función de la indicación (AEMPS, 2013; McEvoy, 2000; Sweetman, 2009) y debido a sus propiedades, se utiliza como ansiolítico, a dosis entre 2 y 4 mg, habitualmente por vía oral, de 2 a 4 veces al día, con un máximo de 30 mg/día, para la supresión sintomática de la ansiedad, la agitación y la tensión psíquica. También como premedicación antes de la anestesia general por su acción miorrelajante, a dosis orales entre 5 y 20 mg, o dosis iv de 100 a 200  $\mu$ g/kg,

o para la práctica de algunas intervenciones que requieren una sedación consciente, por su acción sedante, a dosis de 10 a 20 mg, vía iv en bolus de 2 a 4 min. Se emplea también como hipnótico, a dosis orales de 5 a 15 mg al acostarse, como anticonvulsivante, a dosis de 2 a 60 mg al día principalmente por vía oral como adyuvante en algunos tipos de epilepsia y en las convulsiones febriles y como antiespasmódico, a dosis entre 2 y 15 mg por vía oral repartidas a lo largo del día, para aliviar el dolor músculo-esquelético y para combatir la espasticidad originada por afecciones como parálisis cerebral, paraplejía, atetosis y síndrome de rigidez generalizada. Por último, se puede usar como tratamiento para aliviar la agitación aguda, el temblor y las alucinaciones en pacientes con privación alcohólica, a dosis por vía oral de 10 mg de 3 a 4 veces al día durante las primeras 24 h, seguido de 5 mg 3 o 4 veces al día según necesidad. En caso de agravamiento de los síntomas o de desarrollar delirium tremens, se pueden utilizar dosis de 10 a 20 mg vía im o iv, aunque algunos pacientes pueden necesitar dosis superiores.

### 2.3.3.- Reacciones adversas

Las reacciones adversas que puede provocar DZ son numerosas y afectan diferentes órganos. En el presente trabajo, se mencionan aquellas relacionadas con nuestro estudio. Las principales reacciones adversas de las benzodiazepinas ocurren sobre el SNC. Los más frecuentes son la somnolencia, la fatiga y la debilidad muscular, que se producen mayoritariamente al inicio del tratamiento y generalmente desaparecen con la administración continuada (AEMPS, 2013; Flórez, 2003). Otras reacciones adversas menos frecuentes que afectan el sistema nervioso son la confusión, mareos, sedación, amnesia, ataxia, disartria, pronunciación alterada del habla, cefalea, temblor y la dificultad en la coordinación, hecho que afecta considerablemente las habilidades manuales y entre ellas, la capacidad de conducción (AEMPS, 2013; Flórez, 2003; Rang and Dale, 2008). Estos efectos sobre el SNC se producen como consecuencia directa de la unión sobre el receptor GABA benzodiazepínico, ya que su unión potencia de forma selectiva los efectos del GABA (principal neurotransmisor inhibitor del encéfalo) en los receptores GABA<sub>A</sub> y en consecuencia reduce la excitabilidad de las neuronas y provoca un efecto calmante en el cerebro. La interacción con diferentes subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> provoca diferentes efectos (ver sección 1.3.2.1). A dosis bajas, la interacción de DZ con la subunidad  $\alpha 2$  provocaría el efecto ansiolítico, mientras que a dosis altas, mayoritariamente esta interacción con la subunidad  $\alpha 2$  mediaría el efecto de relajación muscular y en menor proporción por la interacción con la subunidad  $\alpha 3$  (Crestani et al., 2001). A altas dosis, se podrían observar sedación y amnesia anterógrada que estarían mediadas por la subunidad  $\alpha 1$  (van Rijnsoever et al., 2004). También debido a su actividad anticolinérgica, podría provocar midriasis y exacerbación del glaucoma de ángulo estrecho (Hoffman and Bresler, 1982), efectos músculo-esqueléticos. De forma muy rara se ha descrito algún caso de potenciación de rabdomiolisis en pacientes hiponatémicos (Fernandez-Real et al., 1994). De manera poco frecuente, se han descrito rash y urticaria, sudoración e irritación local tras administración rectal. Se han descrito casos raros de dermatitis de contacto,

necrólisis epidérmica tóxica y síndrome de Steven-Johnson, y ocasionalmente alteraciones gastrointestinales y cambios en la salivación.

Tolerancia y abstinencia: La tolerancia a un fármaco se define como el proceso por el cual los efectos de la misma dosis de un fármaco disminuyen con la administración repetida del mismo, ocasionando la necesidad de incrementar la dosis para experimentar el mismo efecto (Hutchinson et al., 1996). La tolerancia requiere la interacción con las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_5$  (van Rijnsoever et al., 2004). Se ha descrito tolerancia aguda a los efectos psicomotores de DZ (Ellinwood et al., 1985; Ellinwood et al., 1983; Ellinwood et al., 1987). Sin embargo existe controversia sobre el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos de DZ se ha mostrado de manera inconsistente y cuando se ha detectado, parece que ocurre en menor velocidad y magnitud que la tolerancia al efecto sedante (Bateson, 2002; Voshaar et al., 2005). Por otro lado, la interrupción del tratamiento con DZ después de semanas o meses conlleva un aumento de los síntomas de ansiedad, que van acompañados de temblor y mareos (Rang and Dale, 2008). Para prevenir el fenómeno de retirada en la prescripción crónica, las dosis se deben disminuir lentamente hasta su completa discontinuación (Allison and Pratt, 2003; Ashton, 1994).

### 3.- DESMETILDIAZEPAM (DMDZ)

#### 3.1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Desmetildiazepam (DMDZ), es un fármaco que se forma a partir de la desmetilación de DZ, como se ha comentado anteriormente. También se forma a partir del metabolismo de otras benzodiazepinas como clorazepato, prazepam, pinazepam (Abruzzo et al., 1977; Flórez, 2003; Pacifici et al., 1982; Smith et al., 1979), clazepam (Giudicelli et al., 1978) y fosazepam (Breimer et al., 1980) y a partir del metabolismo intermedio de otras benzodiazepinas como clordiazepóxido, medazepam y ketazolam (Flórez, 2003).

Presenta la misma estructura que DZ, común a todas las benzodiazepinas, pero sin el grupo CH<sub>3</sub> en posición 1, que se pierde por desmetilación (Flórez, 2003). Su estructura viene representada en la Figura 3 y su código ACT es N05BA16. Es una base débil con un pK<sub>a</sub> de 3.5 y PM de 270.71.

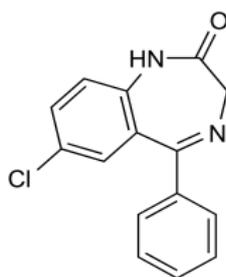


Figura 5: Estructura química de DMDZ.

#### 3.2.- FARMACOCINÉTICA

##### 3.2.1.- Absorción

Tras la administración de DMDZ por vía oral en forma de gotas y comprimidos a voluntarios sanos de ambos sexos, a dosis de 5 y 10 mg, se observó que la biodisponibilidad (F) fue independiente de la dosis de DMDZ administrada (Yeates et al., 1986), alcanzando un 99% (Greenblatt et al., 1988). Tras la administración a voluntarios sanos de 10 mg de DMDZ por vía oral en forma de comprimidos o de gotas orales se obtuvo una C<sub>max</sub> promedio muy similar para ambas administraciones de entre 213 y 222 ng/ml a un t<sub>max</sub> de aproximadamente 2 h y una semivida de absorción más rápida (10 min) tras gotas orales que tras comprimidos (31 min), no hallándose diferencias en la absorción en función del sexo (Yeates et al., 1986).

### 3.2.2.- Distribución

DMDZ es menos lipófilo que DZ, y esto se refleja en el coeficiente de partición *in vitro* octanol-fosfato buffer acuoso, que es de 54 (Arendt et al., 1983). En el hombre, el ratio plasma/sangre es de 1.60 (Jones and Larsson, 2004). No existen datos sobre el ratio de distribución cerebro/plasma en humanos, sin embargo en rata, DMDZ se distribuye con un ratio cerebro/plasma total de 3.14 (Arendt et al., 1987) y con un ratio cerebro/plasma libre de 22.18 (Arendt et al., 1987).

En humanos, DMDZ se une a proteínas plasmáticas entre 96.4%-97.1% (Greenblatt, 1987; Klotz et al., 1976b; Nau et al., 1984; Obach, 2013).

Tras la administración de DMDZ por vía oral en forma de comprimidos o gotas orales, a voluntarios sanos, el V/F promedio oscila entre 54 y 65 L (Bertilsson et al., 1989; Yeates et al., 1986). En un estudio llevado a cabo en voluntarios mayores (edad promedio de 62 años) se ha descrito un volumen de distribución mayor (90L) (Greenblatt et al., 1988). También se ha visto un aumento del volumen de distribución en obesos respecto normopesos (151 L vs 73 L) (Abernethy et al., 1983).

### 3.2.3.- Metabolismo

En humanos se ha observado que DMDZ se metaboliza (Figura 4) principalmente por 3-hidroxilación a oxazepam a través del CYP3A4 (Klotz et al., 1977; Klotz and Muller-Seydlitz, 1979; St-Pierre and Pang, 1993b; Yang et al., 1998). Oxazepam se elimina como oxazepam glucurónico mediante UDP-glucuroniltransferasas (UTP) (Court et al., 2002). El polimorfismo genético del CYP2C19 afecta a la velocidad de metabolismo de DMDZ (Bertilsson et al., 1989; Qin et al., 1999), los metabolizadores lentos tienen menor Cl (5.0 mL/min vs 11.0 mL/min) y mayor  $t_{1/2}$  (127 h vs 59 h) (Bertilsson et al., 1989).

### 3.2.4.- Eliminación

La semivida de eliminación de DMDZ oscila entre los 2 y 4 días (Greenblatt et al., 1988; Klotz et al., 1977; Yeates et al., 1986). Este valor es mayor que el descrito para DZ como consecuencia de que el Cl/F es menor (9.8 mL/min para DMDZ vs 23.1 mL/min para DZ) (Bertilsson et al., 1989). Aunque Yeates y colaboradores encontraron que el CL de DMDZ estaba disminuido en mujeres respecto a los hombres (18.4 vs 18.32 mL/min respectivamente), no pudieron concluir si las

diferencias eran realmente debidas al sexo o a una posible interacción con anticonceptivos orales (Yeates et al., 1986). La obesidad alarga la  $t_{1/2}$  (130 h vs 56 h) (Abernethy et al., 1983).

La tasa de extracción hepática para DMDZ es de aproximadamente 0.3 (St-Pierre and Pang, 1993a).

### **3.3.- FARMACODINAMIA**

#### **3.3.1.- Mecanismo de acción de DMDZ**

DMDZ es un fármaco agonista benzodiazepínico que ejerce su acción a través del receptor GABA<sub>A</sub> (ANSM, 2013a, b). La interacción de DMDZ con las diferentes subunidades provoca las acciones mencionadas en el apartado 1.3.2.1. Su afinidad por el receptor GABA en estudios realizados *in vitro* oscila entre 5.4 nM (Nakatsuka et al., 1985) y 13 nM (Dorow et al., 1982).

#### **3.3.2.- Indicaciones terapéuticas y posología**

DMDZ es una benzodiazepina de larga duración cuyo efecto más importante es el ansiolítico (ANSM, 2013a, b; Sweetman, 2009), aunque al ser un derivado de DZ también presenta propiedades miorelajantes, sedantes, hipnóticas y anticonvulsivantes. DMDZ está indicado principalmente como ansiolítico, a dosis orales de 7.5 a 15 mg al día (ANSM, 2013a, b; Sweetman, 2009).

#### **3.3.3.- Reacciones adversas**

La reacción adversa más frecuente es la somnolencia, menos frecuente es la hipotonía muscular y raramente aparecen erupción cutánea, prurito, ataxia, vértigo, confusión mental y amnesia anterógrada (ANSM, 2013a, b; Vidal, 2012).

## **4.- MODELIZACION FARMACOCINETICA / FARMACODINAMICA POBLACIONAL**

### **4.1.- RELACIONES FARMACOCINÉTICAS/FARMACODINÁMICAS**

La farmacocinética describe el curso temporal de la concentración de fármaco tras la administración de un fármaco y la farmacodinamia describe el efecto observado a partir de ciertas concentraciones de fármaco. El modelado farmacocinético/farmacodinámico (FC/FD) poblacional construye un puente entre estas dos disciplinas básicas de la farmacología con el propósito de establecer y evaluar las relaciones entre dosis-concentración-respuesta para poder describir y predecir el curso del efecto a lo largo del tiempo tras la administración de fármaco (Meibohm and Derendorf, 1997). Esta aproximación ofrece la ventaja de poder cuantificar la variabilidad tanto intra como interindividual que tienen los datos y estudiar la influencia de las diferentes covariables en los parámetros farmacocinéticos y/o farmacodinámicos (Bellissant et al., 1998).

Actualmente, diferentes entidades reguladoras consideran interesante el uso del modelado y simulación de datos clínicos (farmacocinéticos, farmacodinámicos y criterios de valoración clínicos) durante el desarrollo de un fármaco, ya que se ha visto que es una herramienta útil para interpretar de una manera más eficiente los datos de que se dispone y para la extrapolación de conocimiento a toda la población objeto de estudio (Jonsson et al., 2012).

### **4.2.- MODELOS FARMACOCINÉTICOS**

El curso temporal de las concentraciones plasmáticas de un fármaco viene determinado por los procesos farmacocinéticos de distribución, metabolismo y excreción, así como de absorción en caso de una administración extravascular. Para describir el comportamiento cinético de un compuesto se pueden utilizar diferentes modelos compartimentales, que se caracterizan por asumir que el organismo está formado por uno o varios compartimentos, en los que los fluidos, tejidos y órganos que los constituyen poseen la característica de que la velocidad de entrada y salida del fármaco es la misma y en los que la distribución es homogénea e instantánea (Derendorf and Meibohm, 1999; Holford and Sheiner, 1981a).

### 4.2.1.- Modelo de un compartimento

Este modelo se caracteriza por considerar al organismo como un compartimento único, fundamentalmente acuoso, en el que el fármaco se distribuye instantáneamente tras su administración. Si la administración es un bolus intravenoso, la ecuación matemática que describe el modelo es:

$$\frac{dA_1}{dt} = -\frac{Cl}{V} \cdot A_1 \quad (1)$$

donde  $A_1$  es la cantidad de fármaco en el organismo,  $Cl$  es el aclaramiento y  $V$  el volumen de distribución.

### 4.2.2.- Modelo de dos compartimentos

Intenta reflejar que la distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo, sino que hay un compartimento que corresponde a los tejidos donde se alcanza un rápido equilibrio en la distribución del fármaco ("compartimento central") y otro que corresponde a los tejidos menos irrigados en el cual el equilibrio en la distribución precisa de más tiempo ("compartimento periférico").

### 4.2.3.- Modelos de tres o más compartimentos

Describen la cinética del fármaco en el organismo teniendo en cuenta que este se distribuye en un compartimento central y diferentes compartimentos que se corresponden con tejidos peor irrigados y a los que el fármaco tarda más en acceder.

## 4.3.- MODELOS FARMACODINÁMICOS

Cuantifican la relación entre la concentración de fármaco y el efecto. Las concentraciones deberían medirse en el sitio del efecto, el lugar de acción o la biofase, donde se produce la interacción con los respectivos receptores biológicos, pero en la mayoría de los casos esto no es posible. Por eso se utilizan lugares más fácilmente accesibles al cuerpo, como el plasma o la sangre para establecer estas relaciones (Meibohm and Derendorf, 1997).

La relación entre la concentración de fármaco en plasma y en el sitio del efecto puede ser constante o experimentar cambios dependientes del tiempo. Como consecuencia de una

distribución retrasada, la relación entre el plasma y el lugar del efecto puede cambiar con el tiempo resultando una disociación entre el tiempo de medida de las concentraciones y el efecto observado.

Los modelos farmacodinámicos para describir respuestas en condiciones de equilibrio estacionario entre el plasma (lugar de medida del fármaco) y la biofase (lugar de acción del fármaco) o cuando no existe retraso entre las concentraciones y el efecto son (Derendorf and Meibohm, 1999; Holford and Sheiner, 1981b):

- modelo lineal, donde se asume una proporcionalidad directa entre la concentración de fármaco y el efecto. No predice efecto máximo ni es muy utilizado, ya que en la mayoría de fármacos la relación entre el efecto y las concentraciones no es lineal, e indica que el efecto de un fármaco podría incrementar indefinidamente al incrementarse las concentraciones plasmáticas. La ecuación representativa es:

$$E = SLP \cdot C + E_0 \quad (2)$$

donde  $E$  es el efecto que produce el fármaco,  $C$  es la concentración del fármaco en plasma,  $SLP$  es la pendiente o cambio de respuesta por unidad de concentración y  $E_0$  es el efecto cuando no hay fármaco (efecto basal).

- modelo log-lineal, que a través de la transformación logarítmica de las concentraciones con el intento de ajustar la no-linealidad, consigue una aproximación lineal de una relación no lineal, entre el 20 y el 80% del efecto. La ecuación representativa es:

$$E = SLP \cdot \log C + I \quad (3)$$

donde el efecto basal está sustituido por  $I$ , una constante empírica sin significado fisiológico, no pudiendo predecir el efecto en ausencia del fármaco. Como el anterior modelo tampoco predice efecto máximo.

- modelo de efecto máximo, es el modelo que más frecuentemente describe la relación concentración-efecto y lo hace mediante una relación hiperbólica. La ecuación representativa es:

$$E = E_0 + \frac{E_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad (4)$$

donde  $E_{max}$  es el máximo efecto atribuible al fármaco y  $EC_{50}$  es la concentración que produce el 50% del  $E_{max}$ . Tiene dos propiedades importantes: predice el efecto máximo y predice efecto cuando no hay fármaco.

- modelo  $E_{max}$ -sigmoideo, es una extensión del modelo de  $E_{max}$ , para poder describir adecuadamente el efecto, cuando la curva concentración-efecto presenta una forma sigmoide y no hiperbólica. La fórmula que describe el modelo lleva un factor  $\gamma$  asociado que se ha

postulado que refleja el número de sitios de unión con el receptor (Goutelle et al., 2008) así podemos describir respuestas hiperbólicas con la relación del modelo  $E_{\max}$ , cuando  $\gamma = 1$ , si  $\gamma > 1$  la relación se vuelve sigmoide y si  $\gamma < 1$  la relación se podrá aproximar al modelo lineal. La ecuación representativa es:

$$E = E_0 + \frac{E_{\max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (5)$$

#### 4.4.- COMPLEJIDADES

Los conceptos cruciales de la farmacodinamia son, la potencia, que refleja la sensibilidad del órgano o tejido por el fármaco y la actividad intrínseca (o eficacia) que describe la máxima respuesta que se puede obtener. Son numerosas las situaciones que pueden complicar el estudio de la relación dosis-respuesta, que hacen necesario el uso de modelos complejos, debido a que modifican los procesos cinéticos y/o dinámicos (Bauer et al., 2007; Derendorf and Meibohm, 1999). Entre las causas cinéticas se pueden destacar, la formación de metabolitos (Bertrand et al., 2011), la inducción/inhibición enzimática del metabolismo (Kerbusch et al., 2000), la acumulación del fármaco en tejidos periféricos, cambios en la unión a proteínas plasmáticas, la administración de muestras racémicas o la presencia de agonistas endógenos que pueden variar su concentración. Entre las causas dinámicas destacan la existencia de efecto placebo, la presencia de metabolitos activos, la administración de formas racémicas, la interacción de fármacos, el desarrollo de tolerancia y/o sensibilización, la unión irreversible del fármaco a receptores, los procesos de regulación homeostática, las cascadas de respuestas previas al efecto medido, la implicación de más de un tipo de receptor, la disponibilidad solo de medidas indirectas para medir la acción del fármaco y las respuestas no continuas, entre otras (Danhof et al., 2007).

Los individuos que configuran la población, a pesar de pertenecer a una misma población pueden tener parámetros tanto farmacocinéticos como farmacodinámicos diferentes que dan como resultado, perfiles de concentración vs tiempo y/o efecto vs concentración diferentes entre individuos. La causa de estas diferencias interindividuales puede estar ocasionada por diferencias en covariables (factores demográficos y fisiopatológicos) de cada uno de los individuos que constituyen la población de análisis. Dichas covariables pueden ser factores demográficos, fisiopatológicos, el peso, las funciones metabólicas y excretoras, o la presencia de otras terapias que pueden alterar la relación dosis-respuesta de un fármaco (Lalonde et al., 2007; Nikanjam et al., 2015). La estrategia del análisis poblacional permite cuantificar el efecto que provocan dichas covariables en la relación dosis-respuesta de cada individuo respecto de la población general de la que forma parte (Garret et al., 2013).

---

---

**II.**

## **Hipótesis**

---

---



Diazepam como todas las benzodiazepinas produce cambios en el electroencefalograma, pero con la peculiaridad de que tras la administración de DZ, se genera un metabolito (DMDZ) que se ha demostrado activo en estudios in vitro e in vivo (animales y humanos) y por lo tanto parte del efecto observado tras la administración de DZ podría ser debido a DMDZ. Aunque se ha descrito que DMDZ a dosis únicas bajas de DZ no contribuye en el efecto observado tras la administración de este último, nosotros hipotetizamos que DMDZ contribuye al efecto observado sobre el EEG tras la administración de DZ tanto a dosis altas como en el estado de equilibrio estacionario tras administrar las dosis más habitualmente empleadas en clínica para el tratamiento de la ansiedad.

Por otro lado, el desarrollo de modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos aplicando la aproximación poblacional se ha postulado como herramienta válida para poder cuantificar no sólo fuentes de variabilidad asociadas a los diferentes procesos que sufre o se desencadenan tras la administración de un fármaco, sino que también han mostrado ser útiles para cuantificar el efecto debido a un metabolito cuando se administra un fármaco, a pesar de requerir diseños complicados. Nosotros hipotetizamos que el desarrollo de modelos FC/FD poblacionales aplicado a un diseño sencillo en el que se administran dosis únicas altas tanto del fármaco como del metabolito, nos permitirán poder cuantificar la contribución de DMDZ en el efecto observado sobre el EEG tras la administración de 30 mg de DZ.

Finalmente, las benzodiazepinas también producen otros efectos como resultado de su interacción con el receptor GABA. En el presente estudio hipotetizamos que dosis altas de DZ y DMDZ producirán elevada sedación y un descenso del rendimiento psicomotor, pero sin alterar de manera clínicamente relevante su perfil de seguridad.



---

---

**III.**

## **Objetivos**

---

---



Como objetivo principal nos planteamos describir y cuantificar la contribución del DMDZ en el efecto observado tras la administración oral de 30 mg de DZ. Los objetivos concretos planteados para conseguirlo fueron:

1. Desarrollar un modelo farmacocinético poblacional para describir el comportamiento cinético de DMDZ tras una dosis alta de DMDZ y cuantificar la variabilidad asociada a cada proceso, así como los posibles factores que pudieran describir esta variabilidad.
2. Desarrollar un modelo farmacocinético poblacional para describir el comportamiento cinético de DZ y DMDZ tras la administración de dosis únicas altas de DZ y cuantificar la variabilidad asociada a cada proceso, así como los posibles factores que pudieran describir esta variabilidad.
3. Describir el efecto sobre el EEG (poder relativo alfa y poder relativo beta), tras la administración de una dosis alta (30mg) de DMDZ.
4. Describir el efecto sobre el EEG (poder relativo alfa y poder relativo beta), tras la administración de dosis únicas altas (30mg) de DZ.
5. Comparar la respuesta observada en el EEG tras la administración de 30mg de DZ y 30 mg de DMDZ.
6. Desarrollar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para describir el efecto sobre el EEG (poder relativo beta) tras la administración de una dosis única alta de DMDZ y cuantificar la variabilidad asociada a cada parámetro, así como los posibles factores que pudieran describir esta variabilidad.
7. Desarrollar un modelo farmacocinético/farmacodinámico para describir el efecto sobre el EEG (poder relativo beta) tras la administración de una dosis única alta de DZ y cuantificar la variabilidad asociada a cada parámetro, así como los posibles factores que pudieran describir esta variabilidad.
8. Describir el efecto sobre el rendimiento psicomotor, evaluaciones subjetivas de sedación y seguridad tras la administración de 30 mg de DMDZ.
9. Describir el efecto sobre el rendimiento psicomotor, evaluaciones subjetivas de sedación y seguridad tras la administración de 30 mg de DZ.
10. Comparar los efectos producidos por DZ y DMDZ sobre el rendimiento psicomotor, evaluaciones subjetivas de sedación y seguridad.
11. Valorar la reproducibilidad de la farmacocinética de DZ y DMDZ así como de los efectos farmacológicos evaluados tras administrar 30mg de diazepam en 2 ocasiones.



---

---

**IV.**

# **Material y Métodos**

---

---



## 1.- ELECCIÓN DE LA DOSIS

La dosis de fármaco (DZ) requerida para este estudio tenía que proporcionar unas concentraciones de metabolito activo (DMDZ) suficientes para garantizar que por sí mismas fueran capaces de inducir efecto farmacológico cuantificable y similares a las observadas con las dosis de DMDZ aprobadas en otros países europeos (AFMPS, 2015; ANSM, 2013a, b). Además, se revisó la literatura en relación a la máxima dosis oral única administrada de DZ y DMDZ en sujetos no dependientes a benzodiazepinas y con finalidad no anestésica (Hillestad et al., 1974; Humbert et al., 1998; Kintz et al., 1996; Tognoni et al., 1975). Con todo se decidió administrar dosis orales únicas de 30 mg de DZ y DMDZ.

## 2.- SUJETOS

Dado el carácter exploratorio del estudio, no era necesario realizar un cálculo formal del tamaño de la muestra (N), por lo que se realizó el ensayo clínico teniendo en cuenta que la N habitualmente utilizada en este tipo de estudios en los que se cuantifican los parámetros derivados del EEG, escalas analógicas visuales y test de cancelación d2 tras la administración de benzodiazepinas suele oscilar entre 10 y 24 individuos (Barbanoj et al., 2007; Dingemans et al., 1997b; Greenblatt et al., 1989b). Finalmente se incluyeron 16 voluntarios.

Antes de incluir ningún sujeto en el estudio, el protocolo de estudio, la información al voluntario y el consentimiento informado fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del “Hospital de la Santa Creu i Sant Pau” y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. El estudio se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones éticas para la realización de ensayos clínicos e investigación en humanos (Declaración de Helsinki de 1964 y enmiendas posteriores) (WMA, 1996) y en conformidad con la legislación española en materia de ensayos clínicos vigente en el momento de la realización del estudio (BOE, 1990).

Para ser incluido en el estudio, el sujeto debía dar su consentimiento a participar en él, tras haber sido informado de la naturaleza del estudio, y las posibles consecuencias de su participación en el estudio en términos que él pudiera entender. La información que recibió contenía: la explicación del propósito del estudio y procedimiento experimental, la descripción de los fármacos de estudio y asignación aleatoria, declarando que el tratamiento podía ser placebo, la descripción de los todos los procedimientos a seguir, la duración de la participación del voluntario en el estudio, el número aproximado de voluntarios que participarían en el estudio, las responsabilidades del voluntario, los

riesgos y molestias previstos y las medidas que se aplicarían, la descripción de los beneficios para el sujeto y la sociedad, la compensación para los voluntarios: seguro, tratamiento médico de posibles daños y compensación económica, la existencia de algún coste adicional para los sujetos derivado de su participación en el estudio, las condiciones de participación: consentimiento expresado libremente, derecho de abandonar el estudio en cualquier momento y de no participar sin consecuencias para el voluntario, la explicación de que la identidad del sujeto es confidencial, la identificación de a quién y dónde se podían dirigir los voluntarios para obtener respuestas de algún aspecto del estudio o de los derechos del voluntario y la descripción de las circunstancias en las cuales el investigador podía interrumpir la participación del sujeto en el estudio.

## 2.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los sujetos debían cumplir cada uno de los criterios siguientes:

- Sujetos de ambos sexos de raza oriental (china, japonesa o coreana) y caucásica.
- Edad comprendida entre los 18 y los 40 años (ambos inclusivos).
- Peso corporal dentro del rango de la normalidad: Índice de Quetelet entre 19 y 26, expresado como peso (kg) / altura (m<sup>2</sup>).
- Historia clínica, exploración física por órganos y sistemas, constantes vitales (PAS, PAD y FC) y registro electrocardiográfico dentro de la normalidad.
- Pruebas de laboratorio (hemograma, bioquímica) dentro de la normalidad, de acuerdo a los valores normales de referencia del laboratorio de Hematología y Bioquímica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
- Uso de métodos anticonceptivos que no fueran anticonceptivos hormonales en el caso de las mujeres.
- No haber participado en el desarrollo de otro ensayo clínico, al menos dentro de los dos meses precedentes al inicio del ensayo.
- Aceptación libre de participar en el ensayo, con consentimiento informado por escrito del voluntario.
- Sujetos capaces de entender la naturaleza, consecuencias del ensayo y los procedimientos que se les solicita seguir.

## 2.2.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los sujetos que presentaron uno o más de los siguientes criterios no se seleccionaron para participar en el estudio:

- Historia previa de abuso de alcohol o drogodependencia.
- Historia previa de cualquier alteración neuropsiquiátrica.
- Consumidor importante de bebidas estimulantes (más de 5 cafés, té, chocolate o bebidas de cola al día).
- Fumador habitual de más de 3 cigarrillos al día.
- Mujeres embarazadas o en época de lactancia.
- Enfermedad importante o intervención quirúrgica mayor, en los 3 meses precedentes al inicio del estudio.
- Historia y/o evidencia clínica de patología gastrointestinal, cardiovascular, respiratoria, hepática, endocrina, hematológica, neurológica o renal u otras enfermedades crónicas.
- Antecedentes de alergia, idiosincrasia o hipersensibilidad a fármacos.
- Toma de cualquier otra medicación en las 4 semanas anteriores a la realización del estudio.
- Resultados de serología positivos para Hepatitis B (VHB), Hepatitis C (VHC) o Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

### 3.- DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio fue diseñado para proceder a una evaluación farmacocinética / farmacodinámica tras la administración de las siguientes benzodiazepinas: DZ y DMDZ. El diseño fue doble ciego, cruzado, con un período mínimo de blanqueo de 5 semanas y controlado con placebo. La asignación de los voluntarios a las diferentes secuencias de administración de fármacos se hizo de manera aleatoria, siguiendo una distribución tal que los sujetos recibieron los tratamientos según secuencias diferentes, utilizando para ello cuadrados latinos 4 x 4 distintos, de manera que a cada voluntario se le administró dos veces una dosis oral única de 30 mg de DZ, para evaluar la reproducibilidad intrasujeto, una dosis oral única de 30 mg de DMDZ y se incorporó un control con placebo. La forma farmacéutica administrada tras el enmascaramiento fueron cápsulas. De esta manera, se realizaron 4 intervenciones, tres de ellas activas, administrándose a cada voluntario dosis orales únicas de:

- Placebo (lactosa)
- DZ 30 mg (Valium<sup>®</sup> 10 mg/comprimido, 3 comprimidos)
- DZ 30 mg (Valium<sup>®</sup> 10 mg/comprimido, 3 comprimidos)
- DMDZ 30 mg (Praxadium<sup>®</sup> 15 mg/comprimido, 2 comprimidos)

Los comprimidos se encapsularon en el servicio de Farmacia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, introduciendo 3 comprimidos de 10 mg de DZ en una cápsula del doble 0 y 2 comprimidos de 15 mg de DMDZ en una cápsula del doble 0 con la misma apariencia externa. Para el placebo, se utilizaron las mismas cápsulas del doble 0, introduciendo en ellas lactosa anhidra en cantidad suficiente para conseguir un peso similar.

#### 3.1.- EXPLORACIÓN PRE-ESTUDIO

Todos los voluntarios fueron examinados (en ayunas de 10 horas) dentro de las 2 semanas previas al inicio del estudio. Se recogieron los siguientes datos en la correspondiente hoja de seguimiento individual de cada voluntario: datos personales, historia médica detallada, exploración física general y por aparatos, frecuencia cardíaca y respiratoria, tensión arterial sistólica y diastólica (en sedestación y en decúbito) y temperatura axilar, electrocardiograma, analítica incluyendo bioquímica, hematología, urianálisis y control de drogas en orina para: cocaína, anfetaminas, opiáceos, etanol, cannabis y benzodiazepinas. También se realizaron serologías para VIH, VHB y VHC. Y en las participantes femeninas se evaluó presencia en suero de  $\beta$ -HCG.

### 3.2.- INSTITUCIONALIZACIÓN Y SUPERVISIÓN DE LOS SUJETOS

Cada día experimental se realizó el estudio en un máximo de 3 voluntarios. El día de estudio, los voluntarios llegaron al centro entre las 7:00 y las 7:30 de la mañana tras ayuno de 10 horas para alimentos sólidos y líquidos y tras haber dormido un mínimo de 8 horas. Se les realizó un control de drogas en orina para: cocaína, anfetaminas, opiáceos, etanol, cannabis y benzodiazepinas. Se tomaron las constantes vitales (frecuencia cardíaca, tensión arterial sistólica y diastólica y temperatura). Tras registrar los electroencefalogramas en vigilia con ojos cerrados (V-EEG) correspondientes en condiciones basales, se les administró la medicación con 200 mL de agua a las 8:00 h para el primer voluntario dejando un intervalo de 15 min entre cada voluntario. Permanecieron ingresados bajo supervisión de personal cualificado durante 12 horas tras la administración del fármaco y volvieron a +24, +36, +48, +72, +96, +168, +360, +552 y +744 h (+1440, +2160, +2880, +4320, +5760, +10080, +21600, +33120 y +44640 min, respectivamente) para posteriores extracciones. El día 31 (744 h) de cada sesión, se realizó un electrocardiograma (ECG) y una analítica, comprendiendo un examen hematológico, bioquímico y urianálisis como parte del control final de la sesión respectiva. El volumen de sangre extraído en todo el estudio no superó el volumen extraído para una donación de sangre, es decir 500 mL para varones y 350 mL para mujeres.

Se tomaron las constantes vitales en sedestación (tensión arterial sistólica y diastólica (mm Hg) y frecuencia cardíaca (pulsaciones/min) en basal (t = 0), a +30 min, +1, +2, +4, +8, +12 y +24 h tras la administración de la medicación.

A partir de +3 h post-medicación y cada 3 h hasta +12 h recibieron un total de 4 pisolabis con la finalidad de evitar el decremento del nivel de vigilancia que producen las comidas copiosas, para poder proceder a una óptima evaluación farmacodinámica. La ingesta de líquidos (agua) fue *ad libitum* durante toda la sesión experimental a partir de +2 h tras la toma de la medicación de estudio.

### 3.3.- OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

En cada sesión experimental a los voluntarios se les insertó una cánula en una vena antecubital, provista de mandriles desechables, para permitir la extracción repetida de muestras sanguíneas de 2.5 mL, a los siguientes tiempos: basal, +5, +10, +15, +30 y +45 min y a +1, +1.5, +2, +2.5, +3, +4, +6, +8, +10, +12, +24, +36, +48, +72, +96, +168, +360, +552 y +744 h. Cada muestra se recogió en jeringa, se pasó a un tubo de polipropileno heparinizado y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4 °C. El plasma sobrenadante se separó mediante la aspiración del mismo con pipetas desechables y se almacenó bajo congelación a  $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de plástico hasta el momento de su determinación analítica.

## 4.- EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA Y EL EEG

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de DZ y DMDZ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, sistema isocrático y detección por ultravioleta según el método descrito por (Lacroix C, 1993).

### 4.1.- DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE DZ Y DMDZ

#### 4.1.1.- Condiciones cromatográficas

El sistema cromatográfico estuvo compuesto por una bomba de alta presión (Kontron 322, Barcelona) conectada a un inyector de muestras automático (Kontron 465, Barcelona). La detección se llevó a cabo mediante un detector ultravioleta (Kontron 332, Barcelona), un selector de solventes (LMV 470 Kontron, Barcelona) y un ordenador con software de adquisición y tratamiento de datos (Kontron 450 MT2, Barcelona). La separación analítica se llevó a cabo utilizando una columna cromatográfica Spherisorb C<sub>18</sub> de 5 μ de tamaño de partícula y de dimensiones 15\*0.4 cm y una precolumna C<sub>18</sub> ambas de Teknokroma, Barcelona. La fase móvil estuvo constituida por una mezcla 37:57:6 de acetonitrilo:tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10mM, pH=3.7):metanol. El acetonitrilo y el metanol fueron de grado HPLC, de Scharlau, Barcelona.

El flujo de trabajo fue de 1 mL/min y la detección con ultravioleta a una longitud de onda  $\lambda=221$  nm.

#### 4.1.2.- Preparación de las soluciones estándar

Se prepararon soluciones estándar metanólicas de DZ y DMDZ a la concentración de 10<sup>6</sup> ng/mL (solución madre). A partir de estas soluciones madre se realizaron las soluciones de 10<sup>5</sup> ng/mL y 10<sup>4</sup> ng/mL en fase móvil. Todas las disoluciones se preservaron de la luz y se guardaron en nevera a 4°C.

Como control cromatográfico se utilizó una disolución de 10<sup>3</sup> ng/mL en fase móvil de DZ y DMDZ procedente de las soluciones descritas anteriormente, se preservó de la luz y se guardó en la nevera. Cada día de trabajo se inyectaron al menos tres veces 0.03 mL de este control al inicio del proceso a fin de controlar el sistema cromatográfico en su totalidad.

Para la elaboración de las curvas de calibrado se prepararon blancos y dos curvas diferentes para el DMDZ, una que sirvió para cuantificar las muestras del tratamiento en el que se administró DMDZ y otra para las muestras de los tratamientos en que se administró DZ. Las concentraciones preparadas para el tratamiento con DMDZ fueron de 5, 25, 75, 200, 700 y 1200 ng/mL de DMDZ y para el tratamiento con DZ las concentraciones fueron de 10, 25, 100, 300, 700 y 1000 ng/mL de DZ y de 5, 25, 75, 100, 200 y 300 ng/mL de DMDZ. Para el estudio de las muestras procedentes de los voluntarios la preparación de los estándares plasmáticos fue por duplicado. Para elaborar el control de calidad se procedió de la misma forma, a partir de una solución metanólica de DZ y DMDZ diferente de la de la curva de calibrado. Se prepararon controles plasmáticos a 3 niveles de concentración (25, 200 y 700 ng/mL para el tratamiento con DMDZ y para el tratamiento con DZ, se prepararon niveles de concentración de 25, 100 y 700 ng/mL para DZ y 25, 75 y 200 ng/mL para DMDZ). Se dividieron en alícuotas y se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización cada día de trabajo.

#### 4.1.3.- Procedimiento de extracción

La preparación de la muestra se llevó a cabo mediante un sistema de extracción en fase sólida con cartuchos  $\text{C}_{18}$ , siguiendo un método desarrollado en el "Laboratori de Quantificació de Fàrmacs de l'Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau". Se descongelaron las muestras de los sujetos, los estándares plasmáticos de la curva de calibrado y control de calidad y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. Se acondicionaron los cartuchos Bond-Elut  $\text{C}_{18}$  con 2 mL de metanol y 2 mL de agua y posteriormente, se adicionó 1 mL de plasma, dejándose interaccionar 1 min y se lavó con 2 mL de agua y 1 mL de metanol-agua 50:50. Se dejó pasar aire durante 1 min y se eluyó con 1 mL de metanol. Los eluatos se secaron en la centrifuga / evaporador de muestras durante 1 h 45 min. Los residuos secos se redisolieron en 120  $\mu\text{L}$  de fase móvil, se dispusieron en microviales desechables encapsulados y se colocaron en el carro del inyector. Se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  en el sistema cromatográfico.

#### 4.1.4.- Validación del método analítico

Entendemos por validación de un método bioanalítico todos los procedimientos que van encaminados a demostrar que un método utilizado para medir de manera cuantitativa los analitos en una matriz biológica determinada es fiable y reproducible para el uso previsto (CDER, 2001).

La validación del método se llevó a cabo estudiando los siguientes parámetros:

- Selectividad
- Precisión, exactitud y recuperación
- Límites de detección y cuantificación
- Linealidad
- Especificidad
- Estabilidad
- Estudios de interferencia

Para ello se realizaron curvas de calibrado durante tres días diferentes.

La revalidación (validación retrospectiva) del método se llevó a cabo durante la etapa de procesamiento de las muestras y consistió en la evaluación de los resultados de las curvas de calibrado elaboradas y procesadas para determinar las concentraciones de fármaco en las muestras.

#### Selectividad

Es la capacidad que tiene el método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra. Para comprobarla, se analizaron 6 muestras de blancos (sin analito) de plasma y 6 muestras a una concentración de fármaco (DZ o DMDZ) igual al límite de cuantificación. Para cada muestra de blanco, se comprobaron interferencias.

#### Precisión, exactitud y recuperación

La precisión de un método analítico describe cuánto están de cerca las medidas individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a alícuotas múltiples de un volumen homogéneo de una matriz biológica (CDER, 2001). Mientras que la exactitud de un método analítico describe cuánto están de cerca los resultados obtenidos por un método respecto al valor real (concentración) del analito (CDER, 2001).

Para estudiar la precisión y la exactitud intradía e interdía, los estándares plasmáticos se prepararon por sextuplicado y triplicado respectivamente, a las concentraciones para ambos fármacos de: 30, 60, 200, 500, 1000 y 1200 ng/mL. En todos los casos se preparó una mezcla de plasma libre del fármaco a estudiar, para utilizar como blanco. Los estándares plasmáticos a las distintas concentraciones se prepararon añadiendo al plasma blanco diferentes cantidades de DZ y DMDZ y dividiendo en alícuotas de 2.2 mL en tubos de polipropileno de 3 mL y congelándose. Los resultados de la precisión intra e interdía se evaluaron a partir de los resultados de las rectas de calibrado procesadas en un mismo día o en días diferentes.

La precisión intra e interdías expresada como porcentaje (CV%) fue menor de 13.3% y 7.9% respectivamente para el DZ y de 11.3% y 4.2% respectivamente para el DMDZ en el rango de concentraciones estudiado.

La exactitud se calculó como error relativo (E%) a todos los niveles de concentración a partir de las curvas obtenidas durante los días de validación, mediante la siguiente expresión:

$$E(\%) = \frac{C_{real} - C_{medida}}{C_{real}} \times 100 \quad (6)$$

Se obtuvieron valores de error intra e interdías inferiores al 8% y 14% respectivamente para el DZ y valores intra e interdías inferiores al 11% y 10% respectivamente para el DMDZ.

Se denomina recuperación de un analito en un ensayo, a la respuesta detectada obtenida a partir de una cantidad de analito añadida a un extracto de la matriz biológica, comparada con la respuesta detectada obtenida a partir de la concentración de un estándar auténtico puro (señal obtenida cuando se añade una concentración determinada de fármaco a la fase móvil con estándar interno). La recuperación del procedimiento analítico para el DZ y el DMDZ, expresado como eficiencia de la extracción, frente a los estándares de las mismas concentraciones en fase móvil, fue de 94.66% (CV=7.42%) y 102.25% (CV=8.84%) para DMDZ y DZ respectivamente a la concentración de 30 ng/mL.

#### Límites de detección y cuantificación:

El límite de detección es la concentración más baja de un analito que el procedimiento bioanalítico puede diferenciar de manera fiable del ruido de fondo (CDER, 2003) y el límite de cuantificación es la cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuados (CDER, 2003).

En el presente análisis los límites de detección y cuantificación se establecieron a partir del ruido observado al procesar los 6 blancos consecutivos así como de las distintas rectas de calibración. Se determinó el límite de detección como 3 veces el valor del ruido de fondo de los blancos (1 ng para DZ y 1 ng para DMDZ), y el límite de cuantificación como al menos 3 veces el valor del ruido de fondo y que además tuviera un error de precisión y exactitud inferior al 20% (10 ng/mL para DZ y 5 ng/mL para DMDZ).

#### Linealidad

Se define linealidad como la capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados test que sean directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra (EMEA, 1995). La linealidad se evaluó en el intervalo de concentraciones de 10-1000 ng/mL para DZ y de 5-1200 ng/mL para DMDZ, estudiando la precisión de los siguientes parámetros obtenidos de tres curvas diferentes: pendiente, ordenada en el origen, coeficientes de regresión y correlación, considerando la relación entre las diferentes concentraciones de cada fármaco y la altura del pico de la señal cromatográfica.

### Estudios de interferencia

Se estudiaron las posibles interferencias de DZ y DMDZ con los diferentes anticoagulantes empleados (AEDT [ácido etilendiaminotetraacético], heparina y citrato), y se optó por utilizar tubos de plástico con heparina sódica como anticoagulante.

## **4.2.- EVALUACIÓN DEL EEG**

### **4.2.1.- Cartografía topográfica**

En cada uno de los tiempos de lectura, los voluntarios acudieron a una habitación especialmente acondicionada, donde se procedía al registro del EEG. Los puntos temporales en los que se realizaron los registros fueron los siguientes: basal, +5, +10, +15, +30, +45, +60 min, +1.5, +2, +2.5, +3, +4, +6 +8, +10 y +12 h tras la administración del tratamiento. El registro del EEG se realizó con los sujetos cómodamente sentados y relajados. Se obtuvieron 3 minutos de EEG controlando el nivel de vigilancia (V-EEG) con los ojos cerrados. Durante el registro del V-EEG se intentó mantener el nivel de alerta del sujeto, despertándolo tan pronto como aparecía un patrón de somnolencia en el EEG.

#### **4.2.1.1.- Adquisición de las señales**

El EEG se adquirió mediante 16 derivaciones de acuerdo con el sistema internacional 10/20 (Fp1, Fp2, F7, F3, F4, F8, T3, C3, C4, T4, T5, P3, P4, T6, O1 y O2 referenciadas al promedio de los mastoides). El electrooculograma (EOG) vertical (EOG-V) se registró mediante un electrodo situado en la mitad de la frente (2.5 cm por encima de las pupilas) referenciado al promedio de dos electrodos situados debajo de cada ojo (2.5 cm por debajo de las pupilas). El EOG horizontal (EOG-H) se registró a partir de electrodos situados en los cantos exteriores de los ojos.

Todas las señales se obtuvieron mediante un polígrafo Nicolet 1A97 de 18 canales (Filtro pasa-altos: 0.5 Hz. Filtro pasa-bajos: 30 Hz. Amplificación de aproximadamente 1:2800 para EOG-V y EOG-H, 1:7000 para Fp1 y Fp2 y 1:14.000 para el resto de canales de EEG. Máximo nivel de ruido: 2  $\mu$ V pico-a-pico. Proporción de rechazo entre canales >40 dB.). Para ello, se utilizaron electrodos de oro, que se fijaron al inicio de cada sesión experimental manteniéndose en el mismo lugar sin quitarlos hasta finalizada la misma. La impedancia de los diferentes electrodos se mantuvo por debajo de 5 k $\Omega$ , determinándose sistemáticamente antes de cada bloque experimental.

#### **4.2.1.2.- Análisis espectral de los cambios observados en el EEG**

Tras la adquisición de los 16 registros de EEG para cada una de las 4 sesiones y para cada voluntario, se procedió a analizar los 1024 registros de EEG. Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por (Romero et al., 2006, 2008; Romero et al., 2004): Primero se realizó el filtrado de artefactos. Para ello se redujeron los artefactos oculares de acuerdo con un algoritmo de separación ciega de fuentes (BSS) y se rechazaron automáticamente aquellos segmentos con artefactos de diferente naturaleza (saturación, movimiento, actividad muscular, patrones de adormecimiento o artefactos oculares no eliminados en la primera etapa) siguiendo el procedimiento descrito por Anderer y colaboradores (Anderer et al., 1992). Seguidamente se realizó el análisis espectral. Para ello se calcularon las funciones de densidad de potencia espectral (PSD) a partir de todas las épocas de 5 segundos libres de artefacto mediante un periodograma con ventana Hanning. Las funciones de PSD promedio se cuantificaron las bandas frecuenciales alfa y beta.

### **4.3.- ANÁLISIS MODELO INDEPENDIENTE**

#### **4.3.1.- Análisis exploratorio de los datos**

Se promediaron los valores obtenidos tras los 4 tratamientos y para todos los voluntarios y se representó gráficamente el curso temporal de las concentraciones plasmáticas tras la primera ocasión en que se administró diazepam (DZ1), tras la segunda ocasión en que se administró diazepam (DZ2) y tras la administración de desmetildiazepam (DMDZ) y de las variables derivadas del EEG (poder relativo alfa, poder relativo beta).

Posteriormente, se expresaron los resultados de las variables farmacodinámicas como diferencia respecto del valor basal y se volvieron a representar gráficamente las variables, para realizar una primera inspección acerca de si el valor basal influenciaba en el curso temporal de la variable farmacodinámica.

#### **4.3.2.- Generación de variables**

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se calcularon utilizando métodos no compartimentales con WinNonLin Profesional 2.1 (Pharsight, 1994-1998).

#### 4.3.2.1.- Farmacocinéticas

Mediante inspección visual de los datos obtenidos tras la administración de los 3 tratamientos activos, se halló el punto temporal ( $t_{lag}$ ), en el que se observaba la primera concentración plasmática diferente de 0, la máxima concentración plasmática observada ( $C_{max}$ ) y el punto temporal ( $t_{max}$ ) en el cual la concentración plasmática era máxima, para cada tratamiento. La semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ), se calculó como  $t_{1/2} = 0.693/k_e$ , donde  $k_e$  representa la constante de velocidad de primer orden asociada con la fase terminal de la curva, estimada mediante regresión lineal del logaritmo de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo, con un mínimo de 3 puntos. A partir de las concentraciones plasmáticas obtenidas se calculó, utilizando el métodos de los trapecios, el área bajo la curva  $AUC_0^t$  (siendo t el punto temporal con la última observación que excede el límite de cuantificación) y el área bajo la curva  $AUC_0^\infty$ , que se calculó como  $AUC_0^\infty = AUC_0^t + C_{last}/k_e$ , siendo  $C_{last}$ , la última concentración medible superior al límite de cuantificación. El volumen aparente de distribución (V/F) se calculó como  $V/F = D / (k_e \times AUC_0^\infty)$ , donde D es la dosis y F es la biodisponibilidad por vía oral. El aclaramiento aparente (Cl/F), se calculó como  $D / AUC_0^\infty$ .

#### 4.3.2.2.- Farmacodinámicas

A partir de los valores individuales expresados como diferencia del valor basal, mediante inspección visual de los datos se halló el punto de máximo efecto ( $E_{max}$ ), el punto temporal ( $t_{max}$ ) en el cual se observaba mayor efecto ( $E_{max}$ ), para cada tratamiento y para cada una de las variables. Además, se calculó, utilizando el método de los trapecios, el área bajo la curva  $AUC_0^t$  (siendo t=12 el punto temporal con la última observación) del efecto observado tras cada tratamiento para cada una de las 2 variables farmacodinámicas derivadas del EEG (poder relativo alfa y poder relativo beta).

#### 4.3.3.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SPSS (v.17.0.1) (SPSS, 2008). En todos los análisis estadísticos se consideró una  $p \leq 0.05$  como criterio de rechazo para la hipótesis nula ( $H_0$ ).

#### 4.3.3.1.- Farmacocinética

Tras calcular los parámetros farmacocinéticos de DZ1, DZ2 y DMDZ, de manera modelo independiente (no compartimental), se realizó un test de Levene para los 3 tratamientos activos, para obtener información acerca de la homogeneidad de varianzas y de la posibilidad de aplicar estadística paramétrica. En caso de poder aplicarla, se realizó un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas y seguidamente se compararon mediante un test de t de Student pareado los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración de 30 mg de DZ en la primera ocasión (DZ1) con los obtenidos tras la administración de 30 mg de DZ en la segunda ocasión (DZ2) y de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración de DZ1 y DZ2 con los obtenidos tras la administración de DMDZ. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

Para  $t_{max}$  y  $t_{lag}$ , se calculó la mediana y el rango para cada tratamiento. Se realizó un test de Friedman de un factor (tratamiento) para ver si existían diferencias entre estas variables en función del tratamiento. Seguidamente se realizó un test de Wilcoxon pareado para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos para cada uno de los dos parámetros. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

#### 4.3.3.2.- Farmacodinamia

##### 4.3.3.2.1.- Evaluación de la situación basal

Para las variables derivadas del EEG, a los valores directos obtenidos antes de cada tratamiento (valor basal) se les aplicó una ANOVA de un factor (tratamiento), de medidas repetidas para comprobar la similitud de las condiciones basales antes de evaluar los 4 tratamientos. Posteriormente, se efectuó un test de t de Student pareado para saber entre qué tratamientos se hallaban las diferencias en condiciones basales.

#### 4.3.3.2.2.- Efecto global de los tratamientos

Para evaluar el efecto global de los tratamientos se realizó un ANOVA de 2 factores sobre los valores de efecto medido, y se compararon los valores de AUC,  $E_{\max}$  y  $t_{\max}$  (obtenidos una vez restado el valor basal a los datos directos) entre tratamientos.

A los valores directos obtenidos tras placebo, 30 mg de DZ1, DZ2 y DMDZ en condiciones basales y a +5, +10, +15, +30, +45 min, y +1, +1.5, +2, +2.5, +3, +4, +6, +8, +10 y +12 h post-medicación se les aplicó un ANOVA de 2 factores (tratamiento y tiempo) de medidas repetidas, para detectar posibles diferencias entre tratamientos a lo largo del tiempo.

Una vez restado el valor basal a los valores directos, se realizó el promedio y la desviación estándar del  $AUC_0^{12}$  para cada tratamiento y cada variable. Posteriormente, se realizó un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en cada una de las variables para los 4 tratamientos. Seguidamente mediante un test de t de Student pareado se evaluó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

Se calculó el promedio y la desviación estándar del  $E_{\max}$  para cada tratamiento y cada variable. Se realizó un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas a los valores de  $E_{\max}$  para ver si existían diferencias entre estas variables en función del tratamiento. Posteriormente se realizó un test de t de Student pareado para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

Se calculó la mediana y el rango de  $t_{\max}$  para cada tratamiento y cada variable. Se realizó un test de Friedman de un factor (tratamiento) a los valores de  $t_{\max}$  para ver si existían diferencias entre estas variables en función del tratamiento. Posteriormente se realizó un test de Wilcoxon pareado para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

#### 4.3.3.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Realizamos un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo a cada tratamiento por separado con el propósito de evidenciar en qué tratamientos podía haber diferencias y seguidamente se realizó un test de t de Student pareado para muestras relacionadas, comparando los 15 pares de tiempos, (tiempo basal con cada uno de los tiempos consecutivos) en cada tratamiento y para las 2 variables. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

A continuación, se realizó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo con el objetivo de saber a qué tiempos se hallaban las diferencias entre los tratamientos. Para realizar esta estadística, los datos de las variables se expresaron como diferencia respecto del valor basal. El siguiente paso, fue realizar un test de t de Student pareado para muestras relacionadas, comparando las 6 posibles combinaciones de tratamientos a cada tiempo. Se aplicaron comparaciones múltiples dos a dos a pesar de no tener significación estadística, y no se aplicó corrección alguna por comparaciones múltiples dado el carácter exploratorio del estudio.

#### 4.3.3.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado

Para ver si era reproducible el efecto observado tras la administración de 30 mg de DZ en 2 ocasiones diferentes (DZ1 y DZ2), se calcularon coeficientes de correlación intraclase, con los datos corregidos respecto del valor basal tanto a nivel de voluntario como a nivel de tiempo.

### 4.4.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO / FARMACODINÁMICO POBLACIONAL

El modelado de los datos se realizó empleando la metodología de la aproximación poblacional, en la que los datos de todos los individuos se analizan de manera simultánea, pero conservando la individualidad de los mismos, utilizando modelos que describen adecuadamente las tendencias típicas (de la media poblacional) y los perfiles individuales. En estos modelos, si englobamos el conjunto de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del individuo  $i$  dentro del vector  $FC/FD_i$ , las observaciones experimentales individuales, que en nuestro caso son, concentración de fármaco ( $FC$ ) o poder relativo beta ( $FD$ ), se representan por:

$$OBS_{ij} = f(D_i, FC/FD_i, X_i, t_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (7)$$

donde  $OBS_{ij}$  representa las observaciones (farmacocinéticas o farmacodinámicas) al tiempo  $t_j$  en el individuo  $i$ ;  $f$ , representa la estructura del modelo seleccionado;  $D_i$ , es la dosis de fármaco administrada;  $FC/FD_i$ , es el conjunto de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del individuo  $i$ ;  $X_i$ , son los factores o covariables capaces de alterar el modelo,  $t_{ij}$  es el tiempo  $j$  en el voluntario  $i$  y  $\varepsilon_{ij}$ , hace referencia a la diferencia residual entre el valor predicho por el modelo y el observado para el individuo  $i$  en el tiempo  $j$ . Se asume que los valores  $\varepsilon_{ij}$  son independientes entre sí y forman parte de una variable al azar simétricamente distribuida alrededor del valor 0 y con una variancia denominada  $\sigma^2$ .

En la expresión anterior están implícitos dos tipos de modelos: el “ $f$ ”, modelo estructural (FC: monocompartimental, bicompartimental o tricompartmental, y FD:  $E_{max}$ ,  $E_{max}$  sigmoide, lineal o log-lineal, comentados en la introducción) y el modelo del error residual. Los modelos de error utilizados durante el análisis fueron:

$$\text{Error residual aditivo: } OBS_{ij} = f(D_i, FC/FD_i, X_i, t_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (8)$$

$$\text{Error residual proporcional: } OBS_{ij} = f(D_i, FC/FD_i, X_i, t_{ij}) + f(D_i, FC/FD_i, X_i, t_{ij}) \cdot \varepsilon_{ij} \quad (9)$$

$$\text{Error residual combinado: } OBS_{ij} = f(D_i, FC/FD_i, X_i, t_{ij}) + f(D_i, FC/FD_i, X_i, t_{ij}) \cdot \varepsilon_{1ij} + \varepsilon_{2ij} \quad (10)$$

Si se considera  $p_i$ , un elemento del vector  $FC/FD_i$  y representante de los parámetros  $FC/FD$  del individuo  $i$ , este elemento en el contexto del análisis poblacional viene dado por:

$$p_i = \theta_{p,pop} \cdot e^{\eta_{pi}} \quad (11)$$

donde  $\theta_{p,pop}$  representa el valor típico (o medio) poblacional del parámetro farmacocinético o farmacodinámico, común a todos los individuos de esa población;  $\eta_{pi}$ , es la desviación del valor de  $p_i$  con respecto a  $\theta_{p,pop}$ . Si se tienen  $m$  individuos en estudio los valores  $\eta_{p1}, \eta_{p2}, \eta_{p3}, \dots, \eta_{pm}$  representan una variable al azar, simétricamente distribuida alrededor del valor 0 y de variancia igual a  $\omega_p^2$ . El valor de  $\omega^2$  representa la variabilidad interindividual asociada al parámetro  $p$  y se expresa en forma de matriz varianza-covarianza llamada  $\Omega$  que hace referencia a la variabilidad asociada a los parámetros y que contiene como elementos diagonales  $\omega_1^2, \dots, \omega_m^2$ , siendo  $m$  el número de parámetros para los cuales se está estimando la variabilidad interindividual. La expresión anterior implica que los valores de  $p_{1\dots m}$  tendrán una distribución log-normal y serán siempre no negativos, ajustándose a lo esperable desde el punto de vista fisiológico.

Los parámetros del modelo se estimaron mediante el análisis poblacional de efectos mixtos no lineales, empleando el programa NONMEM (acrónimo de nonlinear mixed-effect modelling), versión V (Beal, 1992; Boeckman, 1994). NONMEM estima los parámetros minimizando la función objetiva de mínimos cuadrados extendidos, que es aproximadamente proporcional a menos dos veces el logaritmo de la probabilidad de los datos.

Se utilizaron los métodos de minimización “first order (FO)” y “first order conditional estimation (FOCE)”, con las opciones INTERACTION y CENTERING. El método FO solo proporciona estimados de los parámetros poblacionales, aunque los parámetros estimados individuales se pueden obtener *a posteriori*, basándose en los parámetros poblacionales, como estimados bayesianos (opción posthoc). El método FOCE consume más tiempo, ya que los estimados individuales se obtienen durante cada iteración. Los errores estándar de los parámetros se obtuvieron utilizando la opción “COVARIANCE” en NONMEM.

#### **4.4.1.- Etapas del desarrollo del modelo farmacocinético / farmacodinámico poblacional**

El proceso de ajustar un modelo que describa de manera adecuada los datos es un trabajo complicado en el cual el refinamiento e inspección del modelo se deben realizar en varios pasos para permitir la reproducibilidad de los análisis. En el presente trabajo se optó por llevar a cabo un análisis de datos en etapas: en primer lugar se describió la farmacocinética tanto de DZ como de DMDZ y en una segunda etapa, se fijaron los parámetros bayesianos individuales farmacocinéticos y se procedió al análisis de la farmacodinamia.

##### **4.4.1.1.- Farmacocinética**

###### **4.4.1.1.1.- Análisis exploratorio de datos**

Tras la comprobación de la falta de errores en la tabla inicial de datos mediante representaciones gráficas de los valores de cada una de las columnas frente al número de voluntario empleando el programa Xpose 3.0 (Jonsson and Karlsson, 1999), se procedió a estudiar las características de la población del set de datos utilizando diferentes gráficos con los programas S-PLUS 6.1 (Insightful, 2002) y Xpose 3.0. Se exploraron los gráficos del curso temporal de las concentraciones plasmáticas de todos los individuos en una única gráfica para cada una de las formulaciones y fármacos (DZ y DMDZ), en escala normal y logarítmica incorporando la media de las observaciones.

###### **4.4.1.1.2.- Desarrollo del modelo farmacocinético**

El desarrollo del modelo farmacocinético que describiera las concentraciones plasmáticas tanto de DZ como de DMDZ se realizó en las siguientes cuatro etapas:

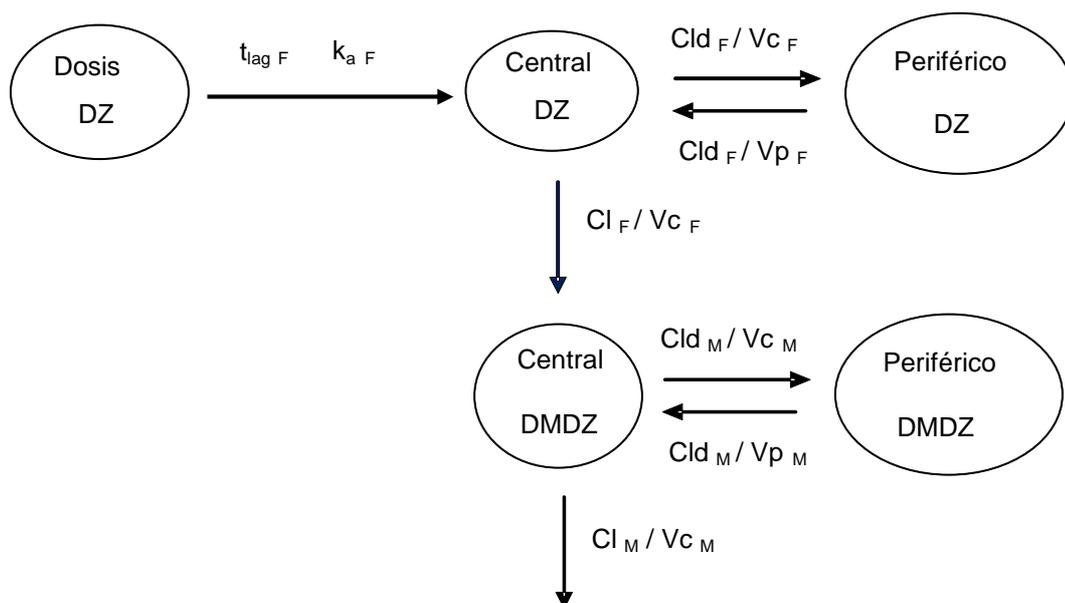
- 1.- Desarrollo del modelo farmacocinético de DMDZ tras administración de DMDZ.
- 2.- Desarrollo del modelo farmacocinético de DZ tras administración de DZ.
- 3.- Desarrollo del modelo farmacocinético de DMDZ tras administración de DZ, fijando los estimados bayesianos individuales de los parámetros de DZ obtenidos de la etapa 2.
- 4.- Desarrollo del modelo farmacocinético de DZ y DMDZ de manera simultánea.

En cada una de estas etapas se siguió la misma secuencia de pasos detallada a continuación: a) en primer lugar se determinó el modelo estructural, b) seguidamente se procedió al desarrollo del modelo estadístico y c) finalmente se determinó el modelo de covariables.

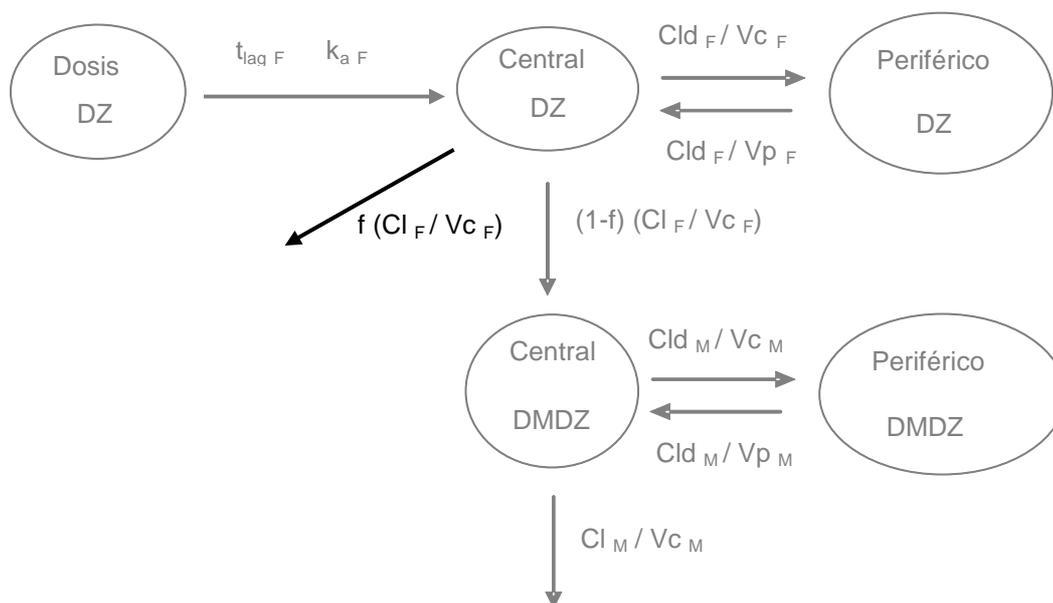
a) Desarrollo del sub-modelo estructural

La descripción de la disposición de ambos fármacos se realizó empleando modelos compartimentales (mono, bi y tricompartmentales) asumiendo una eliminación de primer orden desde el compartimento central. En el caso de DZ, para describir el proceso de absorción se ajustaron modelos con absorción de primer orden con y sin tiempo de latencia. Para describir la formación de DMDZ tras la administración de DZ se probaron diferentes modelos (Figuras 6 a 12) en los que se asumió que: Figura 1) la formación de DMDZ se producía a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ siguiendo un proceso de primer orden; Figura 2) mismas asunciones que en la Figura 1 pero solo una fracción DZ se transformaba en DMDZ, el resto se eliminaba por otra vía siguiendo un proceso de primer orden con una velocidad diferente; Figura 3) las concentraciones plasmáticas de DMDZ se formaban a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ pero no de forma directa, sino que era necesaria la incorporación de un compartimento de retraso; Figura 4) DMDZ se formaba a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ siguiendo un proceso de primer orden igual y como consecuencia de un efecto de primer paso de DZ mediante un proceso de primer orden; Figura 5) la formación de DMDZ se producía a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ siguiendo una cinética saturable; Figura 6) mismas asunciones que en la Figura 4, pero la formación de DMDZ se producía como consecuencia de un efecto de primer paso siguiendo un proceso de orden cero; o Figura 7) que DMDZ se formaba a partir de las concentraciones en el compartimento periférico de DZ.

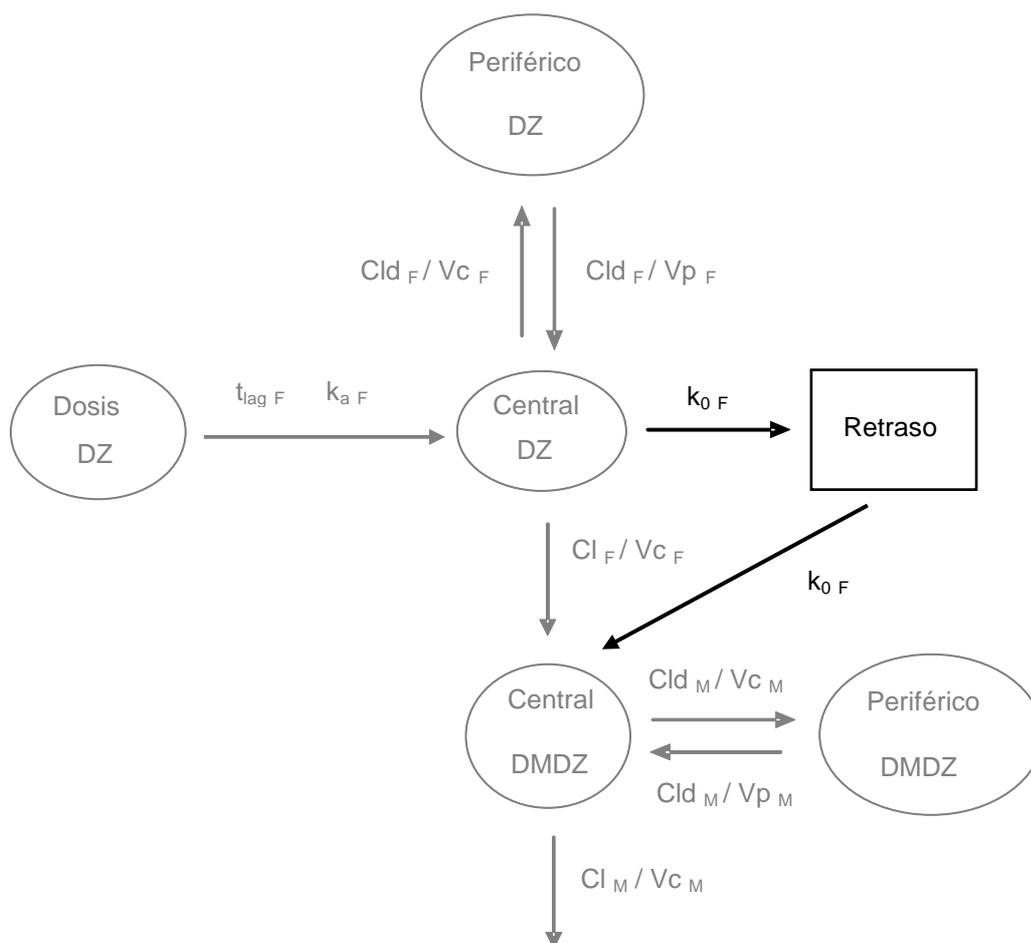
Los modelos tanto para DZ como para DMDZ se describieron en términos de: aclaramiento aparente ( $Cl/F$ , en L/min), volumen aparente de distribución del compartimento central ( $V_c/F$ , en L), aclaramiento aparente entre compartimentos ( $Cl_d/F$ , en L/min), volumen aparente de distribución del compartimento periférico ( $V_p/F$ , en L), constante de absorción de primer orden ( $k_a$ , en  $\text{min}^{-1}$ ) y tiempo de latencia ( $t_{lag}$ , en min). En las figuras siguientes se ha añadido además el sufijo F o M según sean parámetros relacionados con DZ o DMDZ, respectivamente.



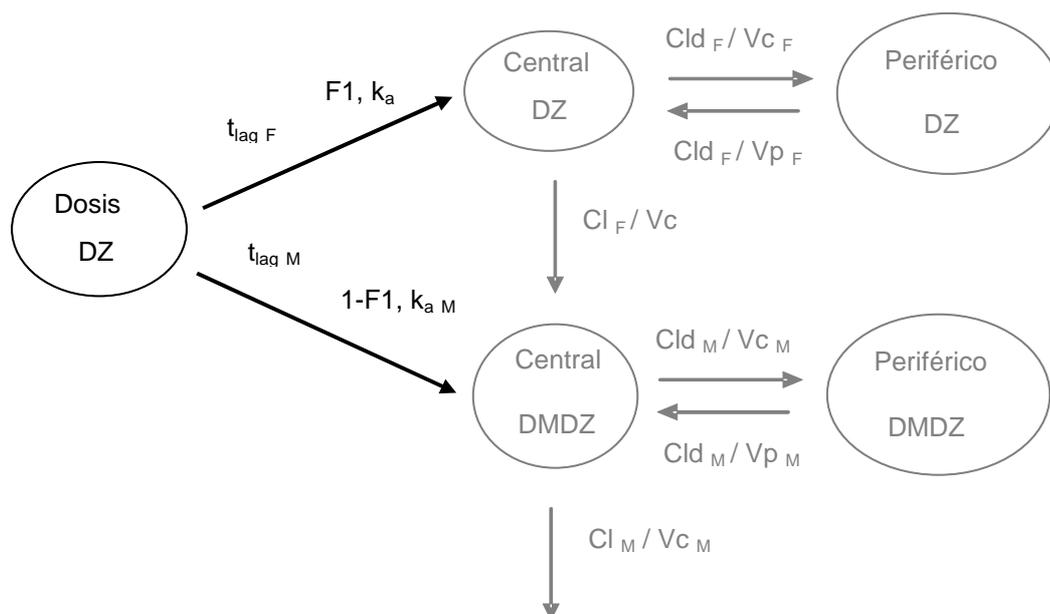
**Figura 6:** Representación gráfica del modelo en que la formación de DMDZ se produce a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ siguiendo un proceso de primer orden.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_p$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico y  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación. Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación.



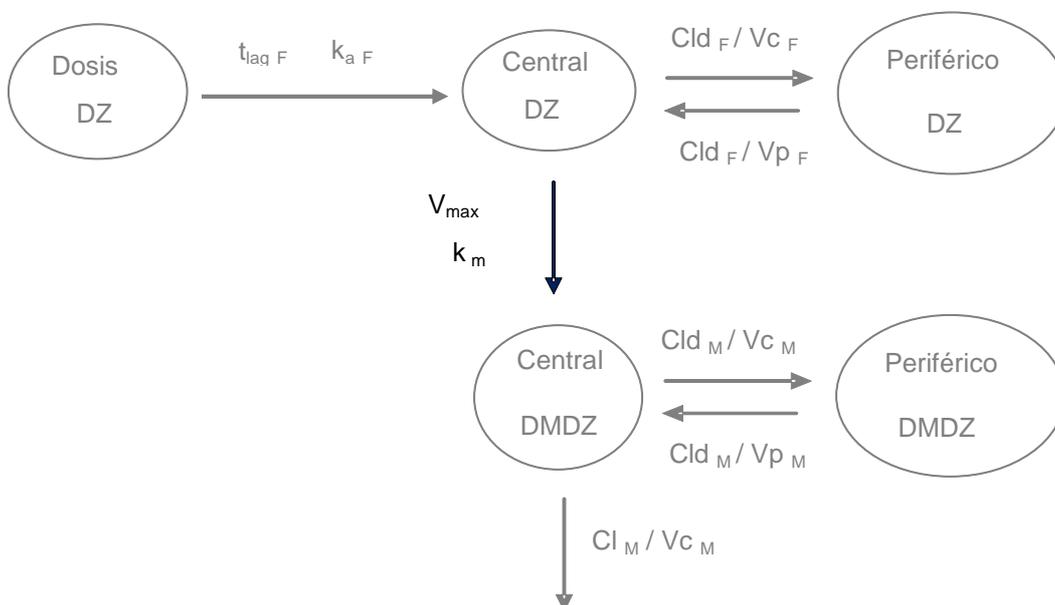
**Figura 7:** Representación gráfica del modelo en que solo una fracción ( $f$ ) de las concentraciones plasmáticas de DZ se transforma en DMDZ siguiendo un proceso de primer orden y otra fracción se elimina.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $Vc$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $Vp$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico y  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación. Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) en los parámetros para simplificar la representación.



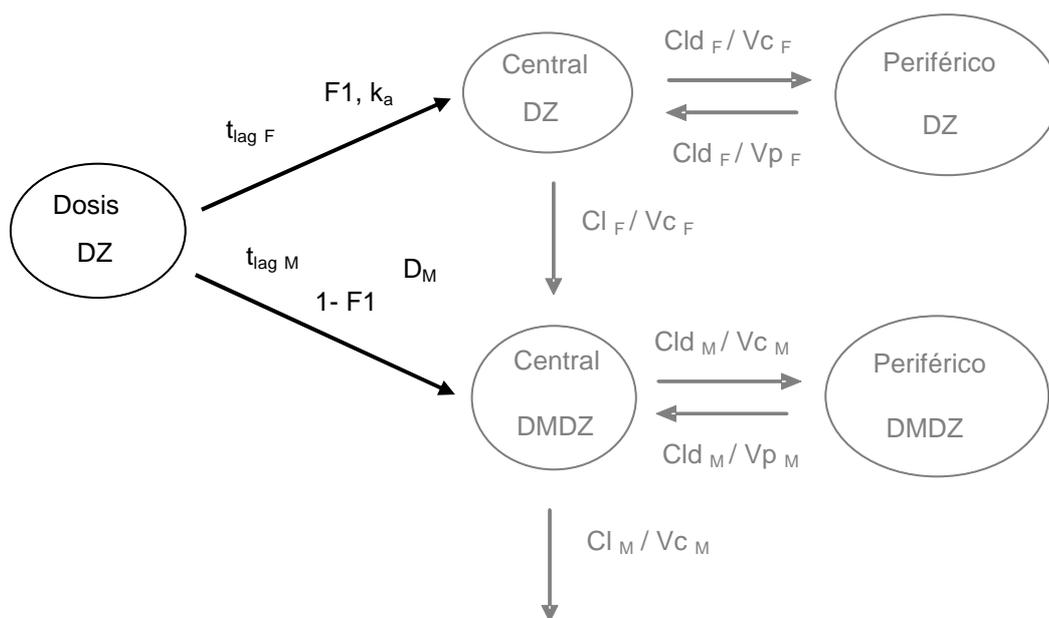
**Figura 8:** Representación gráfica del modelo en que las concentraciones plasmáticas de DMDZ se forman a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ pero incorporando un compartimento de retraso.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_p$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación y  $k_0$ : constante de velocidad de tránsito de orden 0. Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación.



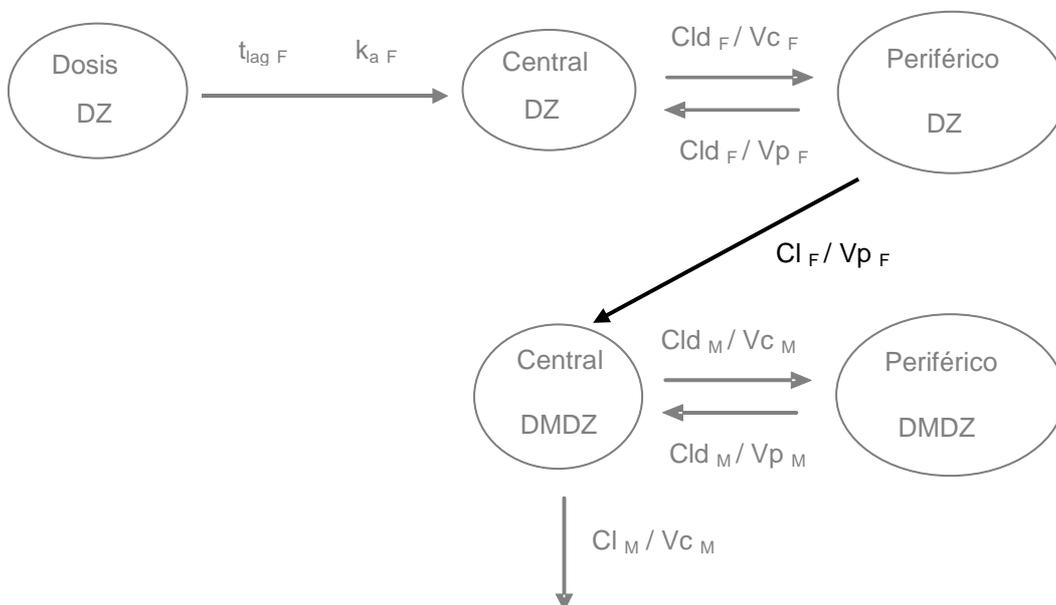
**Figura 9:** Representación gráfica del modelo en que una parte del DMDZ se produce como consecuencia de un efecto de primer paso de DZ y otra parte se forma siguiendo un proceso de primer orden a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $Vp$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación y  $k_0$ : constante de orden 0. Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente.  $F1$ , representa el porcentaje del fármaco absorbido que lo hace como fármaco. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación.



**Figura 10:** Representación gráfica del modelo en que DMDZ se forma a partir de DZ siguiendo una cinética saturable.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $Vp$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de saturación,  $V_{max}$ : velocidad máxima de transformación de DZ en DMDZ cuando el sistema está saturado y  $k_m$ : constante de Michaelis Menten (concentración que produce el 50% de  $V_{max}$ ). Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación.



**Figura 11:** Representación gráfica del modelo igual que figura 4, pero en el que la formación de DMDZ se produce como consecuencia de un efecto de primer paso siguiendo un proceso de orden cero.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $Vc$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $Vp$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación y  $D_M$ : duración del efecto de primer paso de orden 0. Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente.  $F1$ , representa el porcentaje del fármaco absorbido que lo hace como fármaco. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación.



**Figura 12:** Representación gráfica del modelo en que DMDZ se forma a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ en el compartimento periférico.  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $Vc$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cld$ : aclaramiento aparente de distribución,  $Vp$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación, Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación.

## b) Desarrollo del sub-modelo estadístico

Esta parte del modelo describió las diferencias entre los valores de un parámetro para un individuo típico de la población de estudio respecto a los valores individuales del parámetro (variabilidad interindividual e interocasión) y las observaciones y predicciones del modelo (variabilidad residual). En el desarrollo del sub-modelo estadístico se exploró la posibilidad de incorporar variabilidad interindividual asociada a los diferentes parámetros fijos mencionados anteriormente, además se evaluó la posibilidad de poder incorporar variabilidad interocasión puesto que se disponía de observaciones de DZ y DMDZ tras la administración de DZ en dos ocasiones diferentes, y se determinó el modelo que mejor describía el error residual para cada uno de los fármacos.

La introducción de variabilidad interindividual para la mayor parte de los parámetros fijos se llevó a cabo empleando un modelo exponencial, excepto para el tiempo de latencia, en que también se evaluó el uso de un modelo aditivo según la ecuación 12:

$$t_{lag\ i} = t_{lag} + \eta_{t_{lag\ i}} \quad (12)$$

donde  $t_{lag}$  representa el valor del tiempo de latencia del individuo típico,  $t_{lag\ i}$  el valor del tiempo de latencia para el individuo  $i$  y  $\eta_{t_{lag\ i}}$  representa la desviación de cada individuo  $i$  respecto del tiempo de latencia del individuo típico.

También se exploró la existencia de posibles correlaciones entre elementos de la matriz diagonal  $\Omega$ . En este caso, se estimó una matriz no diagonal incorporando dichas correlaciones.

Una vez estimada variabilidad interindividual en los diferentes parámetros se evaluó la posibilidad de poder cuantificar la variabilidad entre ocasiones (VIO) asumiendo diferencias debidas a la secuencia de administración o diferencias debidas al azar. En el primer caso, se asumió que 2 parámetros podían ser diferentes en función de si se habían administrado en una u otra ocasión, de manera sistemática. Así, se estimó un parámetro de efectos fijos (valor correspondiente al individuo típico poblacional para el parámetro en estudio) diferente en cada ocasión. En el caso de que las diferencias fueran debidas al azar, el valor del parámetro correspondiente al individuo típico poblacional era el mismo en ambas ocasiones y lo que variaba en función de la ocasión era la desviación de cada individuo del valor del parámetro correspondiente al individuo típico poblacional de manera aleatoria.

La variabilidad residual cuantifica las desviaciones de las predicciones del modelo respecto al valor observado. Inicialmente, dicha variabilidad se modeló con un componente aditivo ( $\varepsilon_{2j}$ ) y en los casos necesarios se incorporó un componente proporcional ( $\varepsilon_{1j}$ ). En el caso de que alguno de los componentes  $\varepsilon_1$  o  $\varepsilon_2$  se estimara 0, este se eliminaba del modelo.

## c) Desarrollo del sub-modelo de covariables

Durante el desarrollo se relacionó la información demográfica disponible, como la edad, peso, sexo, altura y raza) de los voluntarios con los parámetros del modelo estructural tanto de DZ como de DMDZ. Se realizó un análisis exploratorio preliminar que consistió en realizar un gráfico de dispersión de las 5 covariables entre sí para examinar las posibles correlaciones entre ellas y calcular sus coeficientes de correlación. No se incluyó la representación gráfica de las dos covariables categóricas entre sí (sexo y raza) porque no aportó ninguna información.

El siguiente paso fue la representación gráfica de los parámetros bayesianos individuales obtenidos en el modelo básico (sin covariables) frente a las covariables, para investigar posibles correlaciones entre ambos. Se utilizó una función de suavizado (función de tendencia) para realzar la forma de la relación en los gráficos y se calculó el coeficiente de regresión ( $r$ ). Una vez realizada esta exploración preliminar se identificaron covariables candidatas que tuvieran algún efecto estadísticamente significativo en los parámetros fijos mediante el empleo de modelos aditivos generalizados (GAM), y finalmente se empleó NONMEM, para determinar qué covariables de las identificadas en el GAM eran responsables de describir parte de la variabilidad interindividual asociada a los parámetros fijos.

En la aproximación GAM la relación entre los estimados de los parámetros individuales  $P_i$ , obtenidos de un modelo sin covariables y las covariables  $X_i$  se describen mediante la ecuación (13):

$$P_i = \alpha + f_1(X_{1i}) + f_2(X_{2i}) + \dots + f_n(X_{ni}) \quad (13)$$

donde,  $\alpha$  es un punto de corte y la función  $f_n(\ )$  representa una función, lineal o no lineal, (en forma de spline).

En cada paso intermedio del GAM cada una de las covariables se incorpora en el modelo de manera lineal o no lineal o no se incluye. La discriminación entre modelos se basa en el criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). Así, en cada paso, la covariable que resulta en una mayor disminución de AIC se retiene en el modelo. La búsqueda finaliza cuando ningún otro paso disminuye el AIC.

Posteriormente, las covariables seleccionadas en base al GAM se introdujeron de manera secuencial en NONMEM, mediante el procedimiento de "stepwise", descrito por (Mandema et al., 1992e). Las covariables se introdujeron en el modelo poblacional básico empezando por la más fuertemente correlacionada y probándose la incorporación de todas ellas. En cada paso, se probaron todas las posibles relaciones entre parámetro-covariable de manera individual. Se consideraron los siguientes criterios para escoger entre dos modelos: una diferencia en la función objetiva de NONMEM (OBJ) de más de 3.84 puntos, correspondiente con una  $p < 0.05$  se

consideró significativa para la introducción de una covariable, disminución en los errores estándar con respecto a los parámetros estimados, disminución en la variabilidad interindividual y distribución uniforme y al azar de los residuales y residuales ponderados alrededor de 0, al representarlas gráficamente frente a las concentraciones predichas.

Se utilizaron diferentes relaciones entre los parámetros farmacocinéticos y las covariables evaluadas, debido al hecho de que no es suficiente encontrar las covariables que puedan estar correlacionadas de manera significativa con los parámetros farmacocinéticos, sino que la determinación de la forma en que están relacionadas es también importante. Las covariables continuas, que tienen una escala definida y pueden ser cuantificadas, se modelaron:

i) como una relación lineal

$$P_{pop} = \theta_1 + \theta_2 * covariable \quad (14)$$

donde  $P_{pop}$  es el valor del individuo típico poblacional para el parámetro  $P$ ,  $\theta_1$  es el valor del parámetro  $P$  cuando la covariable es 0 y  $\theta_2$  es la pendiente que representa el cambio en el parámetro  $P$  por cada unidad de cambio en la covariable de manera lineal.

ii) como una relación lineal sin ordenada en el origen,

$$P_{pop} = \theta_1 * covariable \quad (15)$$

en que  $P_{pop}$  es el valor del individuo típico poblacional para el parámetro  $P$  y  $\theta_1$  es la pendiente que representa el cambio en el parámetro  $P$  con la covariable de manera lineal. Este modelo asume que el parámetro tiene un valor 0, cuando el valor de la covariable es 0.

iii) como una relación lineal centrando las covariables en su mediana y/o en su media

$$P_{pop} = \theta_1 + \theta_2 * (covariable - mediana) \quad (16)$$

$$P_{pop} = \theta_1 + \theta_2 * (covariable - media) \quad (17)$$

donde que  $P_{pop}$  es el valor del individuo típico poblacional para el parámetro  $P$ ,  $\theta_1$  es el valor del parámetro  $P$  para un individuo con el valor de la covariable igual al valor de la mediana o la media y  $\theta_2$ , es el cambio en el parámetro  $P$  por cada unidad de cambio de la covariable respecto a la media o a la mediana.

iv) en forma de potencia,

$$P_{pop} = \theta_1 * covariable^{-\theta_2} \quad (18)$$

donde  $P_{pop}$  es el valor del individuo típico poblacional para el parámetro  $P$ ,  $\theta_1$  es el valor del parámetro  $P$  cuando la covariable es 0 y  $\theta_2$  es la disminución del parámetro  $P$  con la covariable en forma de potencia,

v) en forma exponencial

$$P_{pop} = \theta_1 * e^{-\theta_2 * covariable} \quad (19)$$

donde que  $P_{pop}$  es el valor del individuo típico poblacional para el parámetro  $P$ ,  $\theta_1$  es el valor del parámetro  $P$  cuando la covariable es 0 y  $\theta_2$  es la pendiente de disminución del parámetro  $P$  con la covariable de manera exponencial.

En el caso del peso, también se probó un modelo alométrico (Holford, 1996) para Cl/F y Vc/F codificado mediante la expresión:

$$P_{pop} = \theta_1 * \left( \frac{peso_i}{peso_{st}} \right)^{0.75} \quad (20)$$

donde  $P_{pop}$  es el valor del individuo típico poblacional para el parámetro  $P$  (Cl/F o Vc/F),  $peso_i$  es el peso corporal de ese individuo,  $peso_{st}$  es el peso medio estándar (70 kg en individuos adultos),  $\theta_1$  es el valor del parámetro  $P$  cuando el peso del individuo se corresponde con el peso medio estándar y 0.75, el parámetro escalar para Cl/F. En el caso de Vc/F, el parámetro escalar es 1.

Las covariables categóricas, sexo y raza, se categorizaron como dicotómicas, asignándoles el valor de 1 en el caso de ser mujer o caucásico respectivamente, o el valor de 2 en el caso de ser hombre u oriental respectivamente. Dichas covariables se modelaron como  $\theta_1$ , si la variable estaba codificada como 1 o como  $\theta_2$  si la variable estaba codificada como 2, siendo  $\theta_1$  y  $\theta_2$  los valores poblacionales del parámetro.

#### 4.4.2.- Farmacodinamia

El análisis farmacodinámico modelo dependiente se realizó solamente para evaluar el EEG. De las variables generadas a partir del EEG, se analizó la variable poder relativo beta (porcentaje de actividad de 15 a 30 Hz).

##### 4.4.2.1.- Análisis exploratorio de datos

La exploración gráfica de la variable poder relativo beta, obtenida a partir del EEG se realizó con los programas S-PLUS 6.1 y Xpose 3.0. Los gráficos realizados fueron: curso temporal de las observaciones de todos los individuos incorporando la media, observaciones individuales vs concentraciones individuales predichas por el modelo farmacocinético seleccionado, añadiendo la media.

#### 4.4.2.2.- Desarrollo del modelo farmacodinámico

Tras fijar los estimados bayesianos individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos con los modelos farmacocinéticos seleccionados para la administración de DZ y de DMDZ, se procedió al análisis de la variable farmacodinámica (poder relativo beta) utilizando de nuevo los tres sub-modelos interrelacionados (sub-modelo estructural, sub-modelo estadístico y sub-modelo de covariables).

El desarrollo del modelo farmacodinámico se realizó en las siguientes 4 etapas:

- 1.- Desarrollo del modelo farmacodinámico de DMDZ tras administración de DMDZ
- 2.- Desarrollo del modelo farmacodinámico de DZ tras la administración de DZ, fijando los estimados bayesianos de los parámetros farmacodinámicos de DMDZ obtenidos en la etapa 1.
- 3.- Desarrollo del modelo farmacodinámico de DZ tras la administración de DZ, fijando los estimados poblacionales de los parámetros farmacodinámicos de DMDZ obtenidos en la etapa 1.
- 4.- Desarrollo del modelo farmacodinámico de DZ y DMDZ de manera simultánea.

En cada una de estas etapas se siguió la misma secuencia de pasos detallada a continuación: a) en primer lugar se determinó el modelo estructural, b) seguidamente se procedió al desarrollo del modelo estadístico y c) finalmente se determinó el modelo de covariables.

a) Desarrollo del sub-modelo estructural

Para describir la relación entre las concentraciones plasmáticas de DMDZ y los efectos observados en el poder relativo beta, se utilizaron los siguientes modelos estructurales incorporando en todos ellos efecto basal: modelo lineal, modelo de efecto máximo, modelo de efecto máximo sigmoide, modelo de tolerancia (Porchet et al., 1988) y modelo de efecto máximo reparametrizado (Schoemaker et al., 1998).

Para describir la relación entre las concentraciones plasmáticas de DZ y los efectos observados en el poder relativo beta, se emplearon los modelos anteriormente descritos para DMDZ excepto el modelo de tolerancia.

Como modelos de interacción se emplearon modelos de aditividad de los efectos de DZ y DMDZ o modelos de interacción competitiva.

## b) Desarrollo del sub-modelo estadístico

De la misma manera que se realizó en el análisis farmacocinético, la variabilidad interindividual se probó en todos los parámetros utilizando una ecuación exponencial para su estimación.

La variabilidad residual se modeló de manera aditiva ( $\varepsilon_{ij}$ ) (ver ecuación 21, para su estructura). Además, se comprobó si era necesario un error residual para el fármaco y otro para el metabolito según la ecuación 21:

$$E_{obsij} = E_{predij} + \varepsilon_{ij_{DZ}} + \varepsilon_{ij_{DMDZ}} \quad (21)$$

También se estudió la presencia de variabilidad entre ocasiones en los parámetros farmacodinámicos que presentaban variabilidad interindividual, del mismo modo descrito para la farmacocinética (ver apartado 4.4.1.1.2 b) Por último, se exploró la existencia de posibles correlaciones entre elementos de la matriz diagonal  $\Omega$ , tanto gráficamente como estimando una matriz no diagonal que incorporara dichas correlaciones.

## c) Desarrollo del sub-modelo de covariables

Para identificar posibles factores que influenciaran la farmacodinamia se representaron gráficamente los parámetros bayesianos individuales obtenidos en el modelo básico (modelo de efecto máximo reparametrizado) frente a las covariables, utilizándose una función de suavizado para realzar la forma de la relación en los gráficos. Además se utilizó en coeficiente de regresión de Spearman "r", para tener una idea más objetiva de las posibles correlaciones. Al no detectar ninguna correlación, no se incorporó ninguna covariable.

#### 4.4.3.- Criterios de selección del modelo

Como criterios de selección del modelo se evaluaron:

- Plausibilidad de los valores de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (efectos fijos y aleatorizados).
- La función objetiva que proporciona NONMEM se utilizó como criterio para discriminar entre modelos jerárquicos utilizando el test de máxima verosimilitud (Boeckman AJ, 1994). Este test estadístico se utiliza para comparar dos modelos anidados y sigue una distribución aproximadamente chi cuadrado ( $\chi^2$ ) con grados de libertad igual a la diferencia en el número de parámetros entre los dos modelos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de

$p=0.05$ , que se tradujo en una disminución en la OBJ de 3.84 puntos (grados de libertad,  $gl=1$ ).

Los gráficos de bondad de ajuste obtenidos empleando los programas Xpose 3.0 y S-PLUS 6.1 incluyeron: Observaciones vs predicciones poblacionales, observaciones vs predicciones individuales, iwres vs ipred, iwres vs logaritmo del tiempo (farmacocinética) y ires vs concentraciones plasmáticas (farmacodinamia).

Si el modelo estructural era el apropiado, la línea de tendencia de los datos debía coincidir con la línea identidad, o con la línea de ordenada cero según la gráfica.

#### **4.4.4.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo**

Todos los modelos considerados finales en las diferentes etapas del análisis tanto farmacocinético como farmacocinético / farmacodinámico se evaluaron realizando un “visual predictive check”, o comprobación predictiva visual.

Para ello se generaron 1000 perfiles individuales (de concentraciones plasmáticas o efectos) mediante simulaciones de Monte Carlo para lo que se fijaron los parámetros fijos y aleatorizados a los obtenidos en el modelo seleccionado. Se determinaron intervalos de predicción del 90 y 95% para la farmacodinamia y la farmacocinética, respectivamente y se representaron frente a los efectos observados o a las concentraciones plasmáticas observadas frente al tiempo, respectivamente. En estas gráficas además se añadió el promedio de las simulaciones (farmacocinéticas o farmacodinámicas).

#### **4.4.5.- Simulaciones**

##### **4.4.5.1.- Contribución del DMDZ en el efecto observado tras administrar una dosis de 30 mg de DZ**

A partir del modelo farmacocinético final seleccionado (modelo simultáneo para DMDZ y DZ) como farmacodinámico DMDZ y DZ (modelo FD fijando los estimados bayesianos de DMDZ), simulamos el efecto sobre la variable poder relativo beta que se observaría tras la administración de 30mg de DZ, así como el efecto debido a cada una de las dos especies. Al efecto medio obtenido a cada tiempo se le restó el efecto basal y a partir de estos datos calculó el AUC del efecto global predicho por el modelo y el AUC del efecto predicho por el modelo para DZ y DMDZ utilizando WinNonLin Profesional 2.1 (Pharsight, 1994-1998).

#### **4.4.5.2.- Efecto predicho por el modelo sobre el EEG en el estado equilibrio estacionario tras administrar dosis clínicas de DZ de 5 mg/12 h y contribución de DMDZ en dicho efecto**

A partir del modelo farmacocinético final seleccionado (modelo simultáneo para DMDZ y DZ) como farmacodinámico DMDZ y DZ (modelo FD fijando los estimados bayesianos de DMDZ), simulamos el efecto que provocaría la administración de 5 mg de DZ cada 12 horas en el estado de equilibrio estacionario en el poder relativo beta entre 0 y 12 horas tras la administración del fármaco, para determinar si el EEG se vería modificado a esas dosis. En estas simulaciones también se simuló el efecto debido al DMDZ. Se calculó el AUC de 0 a 12 h de cada una de estas curvas (efecto DMDZ y efecto total), y se cuantificó la contribución del DMDZ mediante el cálculo del ratio entre ambas AUC expresado en porcentaje.

#### **4.4.5.3.- Búsqueda de la dosis de DMDZ equivalente a 5 mg /12 h de DZ**

Teniendo en cuenta que las dosis ansiolíticas de DZ habituales en la práctica clínica oscilan entre 5 y 10 mg al día cada 12 h, simulamos el efecto medido como cambio en el poder relativo beta del EEG (que se postula que está relacionado con el efecto ansiolítico) que obtendríamos con una dosis de 5 mg de DZ cada 12 h. A continuación, se simuló el efecto que producirían diferentes dosis de DMDZ cada 12 y cada 24h para encontrar la que tuviera un perfil de efecto más parecido al de DZ.

Las simulaciones del efecto producido por DZ se realizaron fijando los estimados de los parámetros obtenidos tras el análisis farmacocinético simultáneo de DZ y DMDZ y el análisis farmacodinámico de DZ fijando los estimados bayesianos de los parámetros farmacodinámicos de DMDZ. En el caso del DMDZ se emplearon los parámetros estimados por el modelo farmacocinético y farmacodinámico seleccionados tras la administración de DMDZ.

Considerando que la semivida de eliminación de DMDZ es más larga que la de DZ y que por tanto sus concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio estacionario se alargan más en el tiempo, se simularon dosis únicas diarias de 5, 10, 20 y 30 mg de DMDZ; aunque también se simularon diferentes administraciones cada 12 h de 5, 10, 15 y 30 mg de DMDZ.

Se seleccionó la dosis de DMDZ que produjo un perfil de efectos dentro del rango de efectos que se observarían tras administrar DZ.

## 5.- RENDIMIENTO PSICOMOTOR (test de cancelación d2) y VAS

### 5.1.- TEST DE CANCELACIÓN d2

El test de cancelación d2 es una prueba que permite medir el nivel de atención selectiva (capacidad para centrarse en uno o dos estímulos importantes, mientras se suprime deliberadamente la consciencia de otros estímulos distractores) y concentración mental (funcionamiento adecuado de la motivación y del control de la atención) (Bates and Lemay, 2004; Brickenkamp, 1962; Brickenkamp and Zillmer, 1998b; Seisdedos, 2004) y que se ha mostrado útil para evaluar los efectos de fármacos que actúan a nivel de SNC (Barbanoj et al., 2006; Barbanoj et al., 2007; Garcia-Gea et al., 2010).

Es una prueba de lápiz y papel en la que se presentan estímulos visuales muy similares en dos páginas cada una compuesta por 9 líneas que contienen 47 símbolos (Barbanoj et al., 2007). La tarea consistió en cancelar (marcar con un trazo) una “d” con 2 guiones situados uno encima y otro debajo. Estos caracteres están intercalados con otros (una “d” con más o menos de 2 guiones y caracteres “p” con diferentes números de guiones). El tiempo disponible para cada línea fue de 10 segundos y el control temporal se efectuó mediante una grabación en un casete con el fin de evitar las alteraciones que un observador podría producir en la atención del sujeto. Las variables evaluadas fueron el número de símbolos cancelados correctamente (d2c) y el número de símbolos totales cancelados (d2t).

Los puntos temporales a los que realizó el test fueron en basal, y a +5, +10, +15, +30, +45 y +60 min y +1.5, +2, +2.5, +3, +4, +6, +8, +10 y +12 h tras la administración de cada tratamiento.

### 5.2.- ESCALAS ANALÓGICAS VISUALES (VAS)

Para evaluar el grado de actividad del voluntario y el grado de somnolencia de forma subjetiva se utilizaron escalas analógicas visuales (VAS) que son medidas validadas de experiencia subjetiva (Hindmarch and Gudgeon, 1980; Luria, 1975). Se proporcionaron a los sujetos 2 pares de palabras que expresaban estados de ánimo opuestos, separadas por una línea horizontal de 100 mm. El sujeto tuvo que marcar con un trazo vertical la posición sobre la línea horizontal que mejor reflejaba su sensación en ese momento, no pudiendo identificar las respuestas previas dadas por él mismo. La colocación del trazo se midió en milímetros desde el extremo izquierdo de la línea. Para definir el grado de actividad se emplearon como descriptores las palabras activo-pasivo, y para definir el grado de somnolencia somnoliento-despierto (Bond A and M, 1974).

Los puntos temporales a los que realizaron los VAS fueron en basal, y a +5, +10, +15, +30, +45 y +60 min y +1.5, +2, +2.5, +3, +4, +6, +8, +10 y +12 h tras la administración de cada tratamiento.

### 5.3.- ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis tanto de las variables derivadas del test de cancelación (d2c, d2t) y de los VAS (activo-pasivo, somnoliento-despierto), se realizaron las siguientes etapas: i) análisis exploratorio, ii) generación de variables, iii) análisis estadístico.

#### 5.3.1.- Análisis exploratorio

Se promediaron los valores individuales obtenidos tras los 4 tratamientos y se representó gráficamente el curso temporal de las variables d2c, d2t, VAS (activo-pasivo) y VAS (somnoliento-despierto).

Posteriormente, se expresaron los resultados individuales como diferencia respecto del valor basal y se volvieron a representar gráficamente el promedio de las variables, para realizar una primera inspección sin tener presente el posible efecto del valor basal en el curso temporal de la variable farmacodinámica.

#### 5.3.2.- Generación de variables

A partir de los valores individuales expresados como diferencia del valor basal, mediante inspección visual de los datos se halló el punto temporal ( $t_{max}$ ) en el cuál se observaba mayor efecto ( $E_{max}$ ), para cada tratamiento y para cada una de las variables. Además se calculó, utilizando el método de los trapecios, el área bajo la curva  $AUC_0^t$  (siendo t el punto temporal con la última observación) del efecto tras cada tratamiento para cada una de las 4 variables: d2c, d2t, VAS (S-D) y VAS (A-P). Los parámetros se calcularon utilizando métodos no compartimentales con WinNonLin Profesional 2.1 (Pharsight, 1994-1998).

### 5.3.3.- Análisis estadístico

#### 5.3.3.1.- Evaluación de la situación basal

A los valores directos premedicación obtenidos antes de cada tratamiento se les aplicó un ANOVA de un factor (tratamiento), de medidas repetidas para comprobar la similitud de las condiciones basales antes de evaluar los 4 tratamientos. En caso de detectar diferencias en condiciones basales, se efectuó un test de t de Student pareado para saber entre qué tratamientos se hallaban las diferencias en condiciones basales.

#### 5.3.3.2.- Efecto global de los tratamientos

Para evaluar el efecto global de los tratamientos se realizó un ANOVA de 2 factores sobre los valores de efecto medido, y se compararon los valores de AUC,  $E_{max}$  y  $t_{max}$  (obtenidos una vez restado el valor basal a los datos directos) entre tratamientos. A los valores directos obtenidos tras placebo, 30 mg de DZ1, 30 mg de DZ2 y 30 mg de DMDZ en condiciones basales y a los 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 h post-medicación se les aplicó una ANOVA de 2 factores (tratamiento y tiempo) de medidas repetidas para cada variable (d2t, d2c, VAS [somnoliento-despierto], VAS [activo-pasivo]), para detectar posibles diferencias entre tratamientos a lo largo del tiempo. Una vez restado el valor basal a los valores directos, se realizó el promedio y la desviación estándar del  $AUC_0^{12}$  para cada tratamiento y cada variable. Posteriormente, se realizó un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en cada una de las variables para los 4 tratamientos. Seguidamente mediante un test de t de Student pareado se evaluó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos.

Se calculó el promedio y la desviación estándar del  $E_{max}$  para cada tratamiento y cada variable. Se realizó un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas a los valores de  $E_{max}$  para ver si existían diferencias en cada una de estas variables en función del tratamiento. Posteriormente se realizó un test de t de Student pareado para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos.

Se calculó la mediana y el rango de  $t_{max}$  para cada tratamiento y cada variable. Se realizó un test de Friedman de un factor (tratamiento) a los valores de  $t_{max}$  para ver si existían diferencias en cada una de estas variables en función del tratamiento. Posteriormente se realizó un test de Wilcoxon pareado para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre pares de tratamientos.

### **5.3.3.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto.**

En caso de detectar diferencias por tratamiento y tiempo en las variables con los datos directos, realizamos un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo a cada tratamiento con el propósito de evidenciar en qué tratamientos se hallaban las diferencias y seguidamente se realizó un test de t de Student pareado para muestras relacionadas, comparando los 15 pares de tiempos, (tiempo basal con cada uno de los tiempos consecutivos) en cada tratamiento y para las 2 variables.

A continuación, se realizó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo con el objetivo de saber a qué tiempos se hallaban las diferencias entre los tratamientos. Para realizar esta estadística, los datos de las variables se expresaron como diferencia respecto del valor basal. El siguiente paso, fue realizar un test de t de Student pareado para muestras relacionadas, comparando las 6 posibles combinaciones de tratamientos a cada tiempo.

### **5.3.3.4.- Reproducibilidad del efecto observado**

Para ver si era reproducible el efecto observado tras la administración de 30 mg de DZ en 2 ocasiones diferentes (DZ1 y DZ2), se calcularon coeficientes de correlación intraclass, con los datos corregidos respecto del valor basal tanto a nivel de voluntario como a nivel de tiempo, para las variables de rendimiento psicomotor (d2c y d2t) y las escalas analógicas visuales (VAS) .

## **6.- SEGURIDAD**

### **6.1.- ACONTECIMIENTOS ADVERSOS**

Para evaluar los acontecimientos adversos, se realizó una valoración tras pregunta abierta: ¿Nota algún síntoma o molestia?, a los tiempos +30 min, +1, +2, +4, +8, +12 y +24 h. Además, se advirtió a los sujetos, de que en cualquier momento en que notaran alguna molestia, lo notificaran al investigador y se anotó cualquier acontecimiento adverso durante el transcurso del estudio.

Los acontecimientos adversos registrados se resumieron en una tabla donde se detalló el número de veces de cada acontecimiento adverso en función del tratamiento. Además, los acontecimientos adversos registrados, se codificaron mediante el sistema de clasificación de órganos a través de MedDRA (versión 15.1) en 4 tablas.

### **6.2.- EFECTOS CARDIOVASCULARES**

A los tiempos basal y +30, +60, +120, +240, +480, +720 y +1440 min tras administración de cada tratamiento, se midieron la presión arterial sistólica y diastólica (TAS y TAD respectivamente), y la frecuencia cardíaca (FC), mediante el sistema DINAMAP CRITIKON 8100 en posición de decúbito supino (manteniendo el brazo a una altura próxima a la del corazón y tras 5 minutos de sedestación).

Se promediaron los valores de las constantes vitales obtenidos tras los 4 tratamientos entre todos los voluntarios y se representó gráficamente el curso temporal de cada una de las variables (TAS/TAD y FC).

#### **6.2.1.- Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de cada una de las variables cardiovasculares estudiadas (TAS, TAD, FC) se realizaron las siguientes evaluaciones:

### **6.2.1.1.- Evaluación de la situación basal**

A los valores directos premedicación obtenidos antes de cada tratamiento se les aplicó un ANOVA de un factor (tratamiento), de medidas repetidas para comprobar la similitud de las condiciones basales antes de evaluar los 4 tratamientos.

### **6.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos**

A los valores directos obtenidos tras placebo, 30 mg de DZ1, 30 mg de DZ2 y 30 mg de DMDZ en condiciones basales y a los 30 min, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h post-medicación se les aplicó una ANOVA de 2 factores (tratamiento y tiempo) de medidas repetidas, para detectar posibles diferencias entre tratamientos a lo largo del tiempo.

### **6.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto**

En caso de detectar diferencias por tratamiento y tiempo en las variables con los datos directos, realizamos un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo a cada tratamiento con el propósito de evidenciar en qué tratamientos se hallaban las diferencias y seguidamente se realizó un test de t de Student pareado para muestras relacionadas, comparando los 7 pares de tiempos, (tiempo basal con cada uno de los tiempos consecutivos) en cada tratamiento y para las 3 variables.

A continuación se realizó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo con el objetivo de saber a qué tiempos se hallaban las diferencias entre los tratamientos. Para realizar esta estadística, los datos de las variables se expresaron como diferencia respecto del valor basal. El siguiente paso, fue realizar un test de t de Student pareado para muestras relacionadas, comparando las 6 posibles combinaciones de tratamientos a cada tiempo.



---

---

**V.**

# **Resultados**

---

---



## 1.- SUJETOS

Se seleccionaron un total de 25 voluntarios, de los que se incluyeron 16. Todos los sujetos incluidos en el estudio completaron su participación. La tabla 1 recoge las características demográficas de los voluntarios incluidos en el estudio:

**Tabla 1.** Características demográficas de los voluntarios

Covariables	Media* $\pm$ DE	Rango
Peso (kg)	63.8 $\pm$ 7.18	53 - 74.5
Altura (cm)	168 $\pm$ 8.3	156 - 183
Edad (años)	24.1 $\pm$ 4.12	20 - 36
Sexo (♀ / ♂)	8 / 8	-----
Raza (caucásica /oriental)	12 / 4	-----
Índice de Quetelet	22.13 $\pm$ 1.73	20 - 25

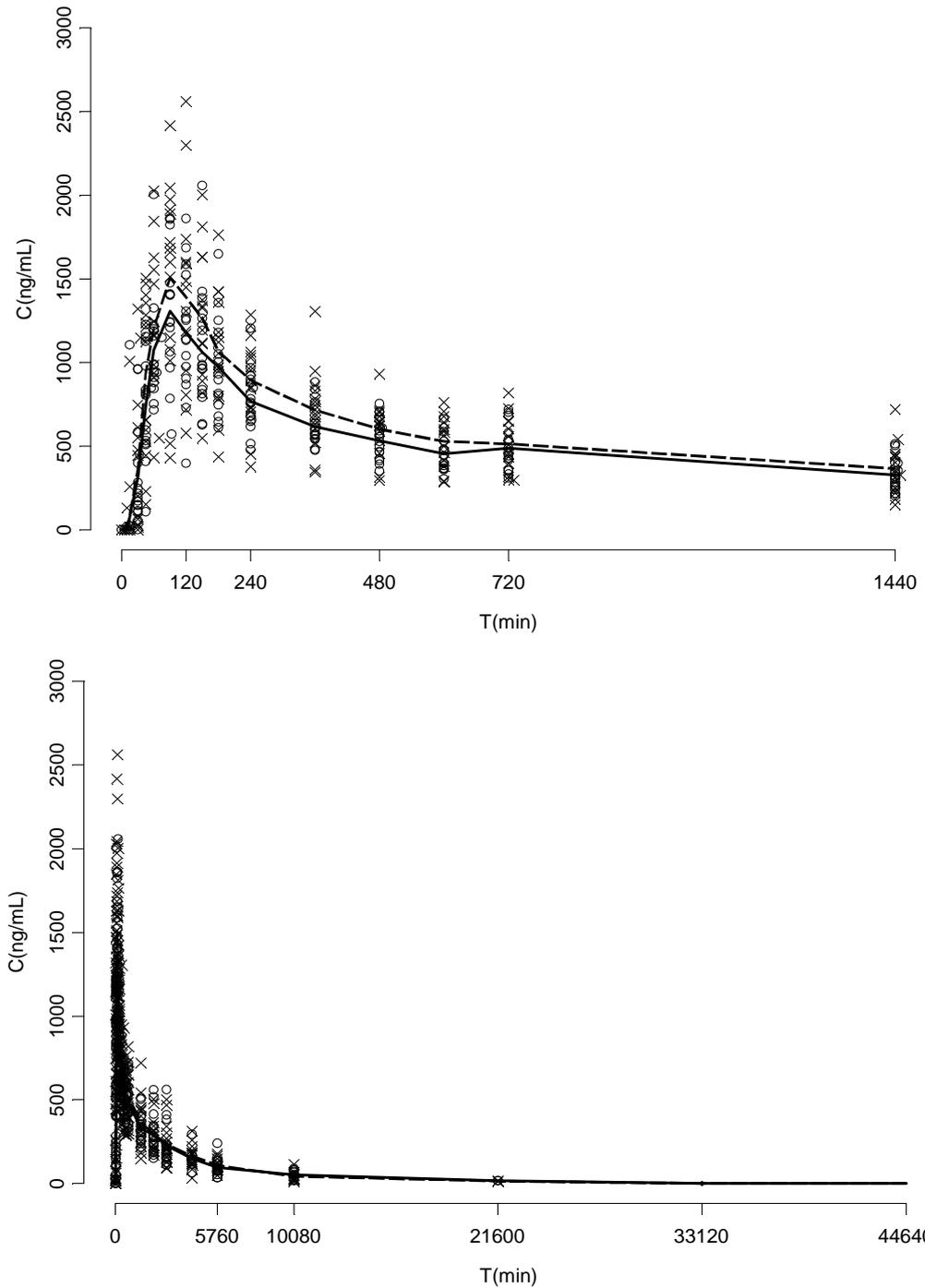
\*: para las covariables sexo y raza, se expresa el número de voluntarios.

## 2.- ANALISIS MODELO INDEPENDIENTE

### 2.1.- FARMACOCINÉTICA

#### 2.1.1.- Análisis exploratorio de los datos

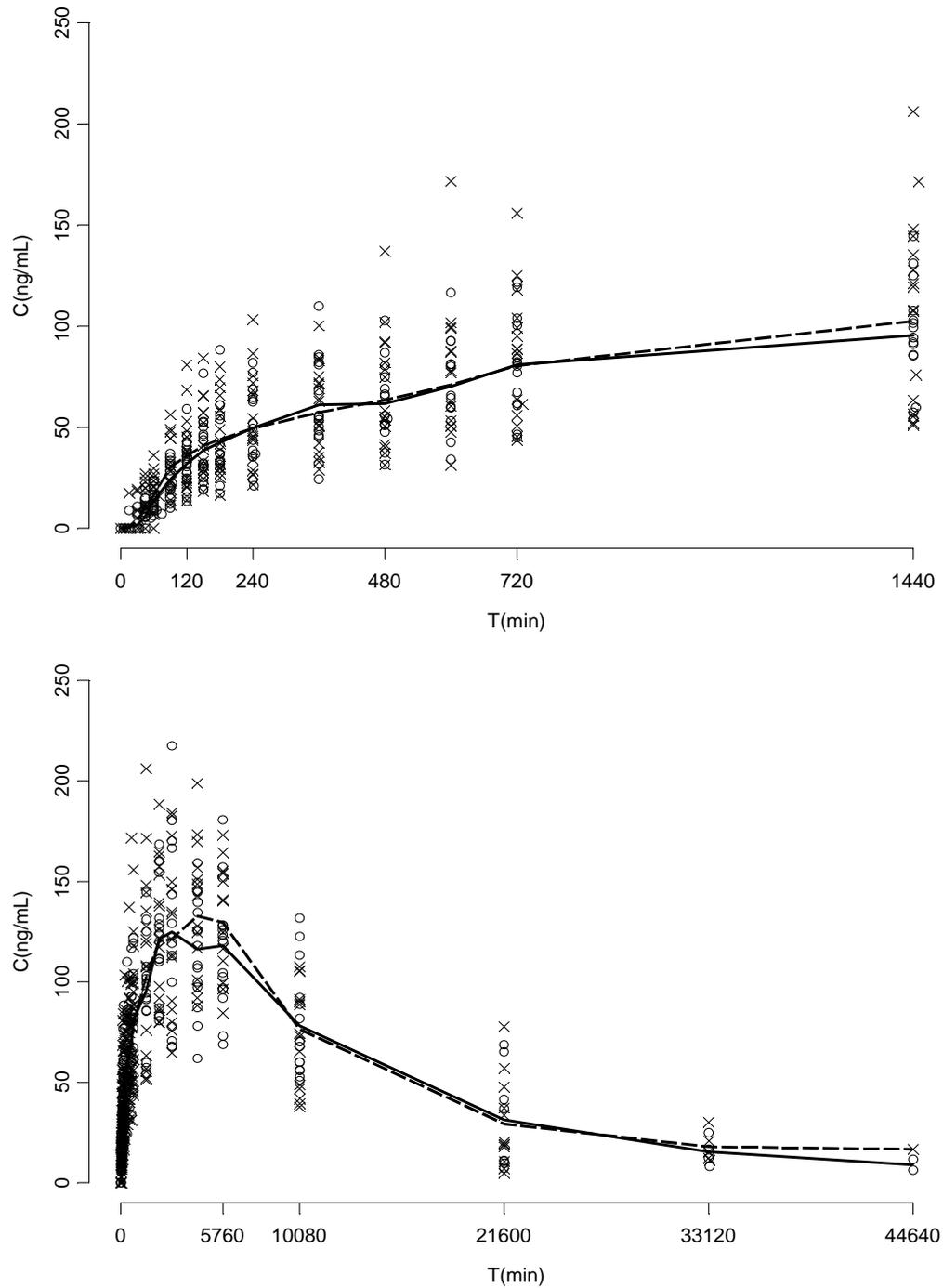
En el gráfico exploratorio de las concentraciones plasmáticas medidas tras la administración de una dosis de 30 mg de DZ en 2 ocasiones diferentes (Figura 13) se observó que la media de las concentraciones plasmáticas tras la segunda administración de DZ (DZ2) fue ligeramente superior en todo el curso temporal del fármaco respecto de la primera vez que se administró DZ (DZ1), alcanzándose el máximo de concentraciones plasmáticas tras aproximadamente 90 min en ambas ocasiones.



**Figura 13:** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de DZ, tras la administración de 30 mg DZ en 2 ocasiones diferentes (DZ1, DZ2). Panel superior hasta las 24 h (1440 min) y panel inferior hasta las 744 h (44640 min). Los círculos representan las observaciones tras DZ1 y las cruces tras DZ2. La línea continua y la discontinua representan la media de las concentraciones plasmáticas observadas tras DZ1 y DZ2 respectivamente.

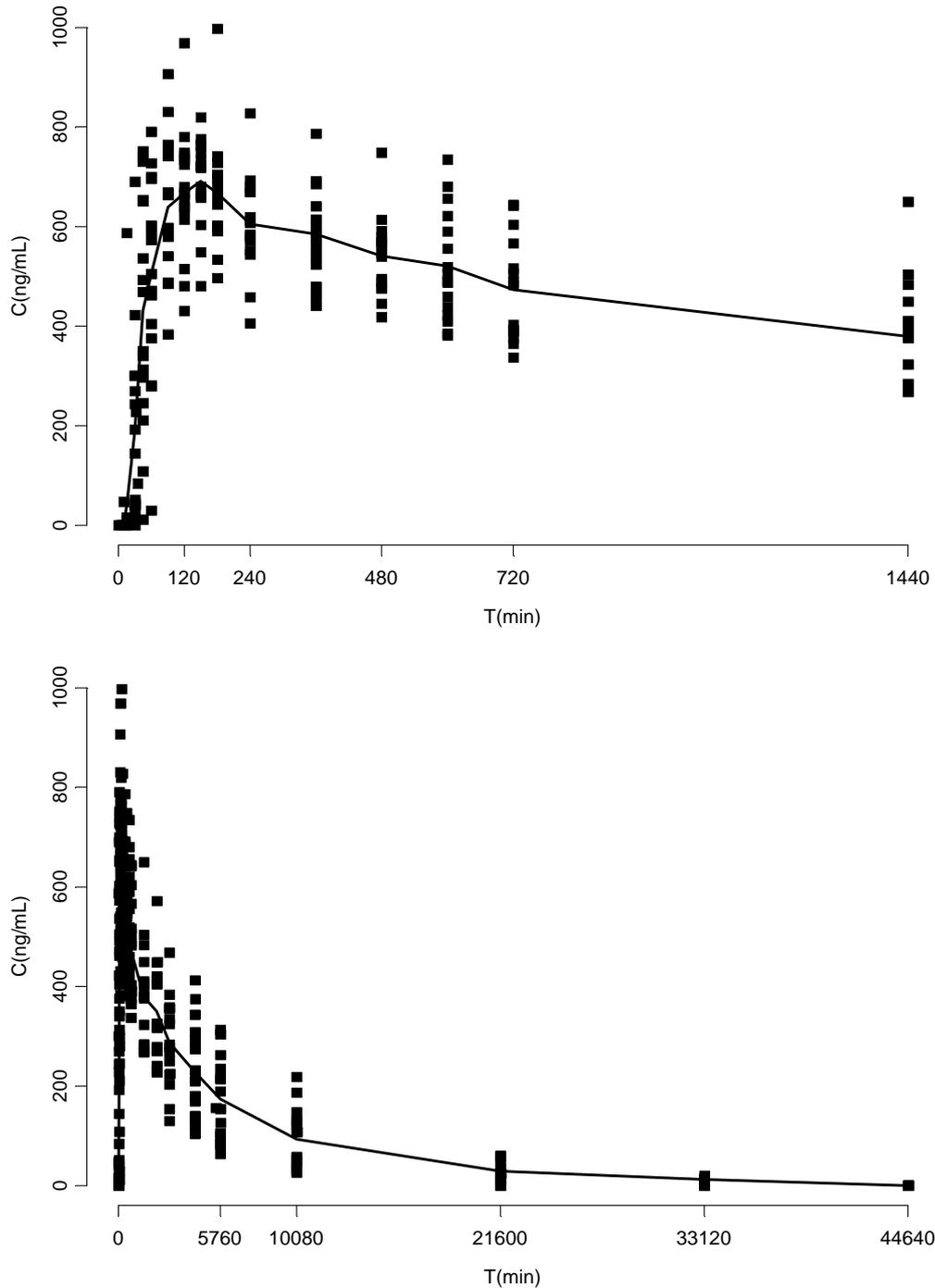
En la Figura 14 se representan las concentraciones plasmáticas de DMDZ generadas tras la administración de una dosis de 30 mg de DZ en 2 ocasiones diferentes. A diferencia de lo que ocurrió con las concentraciones de DZ, no se observaron diferencias aparentes en la media de las concentraciones plasmáticas de DMDZ generadas tras la administración de DZ1 y DZ2. El máximo

de concentraciones plasmáticas de DMDZ no se alcanzó hasta los 2500-4000 min en función de la ocasión, es decir entre las 42 y las 67 h.



**Figura 14:** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de DMDZ1 y DMDZ2, tras la administración de 30 mg DZ en 2 ocasiones diferentes (DZ1, DZ2). Panel superior hasta las 24 h (1440 min) y panel inferior hasta las 744 h (44640 min). Los círculos representan las observaciones de DMDZ1 tras DZ1 y las cruces las observaciones de DMDZ2 tras DZ2. La línea continua y la discontinua representan la media de las concentraciones plasmáticas observadas para DMDZ1 y DMDZ2 respectivamente.

En el gráfico exploratorio de las concentraciones plasmáticas observadas tras la administración de una dosis de 30 mg de DMDZ (Figura 15) se observó que, cuando se compararon con las concentraciones de DZ obtenidas tras la administración de la misma dosis las concentraciones de DMDZ fueron inferiores a las de DZ. Además el tiempo al que se alcanzaron las concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{max}$ ) fue muy inferior tras la administración de DZ (120 min vs 2500-4000 min).



**Figura 15:** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de DMDZ, tras la administración de 30 mg de DMDZ. Panel superior hasta las 24 h (1440 min) y panel inferior hasta las 744 h (44640 min). La línea continua representa la media de las concentraciones plasmáticas observadas.

### 2.1.2.- Análisis farmacocinético modelo independiente (no compartimental)

Tanto para el cálculo de la media de los parámetros como para las comparaciones estadísticas se empleó la información de 15 de los 16 voluntarios incluidos en el estudio. El voluntario número 3 se excluyó tanto del cálculo de los promedios como de la estadística debido a que presentó un perfil cinético diferente al resto de voluntarios tras la administración de DZ, con una absorción más rápida y una  $t_{1/2}$  de eliminación 7 veces superior al promedio del resto de voluntarios.

En la tabla 2 se recogen los parámetros farmacocinéticos de DZ y DMDZ tras su respectiva administración por vía oral. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de DZ obtenidos tras las diferentes administraciones. En cambio, al comparar ambas administraciones de DZ con DMDZ, tanto el AUC como la  $t_{1/2}$  de eliminación de DZ fueron inferiores, mientras que el Cl/F, y la  $C_{max}$  fueron superiores. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DZ1 y DZ2 respecto de DMDZ en  $t_{lag}$ ,  $t_{max}$  y V/F.

**Tabla 2:** Parámetros farmacocinéticos de DZ1, DZ2 y DMDZ obtenidos mediante análisis no compartimental y comparación entre ellos tras la administración de dosis de 30 mg por vía oral de DZ y DMDZ, respectivamente.

Parámetro	DZ1 <sup>(1)</sup>	DZ2 <sup>(2)</sup>	DMDZ <sup>(3)</sup>	$p_{(1) \text{ vs } (2)}$	$p_{(1) \text{ vs } (3)}$	$p_{(2) \text{ vs } (3)}$
$t_{lag}$ (min)*	15 [10-30]	15 [10-30]	15 [5-30]	0.330	0.589	0.250
$t_{max}$ (min)*	90 [45-180]	90 [45-150]	150 [45-180]	0.952	0.157	0.211
$C_{max}$ (ng/mL)	1390.40 ± 358.8	1640.28 ± 528.2	767.53 ± 86.6	0.104	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
$AUC_{0-\infty}$ (ng/mL·min)	2124130.64 ± 764563.2	2299850.74 ± 828924.4	3196337.62 ± 1397257.2	0.443	<b>0.002</b>	<b>0.009</b>
$t_{1/2}$ (min)	2883.59 ± 381.5	2671.66 ± 1070.1	4428.58 ± 1353.3	0.404	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
V/F (L)	59.22 ± 19.6	55.13 ± 29.3	64.87 ± 18.6	0.652	0.366	0.230
Cl/F (L/min)	0.016 ± 0.005	0.015 ± 0.006	0.011 ± 0.005	0.592	<b>0.002</b>	<b>0.006</b>

Los valores son el promedio el promedio ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetros expresados como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon ( $t_{lag}$ ,  $t_{max}$ ).

$t_{lag}$ , tiempo de latencia;  $t_{max}$ , tiempo al cual aparece la concentración máxima de fármaco ( $C_{max}$ );  $AUC_{0-\infty}$ , área bajo la curva de concentraciones desde tiempo 0 a tiempo infinito;  $t_{1/2}$ , semivida de eliminación; V/F, volumen aparente de distribución y Cl/F, aclaramiento aparente de eliminación.

En la tabla 3 se recogen los parámetros farmacocinéticos de DMDZ tras su administración por vía oral y tras su formación a partir de la administración de DZ. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de DMDZ obtenidos tras las diferentes administraciones de DZ. En cambio, sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DMDZ1 y DMDZ2 respecto de DMDZ para todos los parámetros. DMDZ se

detectó antes en plasma tras su administración oral que cuando se generó tras la administración de DZ. Lo mismo ocurrió con el  $t_{max}$ . Los valores de  $C_{max}$  obtenidos tras la administración de DMDZ fueron cinco veces superiores a los que se formaron cuando se administró DZ. Aunque Cl/F y V/F fueron inferiores tras la administración de DZ, la combinación de cambios en ambos parámetros resultó en una  $t_{1/2}$  mayor cuando se administró DZ. La exposición total a DMDZ tras su administración por vía oral fue un 50% mayor que la obtenida tras la administración de la misma dosis de DZ.

**Tabla 3:** Parámetros farmacocinéticos de DMDZ1, DMDZ2 y DMDZ obtenidos mediante análisis no compartimental y comparación entre ellos tras la administración de DZ1, DZ2 y DMDZ a dosis de 30 mg por vía oral.

Parámetro	DMDZ1 <sup>(1)</sup>	DMDZ2 <sup>(2)</sup>	DMDZ <sup>(3)</sup>	$p_{vs\ 2}^{(1)}$	$p_{vs\ 3}^{(1)}$	$p_{vs\ 3}^{(2)}$
$t_{lag}$ (min)*	30 [15-45]	30 [0-60]	15 [5-30]	0.442	<0.001	0.004
$t_{max}$ (min)*	2885 [2160-10085]	2880 [1440-5760]	150 [45-180]	0.209	<0.001	0.001
$C_{max}$ (ng/mL)	138.92 ± 28.4	147.03 ± 38.9	767.53 ± 86.6	0.440	<0.001	<0.001
$AUC_0^\infty$ (ng/mL·min)	2096205.67 ± 895338.5	1904300.29 ± 665912.1	3196337.62 ± 1397257.2	0.519	0.004	0.001
$t_{1/2}$ (min)	8297.65 ± 6597.9	6416.72 ± 2733.0	4428.58 ± 1353.3	0.299	0.025	0.002
V/F (L)	163.49 ± 66.7	150.07 ± 48.7	64.87 ± 18.6	0.411	<0.001	<0.001
Cl/F (L/min)	0.016 ± 0.005	0.018 ± 0.007	0.011 ± 0.005	0.490	0.001	0.001

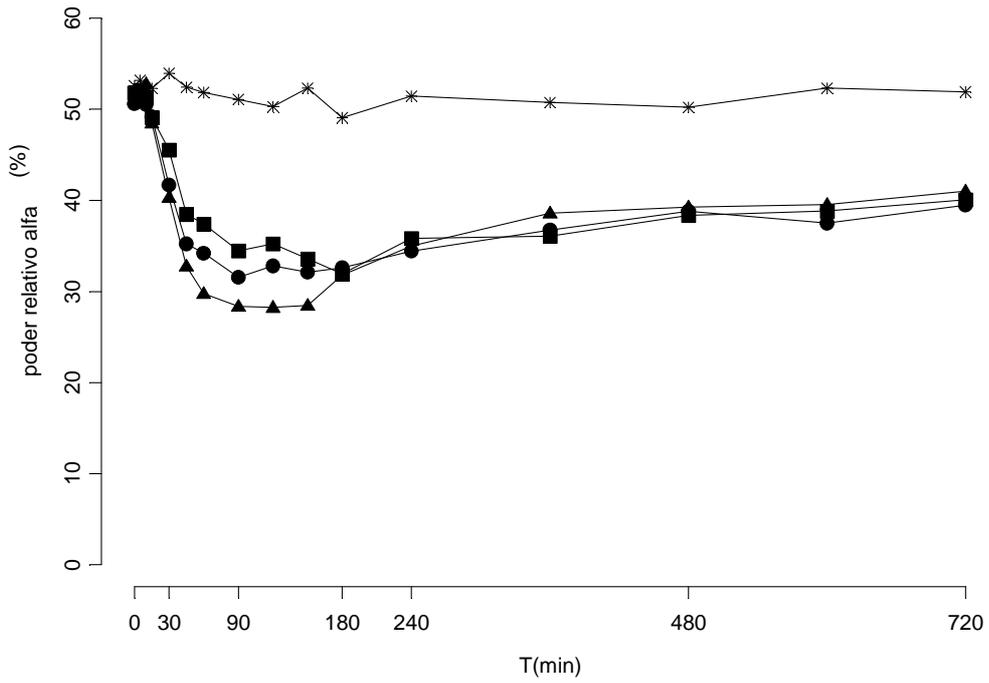
Los valores son el promedio ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetros expresados como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon ( $t_{lag}$ ,  $t_{max}$ ).

$t_{lag}$ , tiempo de latencia;  $t_{max}$ , tiempo al cual aparece la concentración máxima de fármaco ( $C_{max}$ );  $AUC_0^\infty$ , área bajo la curva de concentraciones desde tiempo 0 a tiempo infinito;  $t_{1/2}$ , semivida de eliminación, V/F, volumen aparente de distribución y Cl/F, aclaramiento aparente de eliminación.

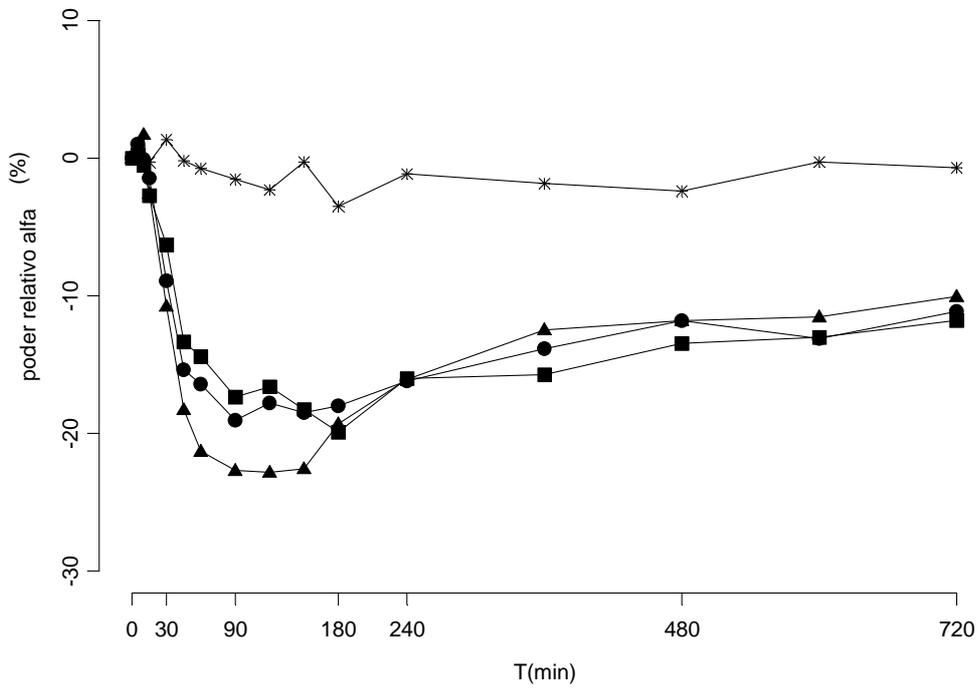
## 2.2.- VARIABLES DERIVADAS DE LA ELECTROENCEFALOGRAFIA

### 2.2.1.- Poder relativo alfa

Las gráficas del curso temporal del efecto sobre el poder relativo alfa para los 4 tratamientos (Figura 16) mostraron que tras placebo la variable no se vio afectada a lo largo de las 12 h de estudio. Por el contrario la administración tanto de DZ como DMDZ produjeron un descenso en dicha variable. Este mismo patrón se observa al expresar los resultados como diferencia respecto del valor basal (Figura 17).



**Figura 16:** Curso temporal del efecto (poder relativo alfa) promedio tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).



**Figura 17:** Curso temporal del efecto (poder relativo alfa) promedio expresado como diferencia del valor basal, tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

### 2.2.1.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los valores directos premedicación, mostró que en condiciones basales, no había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.732$ ) entre los 4 tratamientos.

### 2.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos

Seguidamente se aplicó a los valores de efecto medido una estadística multivariante en la que se compararon todos los tratamientos y todos los tiempos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas para el factor tiempo ( $p<0.001$ ), para el factor tratamiento ( $p<0.001$ ) y para la interacción tiempo x tratamiento ( $p<0.001$ ).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas al valor del AUC calculado empleando el valor resultante de restar el valor basal a los valores de efecto medido, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.001$ ) entre los 4 tratamientos. La posterior aplicación de un test de t de Student pareado mostró que la administración de los diferentes tratamientos activos supuso un descenso estadísticamente significativo del valor AUC con respecto al placebo, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos activos (tabla 4).

**Tabla 4:** Descriptivos de los parámetros farmacodinámicos obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos tras la administración de DZ1, DZ2 y DMDZ a dosis de 30 mg por vía oral para la variable poder relativo alfa.

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Media AUC (%*min) ± DE</b>	-1186.44 ± 2813.3	-5689.61 ± 10317.9	-5745.52 ± 9498.2	5759.92 ± 9973.0
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.771	p = 0.941
DZ2	-	-	-	p = 0.558
<b>Media E<sub>max</sub> (%) ± DE</b>	-9.99 ± 11.1	-24.55 ± 11.6	-28.19 ± 14.3	-22.90 ± 9.8
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p=0.001</b>
DZ1	-	-	<b>p=0.046</b>	p=0.522
DZ2	-	-	-	p=0.082
<b>Mediana t<sub>max</sub> (min)* [min-máx.]</b>	210 [5-2160]	150 [30-240]	120 [30-180]	180 [60-600]
Placebo	-	p=0.124	<b>p=0.038</b>	p=0.477
DZ1	-	-	p=0.122	<b>p=0.025</b>
DZ2	-	-	-	<b>p=0.001</b>

Los valores son el promedio ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetro expresado como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon (t<sub>max</sub>).t<sub>max</sub>, tiempo al cual aparece el efecto máximo (E<sub>max</sub>); AUC, área bajo la curva del efecto vs tiempo.

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los 4 tratamientos para el  $E_{max}$  obtenido a partir de los datos transformados en la diferencia con respecto al valor basal. La comparación por pares indicó que todos los tratamientos activos producían un mayor descenso en el poder relativo alfa que placebo. Además, DZ2 produjo un mayor descenso de  $E_{max}$  comparado con DZ1 ( $p = 0.046$ ). (Tabla 4)

Al aplicar el test de Friedman de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.002$ ) entre los 4 tratamientos para el  $t_{max}$ . El posterior test de Wilcoxon para datos pareados, mostró valores de  $t_{max}$  menores en los diferentes tratamientos activos con respecto al placebo, aunque la significación estadística se alcanzó solo en la comparación de placebo con DZ2. El efecto máximo de DMDZ sobre la variable alfa presentó un valor de  $t_{max}$  superior al observado tras cualquiera de las dos administraciones de DZ (Tabla 4).

### 2.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para evaluar si existían diferencias entre los 16 tiempos para cada tratamiento, a los valores de efecto medido se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los 3 tratamientos activos ( $p < 0.001$ ). Tras placebo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.346$ ).

La administración de placebo no supuso cambios en el valor del poder relativo alfa a lo largo de las doce horas en las que se evaluó con respecto al valor basal (Tabla 5). Sin embargo, los tres tratamientos activos disminuyeron dicho valor a partir del minuto 30 y hasta el final del período evaluado (12 h) de manera estadísticamente significativa.

**Tabla 5:** Comparación de los valores medios del poder relativo alfa, antes (basal) y tras la administración de los diferentes tratamientos a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	P	Valor	P	Valor	p
0 vs 5 min	52.6 vs 53.2	0.273	50.6 vs 51.6	0.421	51.1 vs 51.9	0.268	51.8 vs 52.1	0.709
0 vs 10 min	52.6 vs 52.0	0.610	50.6 vs 50.5	0.925	51.1 vs 52.8	0.199	51.8 vs 51.3	0.611
0 vs 15 min	52.6 vs 52.3	0.797	50.6 vs 49.2	0.344	51.1 vs 48.5	0.306	51.8 vs 49.1	0.109
0 vs 30 min	52.6 vs 53.9	0.245	50.6 vs 41.7	<b>0.001</b>	51.1 vs 40.3	<b>0.003</b>	51.8 vs 45.5	<b>0.002</b>
0 vs 45 min	52.6 vs 52.4	0.902	50.6 vs 35.2	<b>&lt;0.001</b>	51.1 vs 32.8	<b>&lt;0.001</b>	51.8 vs 38.5	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 1 h	52.6 vs 51.8	0.634	50.6 vs 34.2	<b>&lt;0.001</b>	51.1 vs 29.8	<b>&lt;0.001</b>	51.8 vs 37.4	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 1.5 h	52.6 vs 51.1	0.462	50.6 vs 31.5	<b>&lt;0.001</b>	51.1 vs 28.4	<b>&lt;0.001</b>	51.8 vs 34.5	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 2 h	52.6 vs 50.3	0.436	50.6 vs 32.8	<b>&lt;0.001</b>	51.1 vs 28.2	<b>&lt;0.001</b>	51.8 vs 35.2	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 2.5 h	52.6 vs 52.3	0.848	50.6 vs 32.1	<b>&lt;0.001</b>	51.1 vs 28.5	<b>&lt;0.001</b>	51.8 vs 33.6	<b>&lt;0.001</b>

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	P	Valor	P	Valor	p
0 vs 3 h	52.6 vs 49.1	0.117	50.6 vs 32.6	<0.001	51.1 vs 31.8	<0.001	51.8 vs 31.9	<0.001
0 vs 4 h	52.6 vs 51.4	0.413	50.6 vs 34.4	<0.001	51.1 vs 35.0	<0.001	51.8 vs 35.8	<0.001
0 vs 6 h	52.6 vs 50.7	0.161	50.6 vs 36.8	<0.001	51.1 vs 38.6	<0.001	51.8 vs 36.1	<0.001
0 vs 8 h	52.6 vs 50.2	0.081	50.6 vs 38.8	<0.001	51.1 vs 39.3	<0.001	51.8 vs 38.4	<0.001
0 vs 10 h	52.6 vs 52.3	0.860	50.6 vs 37.5	<0.001	51.1 vs 39.5	<0.001	51.8 vs 38.8	<0.001
0 vs 12 h	52.6 vs 51.9	0.558	50.6 vs 39.5	<0.001	51.1 vs 41.0	<0.001	51.8 vs 40.0	<0.001

Una vez corregidos los valores de EEG restando su valor basal para cada individuo y tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y placebo entre 30 min y 12 h. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los otros 3 posibles pares de tratamientos activos como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6:** Comparación de los valores medios del poder relativo alfa para cada uno de los tratamientos en los diferentes puntos temporales una vez sustraído el valor basal correspondiente.

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	p Placebo-DMDZ	p DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
5 min	0.59	1.03	0.88	2.71	0.762	0.711	0.612	0.912	0.578	0.589
10 min	-0.57	-0.10	1.72	3.98	0.745	0.239	0.967	0.310	0.708	0.227
15 min	-0.28	-1.45	-2.56	6.38	0.549	0.431	0.273	0.698	0.516	0.922
30 min	1.36	-8.92	-10.75	6.57	<0.001	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>	0.639	0.297	0.157
45 min	-0.17	-15.40	-18.30	9.59	<0.001	<0.001	<0.001	0.439	0.464	0.125
1 h	-0.73	-16.42	-21.30	10.88	<0.001	<0.001	<b>0.001</b>	0.080	0.474	<b>0.033</b>
1.5 h	-1.52	-19.05	-22.70	10.00	<0.001	<0.001	<0.001	0.261	0.617	0.098
2 h	-2.30	-17.80	-22.81	11.73	<0.001	<0.001	<b>0.002</b>	0.083	0.691	0.054
2.5 h	-0.26	-18.50	-22.58	11.41	<0.001	<0.001	<0.001	0.260	0.938	0.096
3 h	-3.50	-17.99	-19.30	10.91	<0.001	<b>0.001</b>	<0.001	0.685	0.567	0.845
4 h	-1.14	-16.18	-16.08	10.79	<0.001	<0.001	<0.001	0.974	0.922	0.978
6 h	-1.83	-13.85	-12.46	9.29	<0.001	<b>0.002</b>	<0.001	0.588	0.310	<b>0.033</b>
8 h	-2.37	-11.82	-11.80	9.25	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<0.001	0.993	0.346	0.374
10 h	-0.26	-13.10	-11.53	10.81	<0.001	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.494	0.959	0.503
12 h	-0.68	-11.13	-10.05	9.99	<0.001	<0.001	<b>0.001</b>	0.499	0.687	0.401

#### 2.2.1.4.- Reproducibilidad del efecto observado

El efecto de DZ sobre el poder relativo alfa fue reproducible, ya que en la comparación de los valores de esta variable corregidos por el valor basal tras su administración en dos ocasiones (DZ1 y DZ2) mediante coeficiente de correlación intraclase (CCI) para todos los voluntarios y tiempos conjuntamente, se obtuvo un CCI de 0.61 con un valor de  $p < 0.0001$ .

Posteriormente se realizaron 16 CCI, uno por voluntario y como se muestra en la tabla 7, el efecto fue reproducible para 14 de los 16 voluntarios ya que se obtuvieron CCI entre 0.44 y 0.93 con valores de  $p \leq 0.05$

**Tabla 7:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 16 voluntarios

VOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCI	0.93	0.81	0.10	0.77	0.91	0.44	0.92	0.92	0.86	0.68	0.85	0.56	-0.26	0.62	0.77	0.77
P	*	*	0.34	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.85	*	*	*

\*  $p \leq 0.05$

Sin embargo, cuando se evaluó la reproducibilidad del efecto de los tratamientos en cada punto temporal, se detectó una falta de reproducibilidad en los primeros 45 minutos. A partir de este momento las medidas fueron reproducibles, aunque las medidas realizadas a las 2.5 h y 4 h mostraron una tendencia hacia la significación (Tabla 8).

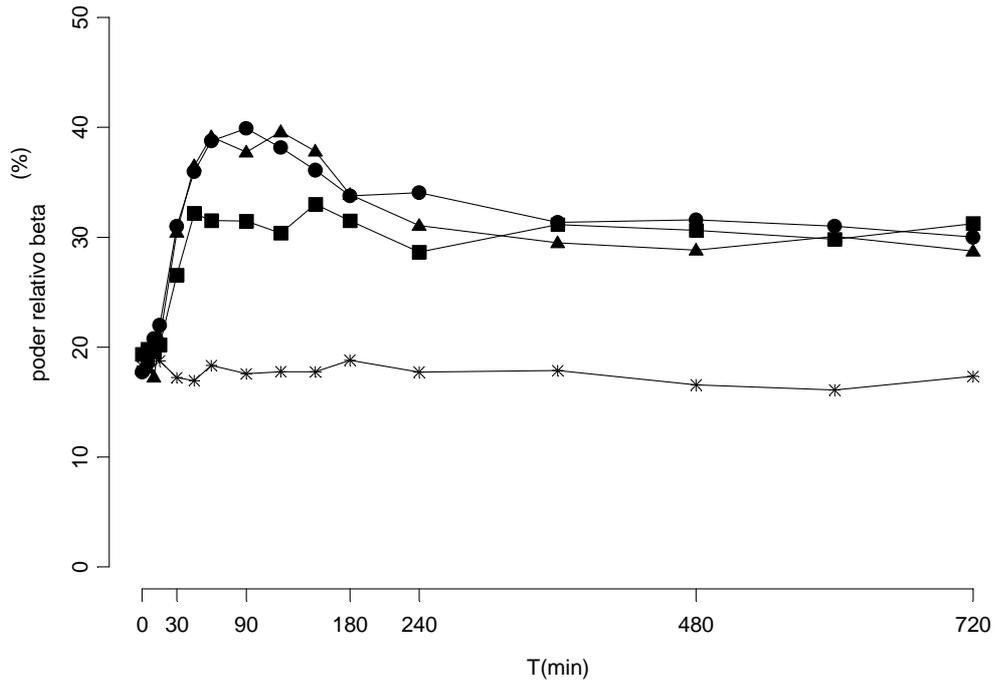
**Tabla 8:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los tiempos.

Tiempo	5'	10'	15'	30'	45'	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
CCI	0.21	-0.07	0.03	-0.05	0.23	0.66	0.61	0.63	0.37	0.45	0.36	0.54	0.56	0.58	0.65
p	0.21	0.61	0.46	0.57	0.19	*	*	*	0.07	*	0.08	*	*	*	*

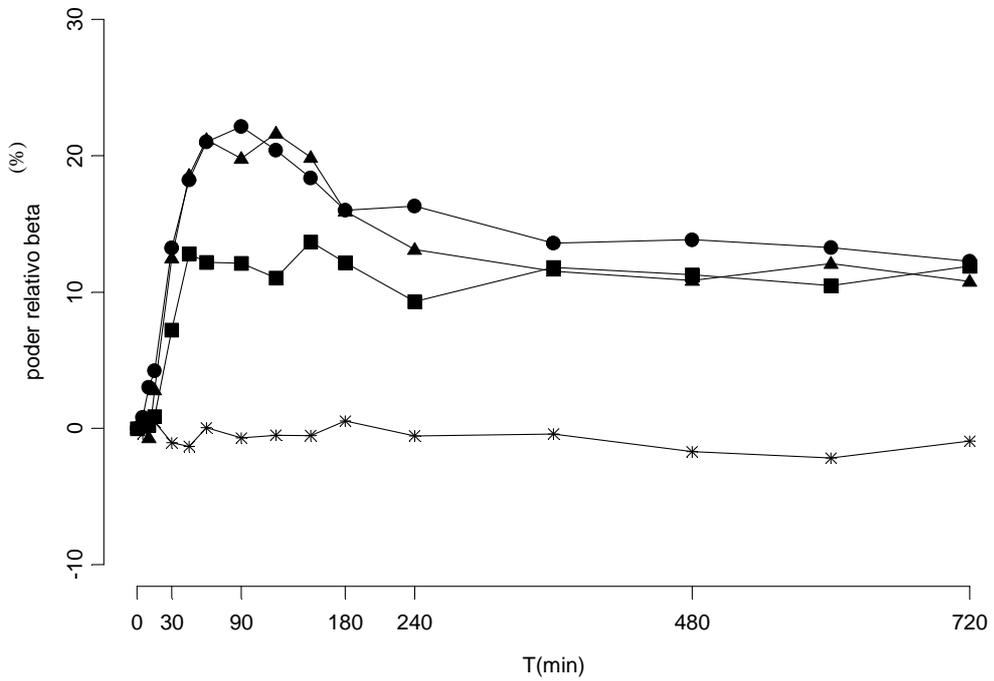
\*  $p \leq 0.05$

### 2.2.2.- Poder relativo beta

En la gráfica del curso temporal del efecto sobre el poder relativo beta de los 4 tratamientos (Figura 18) se observó que tras placebo la variable no se vio afectada a lo largo de las 12 h de estudio. Por el contrario, tras la administración de DZ, se produjo un aumento de la variable entre aproximadamente los 30 min y las 12 h. Tras la administración de DMDZ, la variable aumentó igualmente entre los 30 min y las 12 h, pero en menor proporción. Al expresar los resultados como diferencia respecto del valor basal (Figura 19), se observó el mismo patrón.



**Figura 18:** Curso temporal del efecto (poder relativo beta) promedio tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).



**Figura 19:** Curso temporal del efecto (poder relativo beta) promedio expresado como diferencia del valor basal, tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

### 2.2.2.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.457$ ) entre los 4 tratamientos.

### 2.2.2.2.- Efecto global de los tratamientos

Seguidamente se aplicó a los valores de efecto medido una estadística multivariante en la que se compararon todos los tratamientos y todos los tiempos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas para el factor tiempo ( $p<0.001$ ), para el factor tratamiento ( $p<0.001$ ) y para la interacción tiempo x tratamiento ( $p<0.001$ ).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas al valor del AUC calculado empleando el valor resultante de restar el valor basal a los valores de efecto medido, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.001$ ) entre los 4 tratamientos. La posterior aplicación de un test de t de Student pareado mostró que la administración de los diferentes tratamientos activos supuso un descenso estadísticamente significativo del valor de AUC con respecto al placebo pero no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos activos (Tabla 9).

**Tabla 9:** Descriptivos de los parámetros farmacodinámicos obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos tras la administración de DZ1, DZ2 y DMDZ a dosis de 30 mg por vía oral para la variable poder relativo beta.

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Media AUC (%*min) ± DE</b>	-583.87 ± 1561.5	6071.08 ± 9662.0	5488.35 ± 8598.0	4441.34 ± 7722.3
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.547	p=0.067
DZ2	-	-	-	p=0.397
<b>Media E<sub>max</sub> (%) ± DE</b>	4.91 ± 4.1	24.73 ± 9.2	26.35 ± 10.2	19.30 ± 7.9
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.375	<b>p=0.038</b>
DZ2	-	-	-	<b>p=0.026</b>
<b>Mediana t<sub>max</sub> (min)* [min-máx.]</b>	150 [10 - 720]	105 [60 - 180]	105 [30 - 180]	180 [15 - 720]
Placebo	-	p=0.280	p=0.182	p=0.649
DZ1	-	-	p=0.590	<b>p=0.014</b>
DZ2	-	-	-	<b>p=0.014</b>

Los valores son el promedio ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetro expresado como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon (t<sub>max</sub>). t<sub>max</sub>, tiempo al cuál aparece el efecto máximo (E<sub>max</sub>); AUC, área bajo la curva del efecto vs tiempo.

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los 4 tratamientos para el  $E_{max}$ . La comparación por pares indicó que todos los tratamientos activos producían un mayor aumento en el poder relativo beta que placebo. Para esta variable no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas administraciones de DZ. Sin embargo, la administración de DMDZ produjo un menor incremento de la variable ( $E_{max}$ , de 19.30% frente a 24.73% y 26.35% tras DZ1 y DZ2 respectivamente) (Tabla 9).

Al aplicar el test de Friedman de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.172$ ) entre los 4 tratamientos para el  $t_{max}$ . Al aplicar un test de Wilcoxon para datos pareados, hallamos valores de  $t_{max}$  menores de manera estadísticamente significativa en los 2 tratamientos de DZ con respecto al DMDZ (Tabla 9).

### 2.2.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para evaluar si existían diferencias entre los 16 tiempos para cada tratamiento, a los valores de efecto medido se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los 3 tratamientos activos ( $p < 0.001$ ). Tras placebo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.457$ )

La administración de placebo no supuso cambios en el valor del poder relativo beta a lo largo de las 12 horas en las que se evaluó con respecto al valor basal (Tabla 10). Sin embargo, los 3 tratamientos activos aumentaron dicho valor a partir del minuto 30 y hasta el final del período evaluado (12 h) de manera estadísticamente significativa.

**Tabla 10:** Comparación de los valores medios del poder relativo beta, antes (tiempo=0) y tras la administración de DZ1, DZ2 y DMDZ a dosis de 30 mg por vía oral a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 5 min	18.3 vs 17.8	0.511	17.7 vs 18.6	0.346	17.9 vs 18.1	0.847	19.3 vs 19.8	0.339
0 vs 10 min	18.3 vs 19.1	0.475	17.7 vs 20.8	<b>0.012</b>	17.9 vs 17.3	0.614	19.3 vs 19.6	0.805
0 vs 15 min	18.3 vs 18.7	0.576	17.7 vs 22.0	<b>0.010</b>	17.9 vs 20.8	0.066	19.3 vs 20.2	0.470
0 vs 30 min	18.3 vs 17.2	0.249	17.7 vs 31.0	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 30.4	<b>0.001</b>	19.3 vs 26.5	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 45 min	18.3 vs 16.9	0.261	17.7 vs 36.0	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 36.5	<b>&lt;0.001</b>	19.3 vs 32.2	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 1 h	18.3 vs 18.3	0.973	17.7 vs 38.8	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 39.1	<b>&lt;0.001</b>	19.3 vs 31.5	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 1.5 h	18.3 vs 17.6	0.594	17.7 vs 39.9	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 37.8	<b>&lt;0.001</b>	19.3 vs 31.5	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 2 h	18.3 vs 17.8	0.723	17.7 vs 38.2	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 39.6	<b>&lt;0.001</b>	19.3 vs 30.4	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 2.5 h	18.3 vs 17.7	0.575	17.7 vs 36.1	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 37.8	<b>&lt;0.001</b>	19.3 vs 33.0	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 3 h	18.3 vs 18.8	0.511	17.7 vs 33.8	<b>&lt;0.001</b>	17.9 vs 33.9	<b>&lt;0.001</b>	19.3 vs 31.5	<b>&lt;0.001</b>

0 vs 4 h	18.3 vs 17.7	0.608	17.7 vs 34.0	<0.001	17.9 vs 31.1	<0.001	19.3 vs 28.6	<0.001
0 vs 6 h	18.3 vs 17.9	0.736	17.7 vs 31.3	<0.001	17.9 vs 29.5	<0.001	19.3 vs 31.1	<0.001
0 vs 8 h	18.3 vs 16.6	0.157	17.7 vs 31.6	<0.001	17.9 vs 28.8	<0.001	19.3 vs 30.6	<0.001
0 vs 10 h	18.3 vs 16.1	0.120	17.7 vs 31.0	<0.001	17.9 vs 30.1	<0.001	19.3 vs 29.8	<0.001
0 vs 12 h	18.3 vs 17.3	0.511	17.7 vs 30.0	<0.001	17.9 vs 28.7	<0.001	19.3 vs 31.2	<0.001

Una vez corregidos los valores de EEG en función del valor basal para cada individuo y tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 tratamientos activos y placebo entre 30 min y 12 h. Al comparar DMDZ con ambas administraciones de DZ se observó un menor efecto sobre el aumento del poder relativo beta tras la administración de DMDZ respecto de ambas administraciones de DZ, entre los 30 min y las 4 h como se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11:** Comparación de los valores medios del poder relativo beta para cada uno de los tratamientos (DZ1, DZ2 y DMDZ a dosis de 30 mg por vía oral) en los diferentes puntos temporales una vez sustraído el valor basal correspondiente.

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	p Placebo-DMDZ	p DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
5 min	-0.39	0.81	0.13	0.48	0.188	0.450	0.330	0.551	0.741	0.648
10 min	0.83	3.01	-0.68	0.24	0.146	0.443	0.684	<b>0.033</b>	<b>0.032</b>	0.266
15 min	0.48	4.23	2.82	0.86	<b>0.033</b>	0.161	0.771	0.476	0.086	0.145
30 min	-1.05	13.24	12.48	7.22	<0.001	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.780	<b>0.007</b>	0.071
45 min	-1.32	18.22	18.54	12.84	<0.001	<0.001	<0.001	0.887	<b>0.026</b>	<b>0.004</b>
1 h	0.47	21.01	21.19	12.18	<0.001	<0.001	<0.001	0.942	<b>0.001</b>	<b>0.007</b>
1.5 h	-0.69	22.15	19.81	12.12	<0.001	<0.001	<0.001	0.311	<0.001	<b>0.001</b>
2 h	-0.50	20.41	21.64	11.04	<0.001	<0.001	<0.001	0.615	<0.001	<b>0.018</b>
2.5 h	-0.52	18.36	19.87	13.68	<0.001	<0.001	<0.001	0.542	<b>0.035</b>	0.228
3 h	0.54	16.01	15.93	12.20	<0.001	<0.001	<0.001	0.978	0.136	<b>0.040</b>
4 h	-0.54	16.30	13.12	9.31	<0.001	<0.001	<0.001	0.174	<b>0.003</b>	0.886
6 h	-0.40	13.59	11.54	11.82	<0.001	<0.001	<0.001	0.448	0.378	0.815
8 h	-1.69	13.83	10.86	11.29	<0.001	<0.001	<0.001	0.219	0.183	0.395
10 h	-2.17	13.26	12.11	10.47	<0.001	<0.001	<0.001	0.621	0.160	0.694
12 h	-0.92	12.25	10.80	11.91	<0.001	<0.001	<0.001	0.504	0.808	0.707

#### 2.2.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado

El efecto de DZ sobre el poder relativo beta fue reproducible, ya que en la comparación de los valores de esta variable corregidos por el valor basal mediante coeficiente de correlación

intraclase (CCI) para todos los voluntarios y tiempos conjuntamente, se obtuvo un CCI de 0.61 con un valor de  $p < 0.001$ .

Posteriormente, se realizaron 16 CCI, uno por voluntario y como se refleja en la tabla 12, para 15 de los 16 voluntarios, el efecto tras ambas administraciones de DZ fue reproducible ( $p \leq 0.05$ ). Para el único voluntario que no fue reproducible fue para el voluntario que presentaba una cinética muy diferente al resto (voluntario 3), a pesar de presentar una tendencia a la reproducibilidad.

**Tabla 12:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 16 voluntarios.

VOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCI	0.52	0.80	0.36	0.76	0.85	0.58	0.90	0.95	0.86	0.40	0.70	0.78	0.78	0.56	0.83	0.75
P	*	*	0.062	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

\*  $p \leq 0.05$

Sin embargo, cuando se evaluó la reproducibilidad del efecto de los tratamientos en cada punto temporal, se detectó una falta de reproducibilidad en la mayor parte de los puntos temporales. Tan solo fue reproducible entre los 45 min a las 2 horas (Tabla 13).

**Tabla 13:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los tiempos.

Tiempo	5'	10'	15'	30'	45'	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
CCI	-0.10	0.14	0.09	0.37	0.52	0.53	0.63	0.56	0.37	0.25	0.08	-0.01	0.19	0.26	0.11
P	0.65	0.30	0.37	0.07	*	*	*	*	0.07	0.16	0.38	0.52	0.22	0.15	0.33

\*  $p \leq 0.05$

### **3.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO/FARMACODINÁMICO POBLACIONAL**

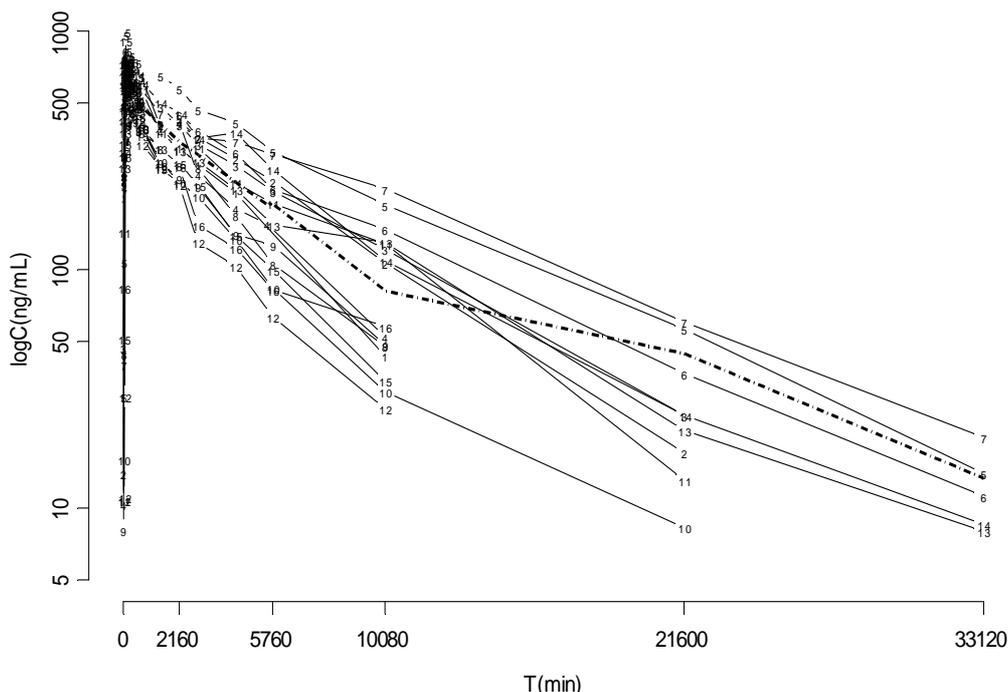
La dosis de DZ y DMDZ se relacionó con los cambios observados en la variable beta del EEG mediante un modelo farmacocinético/farmacodinámico. Los pasos seguidos para llegar al modelo final fueron los siguientes: Primero se desarrolló el modelo FC poblacional en 4 etapas: modelo FC de DMDZ tras administración de DMDZ, modelo FC de DZ tras administración de DZ, modelo FC de DMDZ tras administración de DZ, fijando DZ y modelo FC de DZ y DMDZ simultáneamente. A continuación se desarrolló el modelo FC/FD poblacional en 4 etapas fijando los estimados individuales bayesianos farmacocinéticos de ambos compuestos: modelo FD de DMDZ tras administración de DMDZ, modelo FD de DZ tras administración de DZ fijando los estimados individuales bayesianos farmacodinámicos de DMDZ obtenidos de la etapa anterior, modelo FD de DZ tras administración de DZ, fijando los estimados poblacionales de DMDZ y modelo FD de DZ y DMDZ simultáneamente.

#### **3.1.- FARMACOCINÉTICA**

##### **3.1.1.- Desarrollo del modelo FC de DMDZ tras administración de DMDZ**

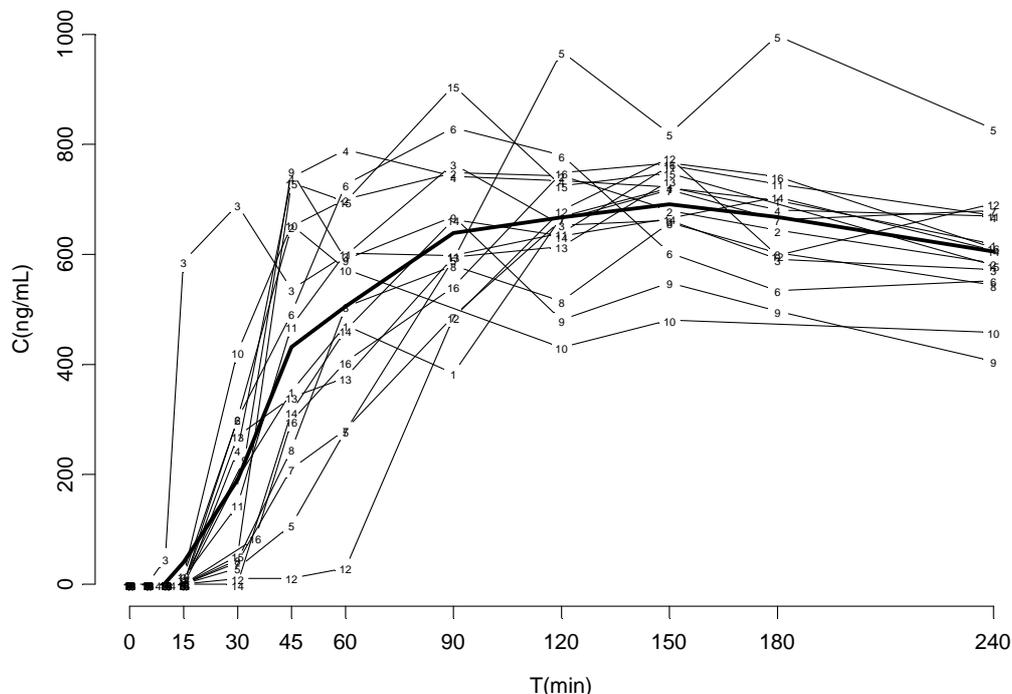
###### **3.1.1.1.- Análisis exploratorio de datos**

Las concentraciones plasmáticas observadas tras la administración de 30 mg de DMDZ por vía oral, y que estuvieron por encima del límite de cuantificación fueron de 8 ng/mL a 997.56 ng/mL. En la Figura 20, se representa el curso temporal del logaritmo de las concentraciones plasmáticas hasta los 33120 min. Se ha omitido el punto temporal correspondiente a 44640 min ya que no se obtuvieron concentraciones cuantificables de DMDZ. Para la mayoría de individuos se apreciaron 2 pendientes en la fase de caída de las concentraciones.



**Figura 20:** Concentraciones plasmáticas de DMDZ vs tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa las concentraciones plasmáticas observadas a cada punto temporal. Las líneas continuas representan la interpolación lineal de las observaciones y la línea punteada la línea de tendencia de las observaciones.

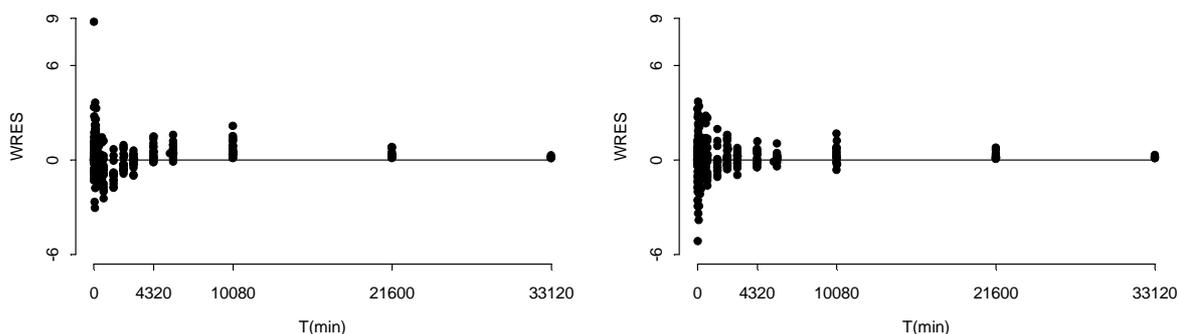
La absorción de DMDZ no comenzó hasta los 15 ó 30 minutos tras su administración oral como se aprecia en la figura 21, con la excepción del voluntario 3. El máximo de concentraciones plasmáticas medias tras administrar 30 mg por vía oral fue de aproximadamente 700 ng/mL y se alcanzó alrededor de los 150 min.



**Figura 21:** Concentraciones plasmáticas de DMDZ vs tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa las concentraciones plasmáticas observadas a cada punto temporal, las líneas continuas representan la interpolación lineal de las observaciones y la línea continua gruesa representa la media de las concentraciones.

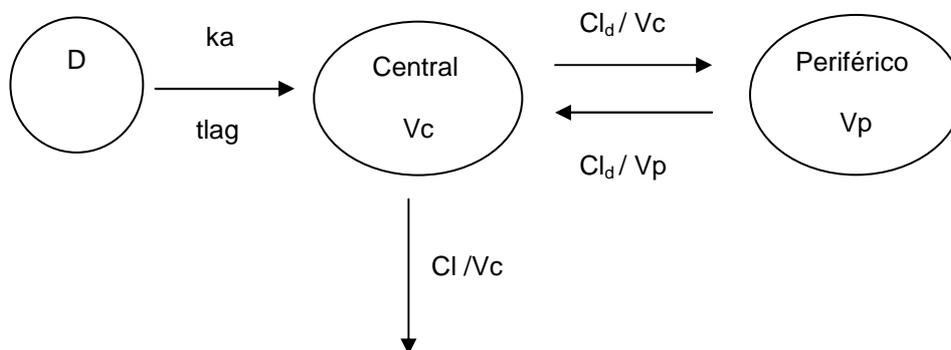
### 3.1.1.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural

El análisis de los datos se empezó con un modelo monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden. Los parámetros se describieron en términos de  $Cl/F$  y  $V/F$ , siendo  $F$  la biodisponibilidad desconocida. En la tabla 13 se recogen los modelos clave del desarrollo del modelo farmacocinético poblacional para DMDZ. Como se muestra en la figura 22 (panel izquierdo) el modelo con estructura monocompartimental presentó desviaciones sistemáticas en su predicción que sugirieron la necesidad de emplear un modelo bicompartimental para describir la estructura de los datos.



**Figura 22:** Residuales ponderados (WRES) frente al tiempo para el modelo monocompartimental (modelo 1 tabla 22) en el panel izquierdo y para el modelo bicompartimental (modelo 2, tabla 14) en el panel derecho.

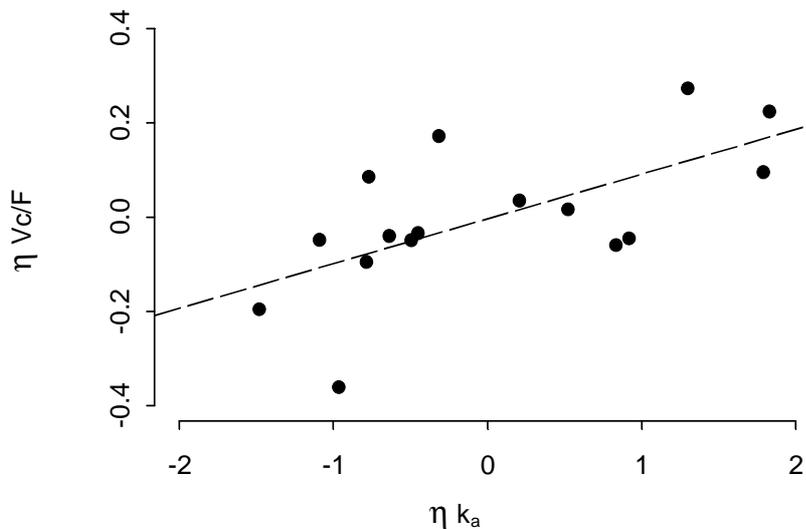
La incorporación de un segundo compartimento supuso una disminución estadísticamente significativa de la función objetiva (OBJ) ( $\Delta OBJ = -86$ ), una disminución del error residual y una mejora en las gráficas de bondad de ajuste como se puede comprobar comparando ambos paneles en la figura 22. La incorporación de un tercer compartimento no mejoró las predicciones, ni indujo un descenso de la función objetiva de manera estadísticamente significativa. Por ello se estableció que el modelo estructural que mejor definía las observaciones era el modelo bicompartimental representado esquemáticamente en la figura 23.



**Figura 23:** Representación esquemática del modelo farmacocinético bicompartimental con absorción y eliminación de primer orden.  $D$ : dosis administrada por vía oral,  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cl_d$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_p$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico y  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación. Se ha omitido la  $F$  en los parámetros para simplificar la representación.

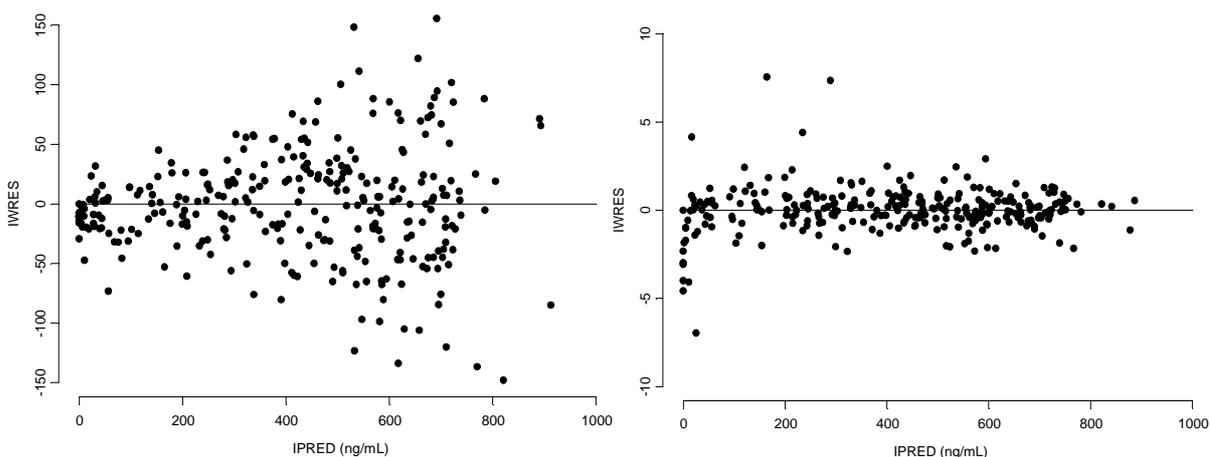
### 3.1.1.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

A partir del modelo bicompartimental seleccionado anteriormente, que incorporaba variabilidad interindividual de forma exponencial en  $k_a$ ,  $t_{lag}$ ,  $Cl/F$  y  $Vc/F$ , se refinó el modelo estadístico. La introducción de variabilidad interindividual en el  $t_{lag}$  de manera aditiva mejoró significativamente el modelo ( $\Delta OBJ = -114$ ). En este modelo se evaluó la existencia de correlación entre los parámetros individuales mediante gráficos exploratorios que mostraron correlación ( $r=0.64$ ) entre  $Vc/F$  y  $k_a$ , como se puede apreciar en la figura 24.



**Figura 24:** Correlación entre los valores individuales de  $\eta$  para el  $Vc/F$  y la  $k_a$ . Los puntos representan el par de valores para cada individuo y la línea discontinua se corresponde con la recta de regresión lineal.

La introducción de una matriz omega que incorporara correlación entre la  $\eta k_a$  y la  $\eta Vc/F$  supuso un descenso en la OBJ estadísticamente significativo. Pero se apreció un claro sesgo en la gráfica de residuales individuales ponderados frente a las predicciones individuales (Figura 25, panel izquierdo).



**Figura 25:** Gráfica de los residuales individuales ponderados (IWRES) vs las predicciones individuales (IPRED) para el modelo que incorpora la correlación entre  $k_a$  y  $V_c/F$  (modelo 5, tabla 14) en el panel izquierdo y para el modelo que incorpora un error combinado (modelo 7, tabla 14) en el panel derecho. Los puntos representan los residuales individuales ponderados para cada predicción individual.

La incorporación de un error combinado solventó el problema (figura 25, panel derecho), pero para obtener la convergencia del modelo fue necesario realizar el análisis sin el individuo que mostraba un perfil de absorción muy diferente al resto y que ya había sido previamente eliminado en el análisis farmacocinético no compartimental (voluntario 3). El modelo con error combinado y la eliminación de este sujeto se tradujo en una disminución de los errores estándares de estimación en los parámetros de modo que todos estuvieran estimados con un error estándar relativo (EER) inferior al 50%.

**Tabla 14:** Desarrollo del modelo farmacocinético poblacional básico (sin covariables) de DMDZ.

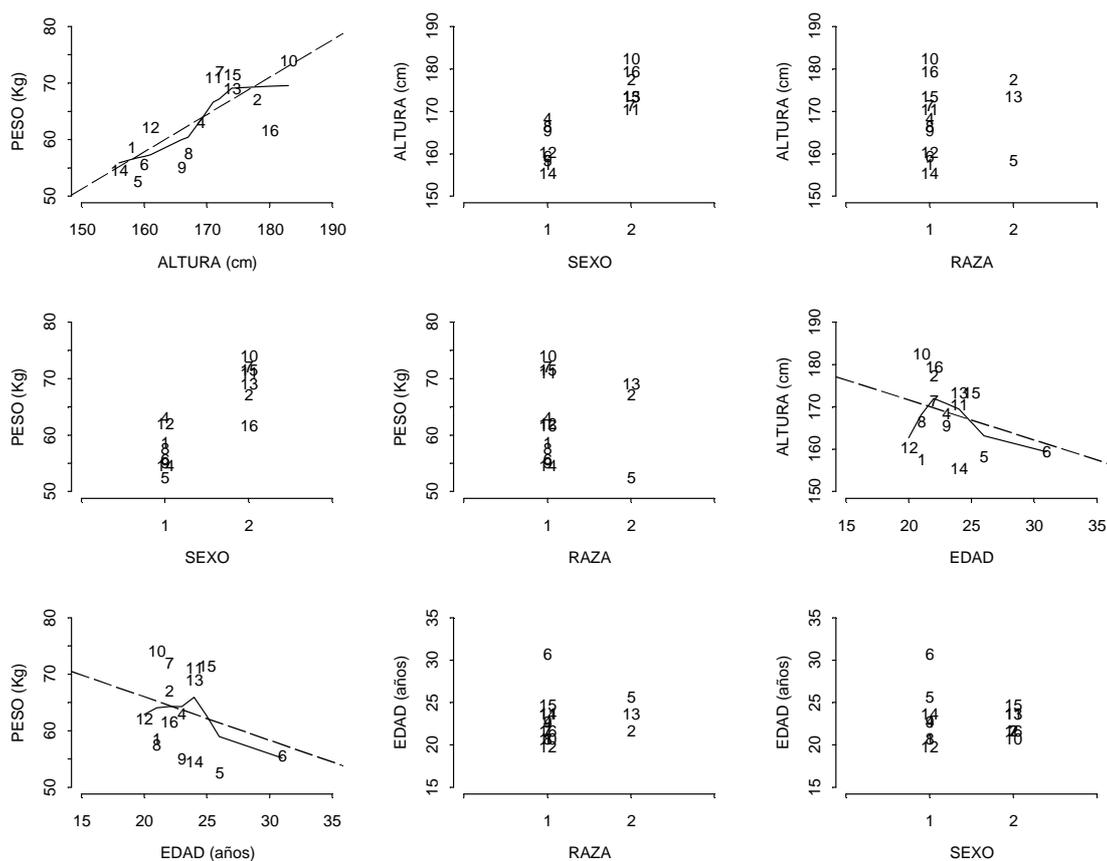
HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) EER(%)	Proporcional (%) EER(%)
¿Una estructura monocompartimental describe los datos?	1	Monocompartimental $CI/F = TVCI/F * e^{n_{CI/F}}$ $Vc/F = TVVc/F * e^{n_{Vc/F}}$ $k_a = TVk_a * e^{n_{k_a}}$ $t_{lag} = TVt_{lag} * e^{n_{t_{lag}}}$	3512	$CI/F = 0.013$ (12) $Vc/F = 46.6$ (3.5) $k_a = 0.042$ (18) $t_{lag} = 25.2$ (5.6)	38 (27) 13 (48) 110 (27) 31 (79)	67 (26)	
¿Es necesario incorporar otro compartimento de distribución?	2	Bicompartimental $CI/F = TVCI/F * e^{n_{CI/F}}$ $Vc/F = TVVc/F * e^{n_{Vc/F}}$ $CI_d/F = TVCI_d/F$ $Vp/F = TVVp/F$ $k_a = TVk_a * e^{n_{k_a}}$ $t_{lag} = TVt_{lag} * e^{n_{t_{lag}}}$	3426	$CI/F = 0.013$ (20) $Vc/F = 37.5$ (6.7) $CI_d/F = 0.0378$ (34) $Vp/F = 19$ (20) $k_a = 0.03$ (8.1) $t_{lag} = 14.8$ (8.8)	54 (55) 15 (49) NE NE 85 (33) 41 (120)	57 (15)	

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) EER(%)	Proporcional (%) EER(%)
¿Mejora el modelo la incorporación de un tercer compartimento?	3	Tricompartimental $Cl/F = TVCl/F * e^{-1}Cl/F$ $Vc/F = TVVc/F * e^{-1}Vc/F$ $Cld/F = TVCld/F$ $Vp1/F = TVVp1/F$ $Cld2/F = TVCld2/F$ $Vp2/F = TVVp2/F$ $k_a = TVk_a * e^{-1}k_a$ $t_{lag} = TVt_{lag} * e^{-1}t_{lag}$	3424	$Cl/F = 2*10^{-6}$ (16) $Vc/F = 37.2$ (7.4) $Cld /F = 0.04$ (40) $Vp1/F = 18$ (21) $Cld2 /F = 0.014$ (21) $Vp2/F = 3000$ (28) $k_a = 0.03$ (8.5) $t_{lag} = 14.8$ (8.8)	3700 (120) 15 (50) NE NE NE NE 84 (33) 41 (120)	57 (15)	
Es necesaria la introducción de VII en $t_{lag}$ ?	4	=Run 2, sin VII en $t_{lag}$	3475	$Cl/F = 0.013$ (11) $Vc/F = 38.7$ (6.1) $Cld/F = 0.035$ (32) $Vp/F = 15.8$ (14) $k_a = 0.0558$ (37) $t_{lag} = 26.8$ (4.5)	47 (23) 16 (54) NE NE 120 (42) NE	65 (28)	
¿Es necesario incorporar VII en $t_{lag}$ de manera aditiva para que converja el modelo?	5	= Run 4, con VII en $t_{lag}$ de manera aditiva $t_{lag} = TVt_{lag} + \eta_{t_{lag}}$	3312	$Cl/F = 0.0115$ (11) $Vc/F = 38$ (6.7) $Cld /F = 0.0413$ (40) $Vp/F = 15.5$ (14) $k_a = 0.0517$ (30) $t_{lag} = 26.8$ (10)	47 (20) 16 (51) NE NE 110 (34) 11min* (53)	46 (12)	
¿Mejora el modelo la incorporación de correlación entre los parámetros $k_a$ y $Vc/F$ ?	6	= Run 5, con correlacion $k_a$ - $Vc/F$ ? $\$OMEGA$ BLOCK(2) $\eta_{k_a}$ $\eta_1, \eta_{Vc}$	3303	$Cl/F = 0.0115$ (11) $Vc/F = 37.4$ (7.1) $Cld /F = 0.0455$ (43) $Vp/F = 15.8$ (14) $k_a = 0.05$ (29) $t_{lag} = 26.7$ (10) $Corr \eta_{k_a}, \eta_{Vc}$	46 (22) 16 (48) NE NE 110 (30) 11min* (49) 66 (38)	46 (11)	
¿Es necesario añadir una parte de error proporcional?	7	= Run 6 con error combinado	NC				
¿Es necesario eliminar el ID3 del modelo?	8	= Run 6 sin individuo 3	2756	$Cl/F = 0.0095$ (11) $Vc/F = 39.9$ (5) $Cld /F = 0.0383$ (25) $Vp/F = 18$ (12) $k_a = 0.0734$ (21) $t_{lag} = 25.5$ (5.9) $Corr \eta_{k_a}, \eta_{Vc}$	46 (23) 16 (44) NE NE 90 (22) 3.3 min* (44) 53 (46)	3.49 (21)	12.1 (8)

Parámetros de efectos fijos:  $Cl/F$  (L/min), aclaramiento aparente de eliminación;  $Vc/F$  (L), volumen aparente de distribución del compartimento central;  $Cld/F$  (L/min), aclaramiento aparente de distribución;  $Vp/F$  (L), volumen aparente de distribución del compartimento periférico;  $Cld2/F$  (L/min), aclaramiento aparente de distribución del segundo compartimento periférico;  $Vp2/F$  (L), volumen aparente de distribución del segundo compartimento periférico;  $k_a$  ( $min^{-1}$ ), constante de velocidad de absorción de primer orden;  $t_{lag}$  (min), tiempo de latencia; F, biodisponibilidad. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII) se expresa como coeficiente de variación (%CV),  $Corr \eta_{k_a}, \eta_{Vc}$ , correlación entre  $\eta_{k_a}$  y  $\eta_{Vc/F}$ . La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado. NC: no converge. \*: VII está expresada como desviación estándar.

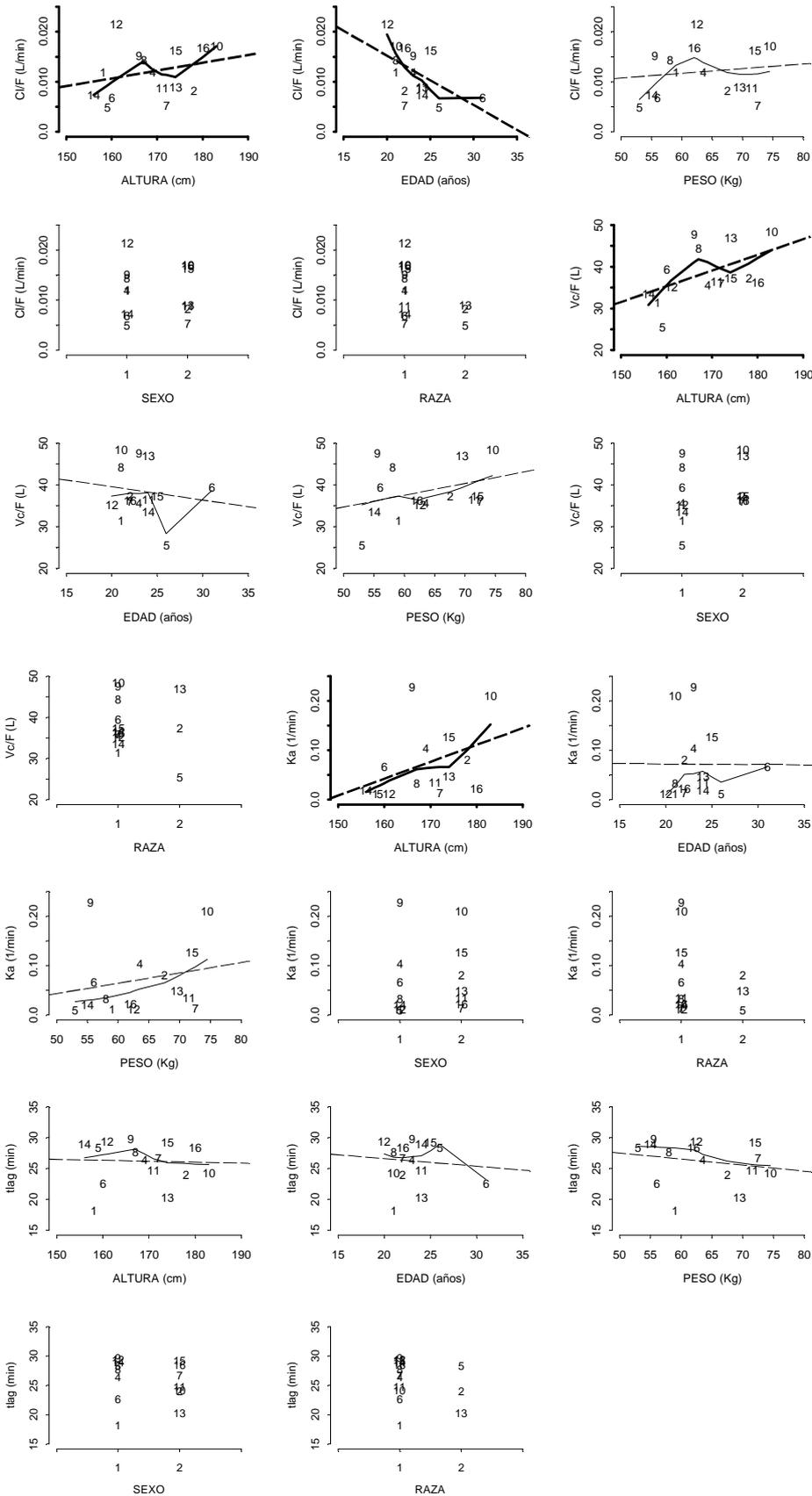
## 3.1.1.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables

Gráficamente (Figura 26) no se observó correlación entre covariables continuas, excepto para el peso y la altura que aparecieron correlacionados con una  $r=0.77$ . En las gráficas de covariables continuas frente a las categóricas, se apreció que las mujeres tenían un menor peso y una menor altura. Por ello, en el caso de que el peso y la altura influenciaran de manera estadísticamente significativa algún parámetro, solo introduciríamos el peso y además tendríamos en cuenta cuál de las dos variables peso y/o sexo presentaba una mayor correlación para decidir entre ellas.



**Figura 26:** Gráficas de dispersión de covariables. En los ejes de coordenadas aparece el nombre de las covariables. Los números representan par de valores para cada individuo. La línea continua representa la línea de tendencia y la línea discontinua la recta de regresión lineal.

A continuación, se realizó una inspección visual (Figura 27) de las relaciones entre los parámetros farmacocinéticos individuales bayesianos estimados a partir del modelo bicompartimental seleccionado en la etapa anterior (modelo 8, Tabla 14) y las covariables, para detectar potenciales relaciones. Se observó correlación entre el  $Cl/F$  y la edad y entre el  $Vc/F$  y la  $k_a$  y la altura. El empleo de modelos aditivos generalizados (GAM), reveló que el  $Cl/F$  estaba correlacionado con la edad y el  $Vc/F$  con la altura, ambas correlaciones de manera lineal.



**Figura 27:** Gráfico de dispersión bivariado que muestra la relación entre los parámetros farmacocinéticos individuales y las covariables. Los números representan el valor individual. La línea continua es la línea de tendencia y la línea discontinua es la recta de regresión lineal.

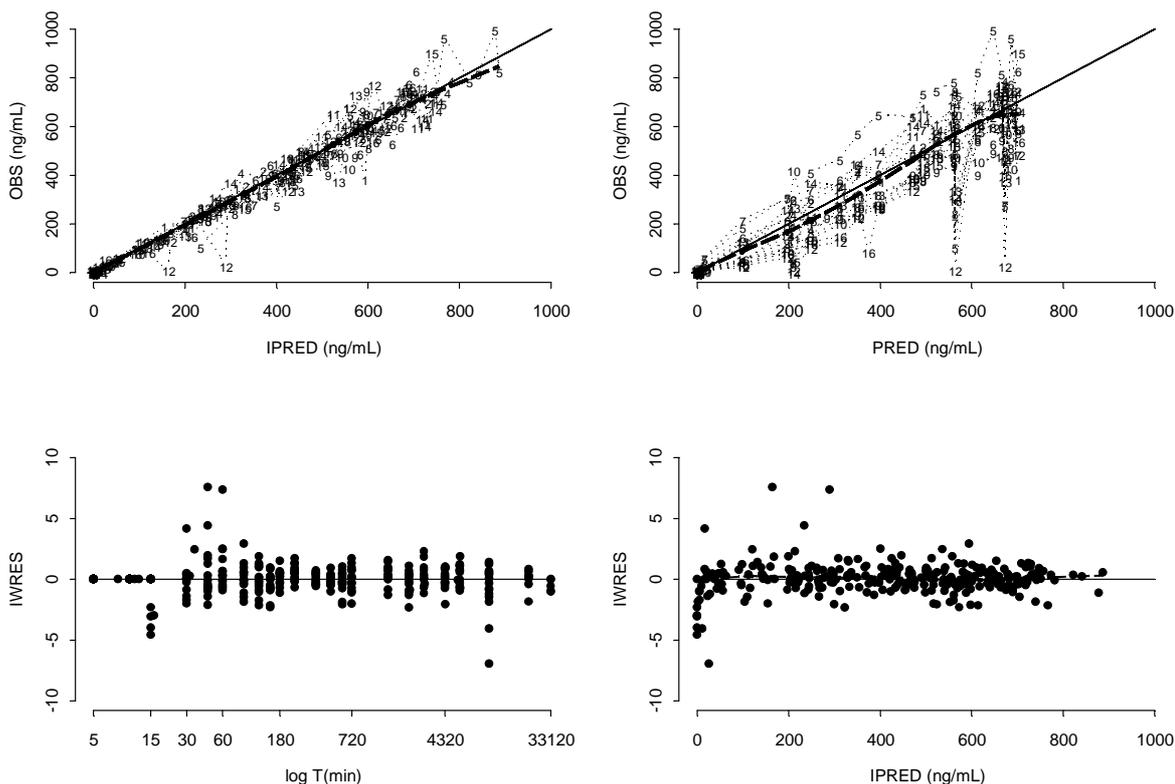
Las covariables identificadas en el GAM se introdujeron en el modelo de efectos mixtos y además se probaron otras relaciones observadas en las representaciones gráficas (peso en Vc/F, peso en Cl/F, sexo en  $k_a$ , sexo en Cl/F y edad en Cl/F), la tabla 15 resume el proceso. Ninguna de las covariables testadas cumplió con todos los criterios para ser retenida en el modelo. La incorporación del peso de modo alométrico en los parámetros de disposición (Cl/F y Vc/F) empeoró la predicción y aumentó la variabilidad interindividual. Por lo tanto el modelo final seleccionado para describir la farmacocinética de DMDZ tras su administración por vía oral no incluyó ninguna covariable, y se corresponde con el descrito como número 8 en la tabla 14.

**Tabla 15:** Resumen de los modelos utilizados para examinar la influencia de las covariables en la farmacocinética de DMDZ tras la administración de 30mg de DMDZ.

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	$\Delta$ OBJ
¿La edad influye en el Cl/F?	1	TVCl/F = $\theta_1 * \exp(-\theta_2 * \text{edad})$ Cl/F = TVCl/F * $e^{\eta_{Cl/F}}$	-8.9
¿El peso influye en el Vc/F?	2	TVVc/F = $\theta_1 + \theta_2 * \text{peso}$ Vc/F = TVVc/F * $e^{\eta_{Vc/F}}$	NC
¿El peso influye en el Vc/F?	3	TVVc/F = $\theta_1 + \theta_2 * (\text{peso}-63.5)$ Vc/F = TVVc/F * $e^{\eta_{Vc/F}}$	-9
¿El peso influye en el Cl/F y el Vc/F?	4	TVCl/F = $\theta_1 * (\text{peso}/63.5)^{0.75}$ Cl/F = TVCl/F * $e^{\eta_{Cl/F}}$ TVVc/F = $\theta_2 * (\text{peso}/63.5)$ Vc/F = TVVc/F * $e^{\eta_{Vc/F}}$	-8
¿El sexo influye en el Vc/F?	5	Si (sexo = ♀) Vc/F = $\theta_1$ Si (sexo = ♂) Vc/F = $\theta_2$ Vc/F = TVVc/F * $e^{\eta_{Vc/F}}$	-9
¿El sexo influye en la $k_a$ ?	6	Si (sexo = ♀) $k_a$ = $\theta_1$ Si (sexo = ♂) $k_a$ = $\theta_2$ $k_a$ = TVka * $e^{\eta_{ka}}$	-7
¿La edad influye en el Cl/F?	7	TVCl/F = $\theta_1 - \theta_2 * (\text{edad} - 23)$ Cl/F = TVCl/F * $e^{\eta_{Cl/F}}$	-8

$\Delta$ OBJ: diferencia entre el valor de la función objetiva en NONMEM comparado con el valor del modelo estructural que no incluye covariables. NC: no converge.

El modelo final seleccionado (modelo bicompartimental con absorción de primer orden y tiempo de latencia desde el compartimento de absorción al compartimento central y con eliminación de primer orden desde este compartimento) describió adecuadamente tanto la tendencia poblacional de los datos (Figura 28, panel superior derecho) como el perfil de concentraciones individuales (Figura 28, panel superior izquierdo). La estimación de parámetros aleatorios no presentó sesgos de predicción (Figura 28, panel inferior izquierdo y derecho) y los errores de estimación fueron inferiores al 50% para todos los parámetros. En la Tabla 16 se muestran los parámetros del modelo final seleccionado.



**Figura 28:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado para describir las concentraciones plasmáticas de DMDZ tras la administración de 30 mg DMDZ. Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo y panel inferior derecho, residuales individuales ponderados frente a las concentraciones individuales predichas. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.

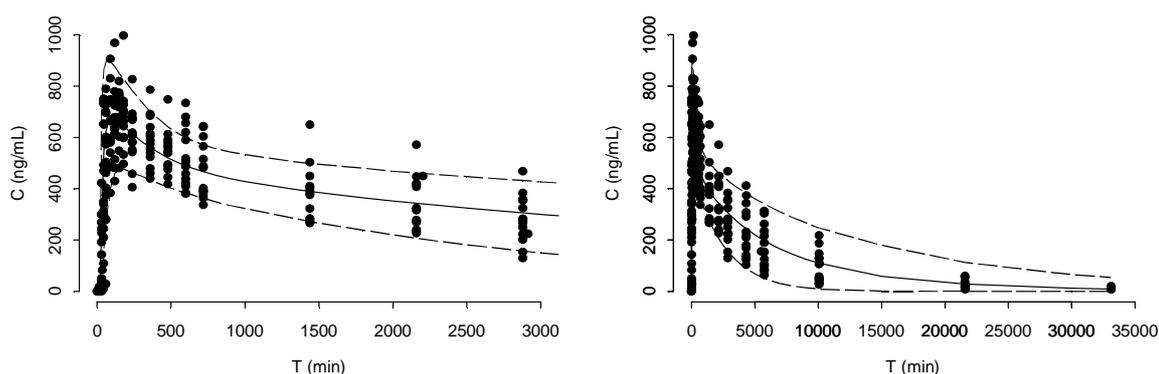
**Tabla 16:** Parámetros estimados por el modelo farmacocinético de DMDZ seleccionado.

PARÁMETRO	ESTIMADO	EER (%)	VII (CV%)	EER (%)
Cl/F (L/min)	0.0095	11	46	23
Vc/F (L)	39.9	5	16	44
Cl <sub>d</sub> /F (L/min)	0.038	25	NE	NE
Vp/F (L)	18	12	90	22
k <sub>a</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.073	21	3.3	44
t <sub>lag</sub> (min)	25.5	5.9	53	46
Corr η <sub>ka</sub> , η <sub>Vc</sub> (%)	53	46	-	-
Error residual (ng/mL)	3.49	21	-	-
Error residual (%)	12.1	8	-	-

Parámetros de efectos fijos: Cl/F, aclaramiento aparente de eliminación; Vc/F, volumen aparente de distribución del compartimento central; Cl<sub>d</sub>/F, aclaramiento aparente de distribución; Vp/F, volumen aparente de distribución del compartimento periférico; k<sub>a</sub>, constante de velocidad de absorción de primer orden; t<sub>lag</sub>, tiempo de latencia de absorción; F, fracción de DMDZ que llega inalterado a circulación sistémica. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII), se expresa como coeficiente de variación (%CV). Corr η<sub>ka</sub>, η<sub>Vc</sub>, correlación entre η<sub>ka</sub> y η<sub>Vc</sub>. La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado

### 3.1.1.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

Los percentiles 2.5 y 97.5 de los 1000 perfiles de concentraciones plasmáticas vs tiempo simulados mediante simulaciones de Monte Carlo, se representaron junto con las concentraciones plasmáticas observadas, añadiendo el promedio de las concentraciones simuladas. Aproximadamente el 2.5% de las concentraciones observadas se distribuyeron de manera homogénea por debajo y por encima del percentil 2.5 y 97.5% respectivamente (figura 29), hecho que reflejó una buena capacidad predictiva del modelo de DMDZ seleccionado.

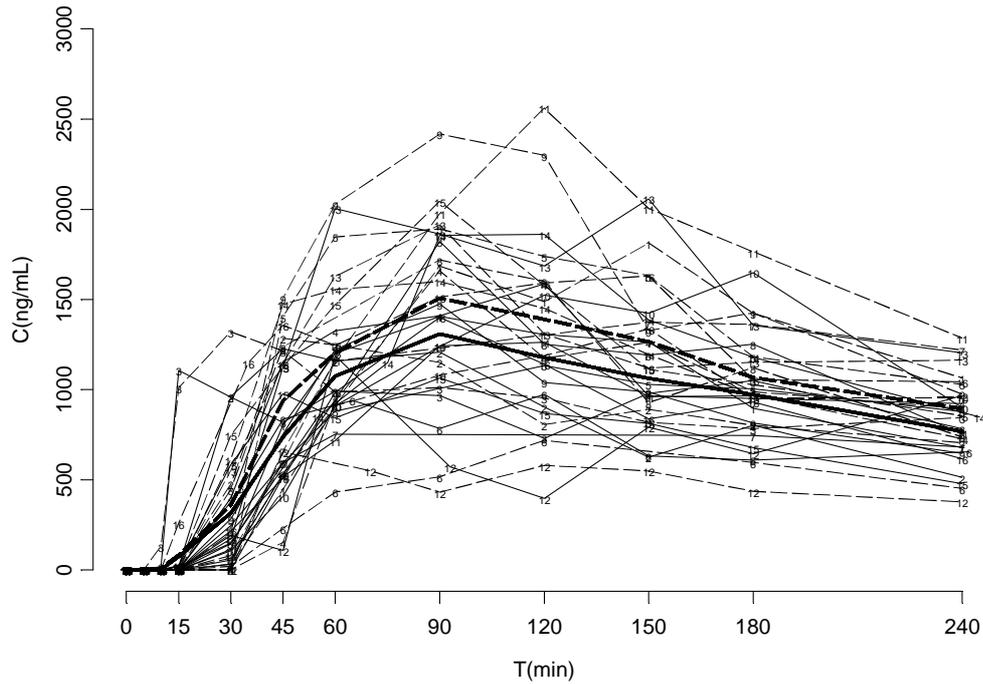


**Figura 29:** Evaluación visual de la predicción del modelo farmacocinético seleccionado. Los puntos representan las observaciones de DMDZ, la línea continua representa la media de la predicción poblacional con el modelo seleccionado y las líneas discontinuas engloban el intervalo de predicción del 95% alrededor de la media.

### 3.1.2.- Desarrollo del modelo FC poblacional de DZ tras su administración por vía oral

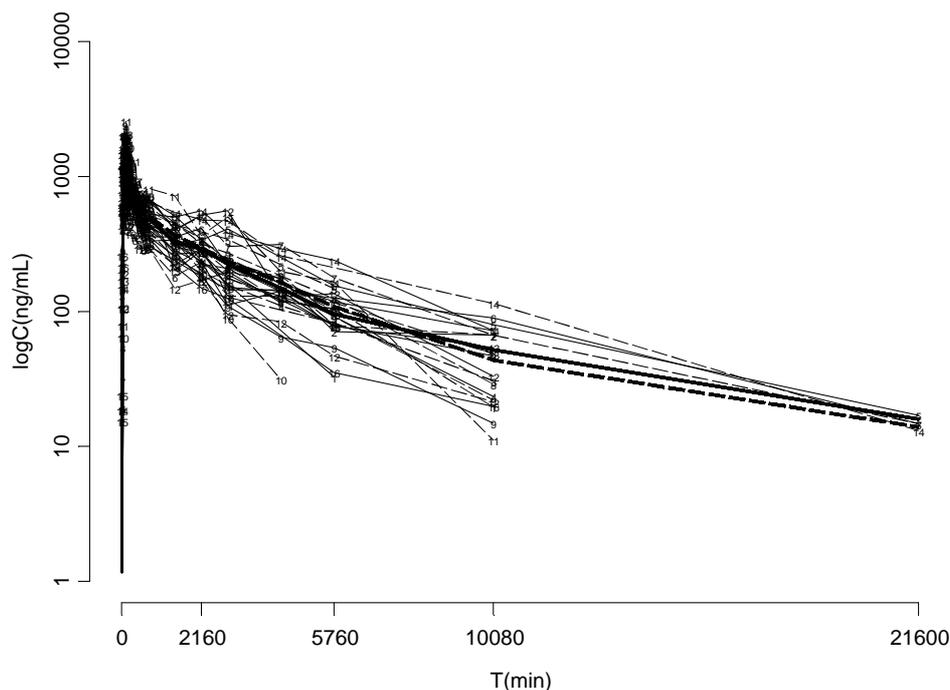
#### 3.1.2.1.- Análisis exploratorio de datos

Las concentraciones plasmáticas de DZ observadas tras la administración de 30 mg de DZ por segunda vez, parecen ligeramente superiores a las observadas tras la primera vez que se administra. En la figura 30 se observa que no hay concentraciones por encima del límite de cuantificación hasta el minuto 15 ó 30 dependiendo de los voluntarios, con la excepción del voluntario 3, que tras ambas administraciones presentó niveles cuantificables de DZ tras la toma de la primera muestra de sangre en el minuto 10.



**Figura 30:** Concentraciones plasmáticas de DZ vs tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa las concentraciones plasmáticas observadas a cada punto temporal. Las líneas continuas y discontinuas finas representan la interpolación lineal de las observaciones tras la ocasión 1 y tras la ocasión 2, respectivamente. La línea gruesa continua y discontinua representan la media de las observaciones tras la ocasión 1 y tras la ocasión 2, respectivamente.

En la figura 31, se representa el curso temporal de las concentraciones plasmáticas hasta los 21600 min para ambas ocasiones. Se han omitido los puntos temporales correspondientes a 33120 y 44640 min ya que no se obtuvieron concentraciones cuantificables de DZ a esos tiempos. Se pueden apreciar claramente dos pendientes en la mayoría de individuos. Los promedios de las concentraciones plasmáticas en las fase de eliminación tras ambas administraciones de DZ, transcurre prácticamente igual y no aprecian diferencias.



**Figura 31:** Concentraciones plasmáticas de DZ vs tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa las concentraciones plasmáticas observadas a cada punto temporal. Las líneas continuas y discontinuas finas representan la interpolación lineal de las observaciones tras la ocasión 1 y tras la ocasión 2, respectivamente. La línea gruesa continua y discontinua representan la media de las observaciones tras la ocasión 1 y tras la ocasión 2, respectivamente.

### 3.1.2.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural

Empezamos el desarrollo del modelo con estructura monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden y con VII en todos los parámetros fijos. Con esta estructura, la predicción subestimaba las concentraciones en la parte de la absorción y distribución, hecho que hizo que incorporáramos un segundo compartimento de distribución. Con este cambio, tanto el ajuste del modelo (descenso de 50 puntos en la OBJ) como la predicción del modelo mejoraron significativamente (desaparición del sesgo sistemático en absorción y distribución y disminución de la variabilidad residual). Se testó un modelo de tres compartimentos, pero no se consiguió un ajuste adecuado a los datos. Se consideró por tanto que, al igual que ocurre tras la administración de DMDZ por vía oral, un modelo de 2 compartimentos describía de forma adecuada la farmacocinética del DZ tras administrar 30 mg por vía oral (Figuras 33 y 34). En la tabla 17 se recogen los modelos clave del desarrollo del modelo farmacocinético poblacional para DZ.

### 3.1.2.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

Puesto que el rango de concentraciones de DZ evaluado era superior a un orden de magnitud, se incorporó una parte proporcional al error residual. A pesar de observar una disminución de la

variabilidad residual y una disminución de la OBJ ( $p < 0.05$ ), la parte de absorción se estimaba peor por lo que se continuó trabajando con un modelo de error aditivo. La siguiente estrategia consistió en cambiar el método de minimización de FO a FOCE puesto que el tiempo necesario para tener resultados era breve y no suponía un retraso. En este modelo y debido al perfil de absorción diferente que mostraba el individuo 3, se decidió continuar el desarrollo del modelo sin este individuo. A pesar de ello el modelo proporcionaba estimados de los parámetros poco plausibles, lo que, en determinadas situaciones puede ser indicativo de un modelo sobreparametrizado. Por ello se procedió a determinar cuáles eran aquellos parámetros en los que los datos permitían poder estimar variabilidad interindividual. Se empezó probando modelos que sólo incorporaran variabilidad interindividual en un parámetro, encontrándose el mejor ajuste para un modelo con VII en  $V_c/F$ . Se continuó a partir de este modelo, encontrándose que la adición de VII en  $k_a$ , mejoraba sustancialmente el modelo, y que, cualquier intento por introducir VII en otros parámetros no mejoraba la descripción de los datos. En el siguiente paso, se incorporó una parte proporcional al modelo de error y la OBJ disminuyó 617 puntos y mejoraron las gráficas de bondad de ajuste (WRES vs PRED, IWRES vs PRED e IWRES vs IPRED) respecto del modelo con error aditivo. Sin embargo, las concentraciones de DZ durante la fase de absorción estaban sobreestimadas y el error proporcional era alto (de un 32%). Optamos por añadir VII en el CI y mejoraron los EER, disminuyó la VII en  $V_c/F$  y el error residual. Se detectó en este modelo que la asunción de normalidad para los parámetros que describen la VII no se cumplía, por lo que se cambió de nuevo el método de minimización. Se testó en primer lugar la opción CENTERING, sin obtenerse la mejora deseada. Con la opción INTERACTION sí que se detectó una mayor cercanía en la distribución de las etas a la asunción de normalidad. Puesto que la observación inicial de los datos hacía prever la necesidad de incorporar VII en el tiempo de latencia, se introdujo en el modelo y se obtuvo un mejor del ajuste. Finalmente, y puesto que el fármaco se había administrado en dos ocasiones, se evaluó la posibilidad de que hubiera diferencias en los parámetros en función de la ocasión evaluada. Dos asunciones mejoraron la predicción del modelo: en la primera se asumió que la biodisponibilidad de diazepam era diferente en función de la ocasión mediante el empleo de parámetros fijos, y en la segunda empleando parámetros aleatorios. La asunción de un cambio en la biodisponibilidad del diazepam al azar fue la que mejor describió los datos, tanto gráfica como estadísticamente (descenso de OBJ de casi 200 puntos).

Tabla 17: Desarrollo del modelo farmacocinético poblacional de DZ.

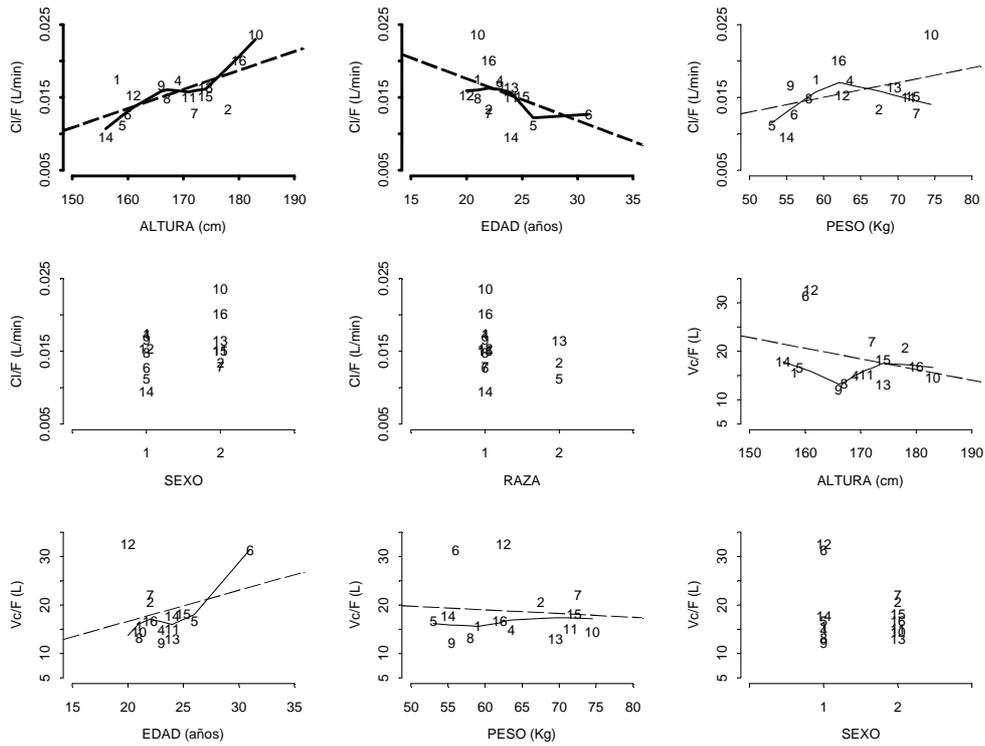
HIPOTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿Una estructura monocompartimental describe los datos?	1	Monocompartimental $Cl/F = TVCl/F * e^{n_{Cl/F}}$ $Vc/F = TVVc/F * e^{n_{Vc/F}}$ $k_a = TVk_a * e^{n_{k_a}}$ $t_{lag} = TVt_{lag} * e^{n_{t_{lag}}}$ METHOD= FO	7711	$Cl/F = 0.016$ (8.3) $Vc/F = 42.5$ (4.9) $k_a = 0.017$ (5.5) $t_{lag} = 25.1$ (4.4)	17 (141.9) 17 (37.8) 368 (14.0) 126 (59.6)	189 (14.2)	
¿Es necesario incorporar otro compartimento de distribución?	2	Bicompartmental $Cl/F = TVCl/F * e^{n_{Cl/F}}$ $Vc/F = TVVc/F * e^{n_{Vc/F}}$ $Cl_d/F = TVCl_d/F$ $Vp/F = TVVp/F$ $k_a = TVk_a * e^{n_{k_a}}$ $t_{lag} = TVt_{lag} * e^{n_{t_{lag}}}$ METHOD= FO	7661	$Cl/F = 0.015$ (7.2) $Vc/F = 16.3$ (10.6) $Cl_d/F = 0.07$ (10) $Vp/F = 27$ (4.7) $k_a = 0.03$ (12) $t_{lag} = 25.1$ (4.7)	21 (69) 40 (37) NE NE 51 (43) 25 (92)	189.3 (14.1)	
¿Mejora el modelo la incorporación de un tercer compartimento?	3	Tricompartmental $Cl/F = TVCl/F * e^{n_{Cl/F}}$ $Vc/F = TVVc/F * e^{n_{Vc/F}}$ $Cl_d/F = TVCl_d/F$ $Vp1/F = TVVp1/F$ $Cl_{d2}/F = TVCl_{d2}/F$ $Vp2/F = TVVp2/F$ $k_a = TVk_a * e^{n_{k_a}}$ $t_{lag} = TVt_{lag} * e^{n_{t_{lag}}}$ METHOD= FO	7778	$Cl/F = 0.014$ (NC) $Vc/F = 17.7$ (NC) $Cl_d/F = 0.007$ (NC) $Vp1/F = 1.1 * 10^6$ (NC) $Cl_{d2}/F = 0.071$ (NC) $Vp2/F = 27.6$ (NC) $k_a = 0.034$ (NC) $t_{lag} = 25.1$ (NC)	NC 31.6 (NC) NE NE NE NE NC NC	214 (NC)	
¿Es necesario añadir una parte proporcional al modelo de error?	4	Bicompartmental =Run 2, con error combinado	6878	$Cl/F = 0.014$ (7) $Vc/F = 18.6$ (11.4) $Cl_d/F = 0.06$ (13.3) $Vp/F = 29.9$ (6.28) $k_a = 0.05$ (12.2) $t_{lag} = 12.8$ (8.1)	26 (40) 35 (52) NE NE 130 (19) 26 (100)	13.78 (94.2)	0.27 (22.3)
¿Mejora la estimación el uso de método de minimización FOCE?	5	Bicompartmental =Run 2, con METHOD= FOCE	8611	$Cl/F = 0.029$ (NC) $Vc/F = 7.75$ (NC) $Cl_d/F = 0.08$ (NC) $Vp/F = 24.5$ (NC) $k_a = 0.051$ (NC) $t_{lag} = 1.99$ (NC)	55 (NC) 54 (NC) NE NE 99 (NC) 64 (NC)	95.8 (NC)	
¿Influye en el resultado del modelo el individuo 3?	6	Bicompartmental = Run 5, sin individuo 3	9819	$Cl/F = 0.0143$ (NC) $Vc/F = 268$ (NC) $Cl_d/F = 0.132$ (NC) $Vp/F = 25.9$ (NC) $k_a = 0.0078$ (NC) $t_{lag} = 54.8$ (NC)	32 (NC) 2100 (NC) NE NE 87 (NC) 78 (NC)	67.6 (NC)	
¿El modelo está sobrep parametrizado?	7	Bicompartmental = Run 6, con solo VII en $Vc/F$	7209	$Cl/F = 0.015$ (8.6) $Vc/F = 15.1$ (20) $Cl_d/F = 0.07$ (18) $Vp/F = 27$ (5.2) $k_a = 0.029$ (25) $t_{lag} = 25.9$ (3)	NE 34 (44) NE NE NE NE	200 (13)	
¿El mejor modelo con VII en dos parámetros es el que la incorpora en $k_a$ ?	8	Bicompartmental = Run 7, añadiendo VII en $k_a$	7134	$Cl/F = 0.015$ (8.7) $Vc/F = 14.9$ (11) $Cl_d/F = 0.075$ (9) $Vp/F = 27.5$ (4.6) $k_a = 0.034$ (16) $t_{lag} = 26.4$ (2.8)	NE 44 (37) NE NE 66 (54) NE	180 (14)	

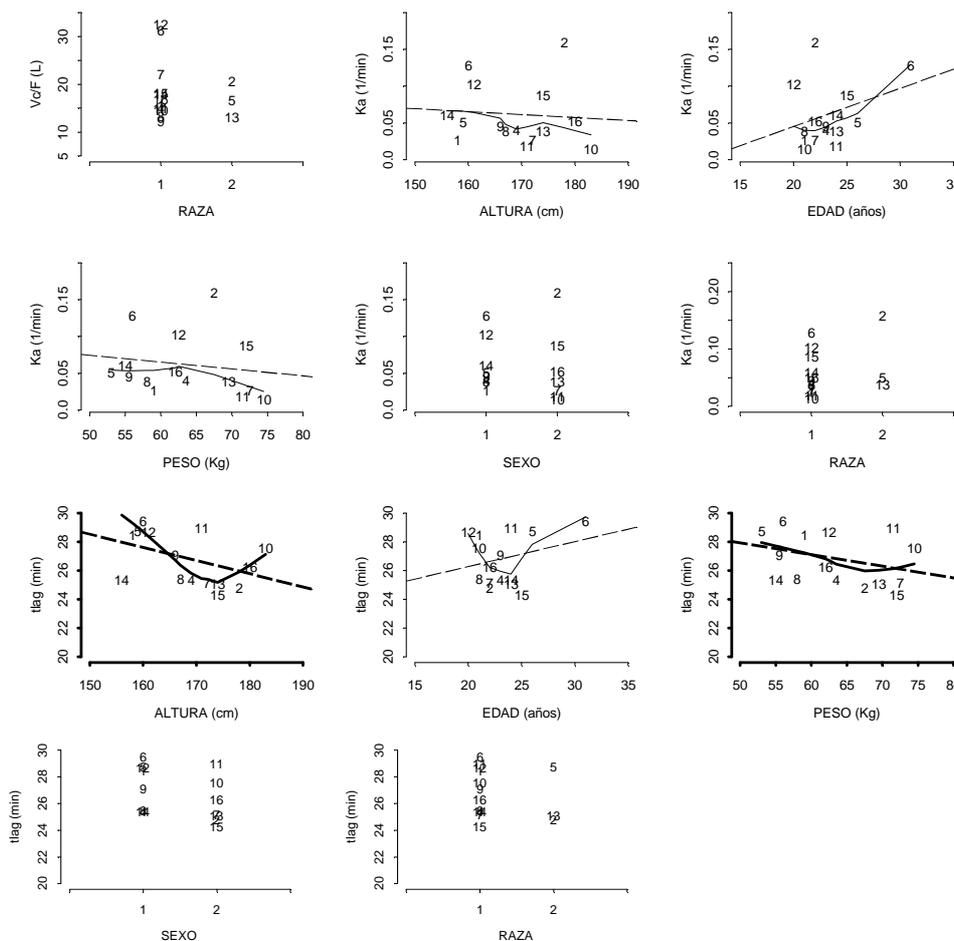
HIPOTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿Es necesario añadir una parte proporcional al modelo de error?	9	Bicompartmental = Run 8, con error combinado	6517	Cl/F = 0.014 (8.8) Vc/F = 21.2 (20) Cl <sub>d</sub> /F = 0.06 (13) Vp/F = 29.7 (6.4) k <sub>a</sub> = 0.11 (25) t <sub>lag</sub> = 26.8 (2)	NE 43 (65) NE NE 120 (33) NE	31.7 (11)	24.5 (45)
¿Mejora el modelo la inclusión de VII en el Cl/F?	10	Bicompartmental = Run 9, añadiendo VII en Cl/F	6431	Cl/F = 0.014 (8.5) Vc/F = 17 (14) Cl <sub>d</sub> /F = 0.06 (13) Vp/F = 27.4 (5.8) k <sub>a</sub> = 0.109 (22) t <sub>lag</sub> = 26.7 (2.1)	25 (40) 39 (47) NE NE 120 (29) NE	25.8 (12)	23.4 (44)
¿Mejora la estimación con el método de minimización FOCE CENTERING?	11	Bicompartmental = Run 10 con METHOD=FOCE CENT	6478	Cl/F = 0.014 (2.5) Vc/F = 17.5 (3.9) Cl <sub>d</sub> /F = 0.06 (11) Vp/F = 28 (6) k <sub>a</sub> = 0.046 (14) t <sub>lag</sub> = 25.9 (3.8)	25 (42) 37 (42) NE NE 71 (39) NE	30.3 (6.9)	23.4 (44)
¿Es necesario utilizar el método de minimización FOCE INTERAC-TION?	12	Bicompartmental = Run 10, con METHOD=FOCE INTER	6456	Cl/F = 0.015 (7.1) Vc/F = 18.4 (10) Cl <sub>d</sub> /F = 0.06 (8.8) Vp/F = 28.1 (7.5) k <sub>a</sub> = 0.064 (27) t <sub>lag</sub> = 27.6 (3)	24 (37) 35 (40) NE NE 89 (48) NE	30 (10)	24.1 (45)
¿Es posible añadir VII en t <sub>lag</sub> pero de manera aditiva?	13	Bicompartmental = Run12, incorporando VII en t <sub>lag</sub> de manera aditiva	6450	Cl/F = 0.015 (7.1) Vc/F = 17.9 (12) Cl <sub>d</sub> /F = 0.06 (9.9) Vp/F = 28.1 (7.0) k <sub>a</sub> = 0.054(26) t <sub>lag</sub> = 27.2 (3)	24 (37) 34 (45) NE NE 80 (50) 1.6 (53)	29 (11)	24.3 (44)
¿Es posible introducir F diferente en función de la ocasión?	14	Bicompartmental = Run 13, F <sub>(OCC=1)</sub> = 1 F <sub>(OCC=2)</sub> = 1/TVF	6439	TVF= 0.91 (9.9) Cl/F = 0.016 (8.8) Vc/F = 18.6 (9.8) Cl <sub>d</sub> /F = 0.07 (15) Vp/F = 29.5 (8) k <sub>a</sub> = 0.051 (27) t <sub>lag</sub> = 27 (3.2)	NE 25 (37) 34 (45) NE NE 80 (50) 1.6 (53)	28 (13)	24.3 (44)
¿Es mejor introducir VIO en F en función del azar?	15	Bicompartmental = Run 13, con VIO en F	6278	<b>F = 1</b> <b>VIO<sub>F</sub></b> Cl/F = 0.015 (7.1) Vc/F = 18 (12) Cl <sub>d</sub> /F = 0.06 (12) Vp/F = 28.7 (6.4) k <sub>a</sub> = 0.05 (24) t <sub>lag</sub> = 26.7 (3.2)	<b>23 (26)**</b> <b>24 (53)</b> <b>33 (44)</b> NE NE <b>69 (52)</b> <b>2 (45)</b>	22 (10)	24.1 (42)

Parámetros de efectos fijos: Cl/F (L/min), aclaramiento aparente de eliminación; Vc/F (L), volumen aparente de distribución del compartimento central; Cl<sub>d</sub>/F (L/min), aclaramiento aparente de distribución; Vp/F (L), volumen aparente de distribución del compartimento periférico; k<sub>a</sub> (min<sup>-1</sup>), constante de velocidad de absorción de primer orden; t<sub>lag</sub> (min), tiempo de latencia; F, biodisponibilidad de DZ. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII) expresada como coeficiente de variación (%CV), variabilidad interocasión (VIO) expresada como coeficiente de variación (%CV). La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado. \*: VII está expresada como desviación estándar. \*\* valor estimado de VIO.

3.1.2.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables

Para terminar, se hizo un análisis preliminar para explorar una posible correlación entre cada parámetro individual con cada una de las covariables recogidas durante el estudio (edad, peso, altura, sexo y raza). En la Figura 32 apreciamos cierta correlación lineal con pendiente positiva entre CI/F y altura, correlación lineal o exponencial con pendiente negativa entre CI/F y edad y correlación lineal entre tiempo de latencia con peso y altura.





**Figura 32:** Gráfico de dispersión bivariado que muestra la relación entre los parámetros farmacocinéticos individuales de DZ estimados por el modelo 15 y las covariables. Los números representan el valor individual. La línea continua es la línea de tendencia y la línea discontinua es la recta de regresión lineal.

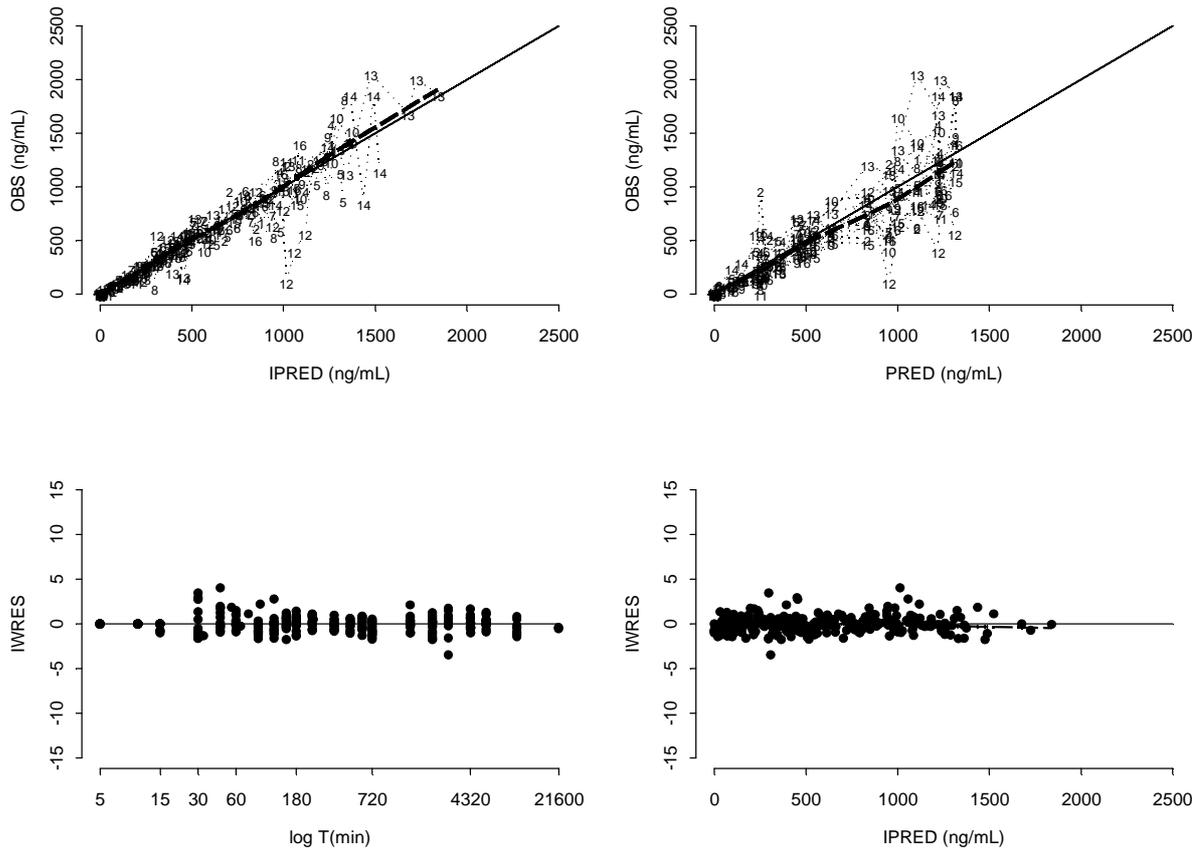
Posteriormente se realizó un análisis GAM detectándose una correlación estadísticamente significativa ente la altura y el CI/F y entre la altura el tiempo de latencia. Esta última correlación no se inspeccionó en el siguiente análisis debido a la falta de significado fisiológico. Como la correlación altura-CI/F también carecía de sentido fisiológico pero la altura estaba correlacionada con el peso, se introdujo el peso como covariable en el CI/F (Tabla 18). Su incorporación no supuso una mejora en el modelo ni a nivel estadístico ni a nivel de predicción. Por otro lado, gráficamente se había detectado una posible correlación entre el valor del CI/F y la edad, por lo que se testó dicha hipótesis sin obtener mejora de grado significativo en el modelo. También se probó un modelo alométrico incorporando el peso en CI/F y Vc/F, pero tampoco mejoró el modelo sin covariables. Ninguna de las covariables testadas causó una disminución significativa en la OBJ, EER, VII ni derivó en que la gráficas res / wres vs pred se distribuyeran mejor alrededor de 0. Por todo ello, el modelo final seleccionado para describir la farmacocinética de DZ fue el modelo 15 en la tabla 17.

**Tabla 18:** Resumen de los modelos utilizados para examinar la influencia de las covariables en la farmacocinética de DZ.

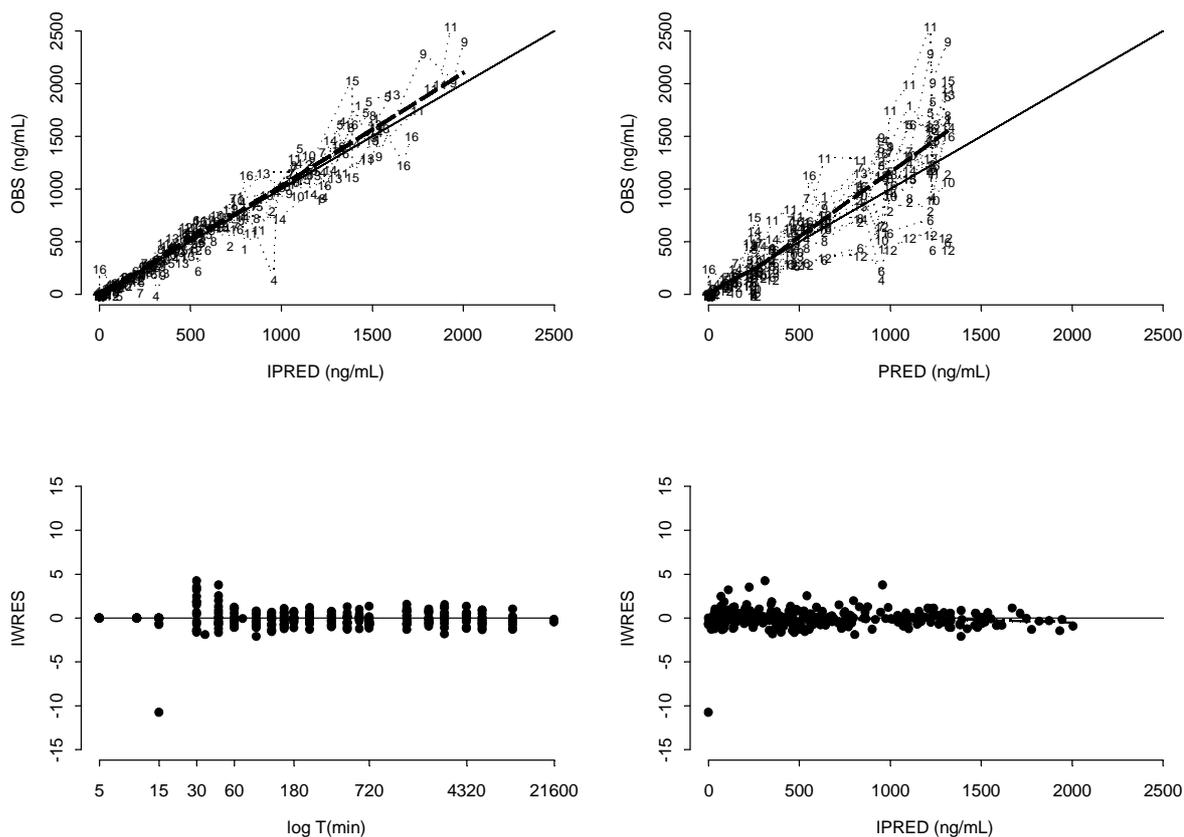
HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	ΔOBJ
¿El peso influye en el Cl/F?	1	$TVCl/F = \theta_1 * \text{peso}$ $Cl/F = TVCl/F * e^{\theta_{Cl/F}}$	-3
¿El peso influye en el Cl/F?	2	$TVCl/F = \theta_1 + \theta_2 * (\text{peso} - 63.5)$ $Cl/F = TVCl/F * e^{\theta_{Cl/F}}$	-3
¿La edad influye en el Cl/F?	3	$TVCl/F = \theta_1 - \theta_2 * (\text{edad} - 23.3)$ $Cl/F = TVCl/F * e^{\theta_{Cl/F}}$	-4
¿La edad influye en el Cl/F?	4	$TVCl = \theta_1 * \exp(-\theta_2 * \text{edad})$	-4
¿El peso influye en el Cl/F y el Vc/F?	5	$TVCl/F = \theta_1 * (\text{peso}/63.5) e^{0.75}$ $Cl/F = TVCl/F * e^{\theta_{Cl/F}}$ $TVVc/F = \theta_2 * (\text{peso}/63.5)$ $Vc/F = TVVc/F * e^{\theta_{Vc/F}}$	-2

ΔOBJ: diferencia entre el valor de la función objetiva en NONMEM comparado con el valor del modelo estructural (modelo 15 tabla 17).

El modelo final seleccionado (modelo bicompartimental con absorción de primer orden y tiempo de latencia desde el compartimento de absorción al compartimento central y con eliminación de primer orden desde este compartimento) describió adecuadamente tanto la tendencia poblacional de los datos (Figuras 33 y 34, panel superior derecho) como el perfil de concentraciones individuales (Figuras 33 y 34, panel superior izquierdo). La estimación de parámetros aleatorios no presentó sesgos de predicción (Figuras 33 y 34, paneles inferiores) y los errores de estimación fueron inferiores al 50% para todos los parámetros. En la tabla 19 se muestran los parámetros del modelo final seleccionado.



**Figura 33:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado considerando las concentraciones plasmáticas de DZ1 (tras la primera administración de 30 mg DZ). Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, concentraciones plasmáticas observadas vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo y panel inferior derecho, residuales individuales ponderados frente a las concentraciones individuales predichas. Paneles superiores, la línea sólida fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia.



**Figura 34:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado considerando las concentraciones plasmáticas de DZ2 (tras la segunda administración de 30 mg DZ). Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, concentraciones plasmáticas observadas vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo y panel inferior derecho, residuales individuales ponderados frente a las concentraciones individuales predichas. Paneles superiores, la línea sólida fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia.

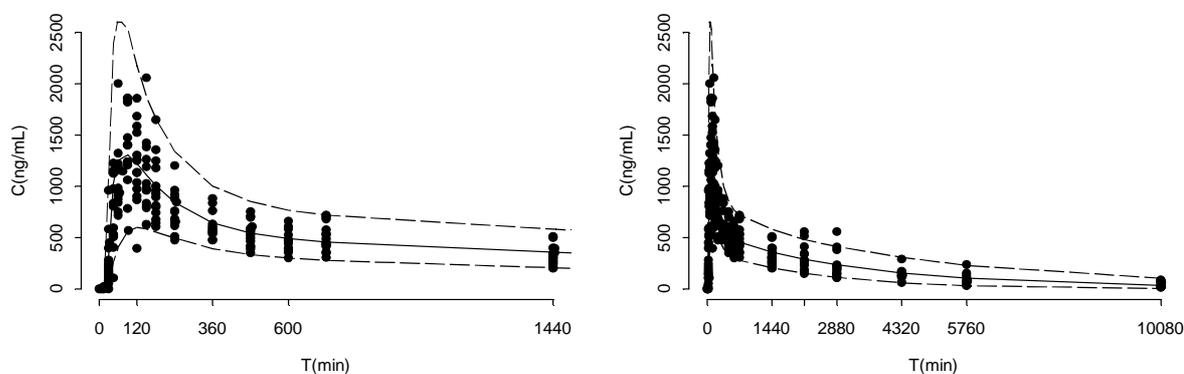
**Tabla 19:** Parámetros estimados por el modelo seleccionado para describir la farmacocinética de DZ.

PARÁMETRO	ESTIMADO	EER (%)	VII (CV%)	EER (%)
F	1 FIJADO	-	-	-
VIO	-	-	23	26
Cl/F (L/min)	0.015	7.1	24	53
Vc/F (L)	18	12	NE	NE
Cl <sub>d</sub> /F (L/min)	0.06	12	NE	NE
V <sub>p</sub> /F (L)	28.7	6.4	NE	NE
k <sub>a</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.05	24	69	52
t <sub>lag</sub> (min)	26.7	3.2	NE	NE
Error residual (ng/mL)	22	10	-	-
Error residual (%)	24.1	42	-	-

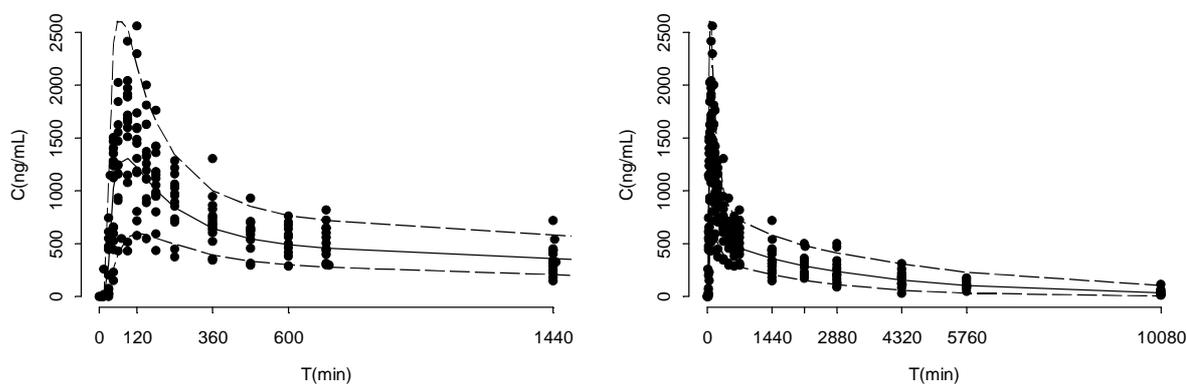
Parámetros de efectos fijos: Cl/F, aclaramiento aparente de eliminación; Vc/F, volumen aparente de distribución del compartimento central; Cl<sub>d</sub>/F, aclaramiento aparente de distribución; V<sub>p</sub>/F, volumen aparente de distribución del compartimento periférico; k<sub>a</sub>, constante de velocidad de absorción de primer orden; t<sub>lag</sub>, tiempo de latencia de absorción. F: biodisponibilidad de DZ. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII), se expresa como coeficiente de variación (%CV). La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado

### 3.1.2.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

Los percentiles 2.5 y 97.5 de los 1000 perfiles de concentraciones plasmáticas generadas para ambas administraciones de DZ mediante simulaciones de Monte Carlo, se representaron frente a las concentraciones plasmáticas observadas. Aproximadamente el 2.5% de las concentraciones observadas se distribuyeron de manera homogénea por debajo y por encima del percentil 2.5 y 97.5% respectivamente (figuras 35 y 36), hecho que reflejó una buena capacidad predictiva del modelo de DZ seleccionado. No obstante, la VII estimada en la parte de la absorción es superior a la observada. En las figuras 35 y 36, se muestra la capacidad predictiva del modelo tras ambas administraciones de DZ, hasta los 10080 min, ya que en el punto temporal de 21600 min solo hay 4 observaciones y la introducción de este punto en la gráfica no permite observar la predicción con comodidad en la parte de la eliminación.



**Figura 35:** Evaluación visual de la capacidad predictiva del modelo farmacocinético seleccionado tras la primera administración de DZ. Los puntos representan las observaciones de DZ, la línea continua representa la predicción poblacional con el modelo seleccionado y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 2.5 y 97.5 respectivamente.



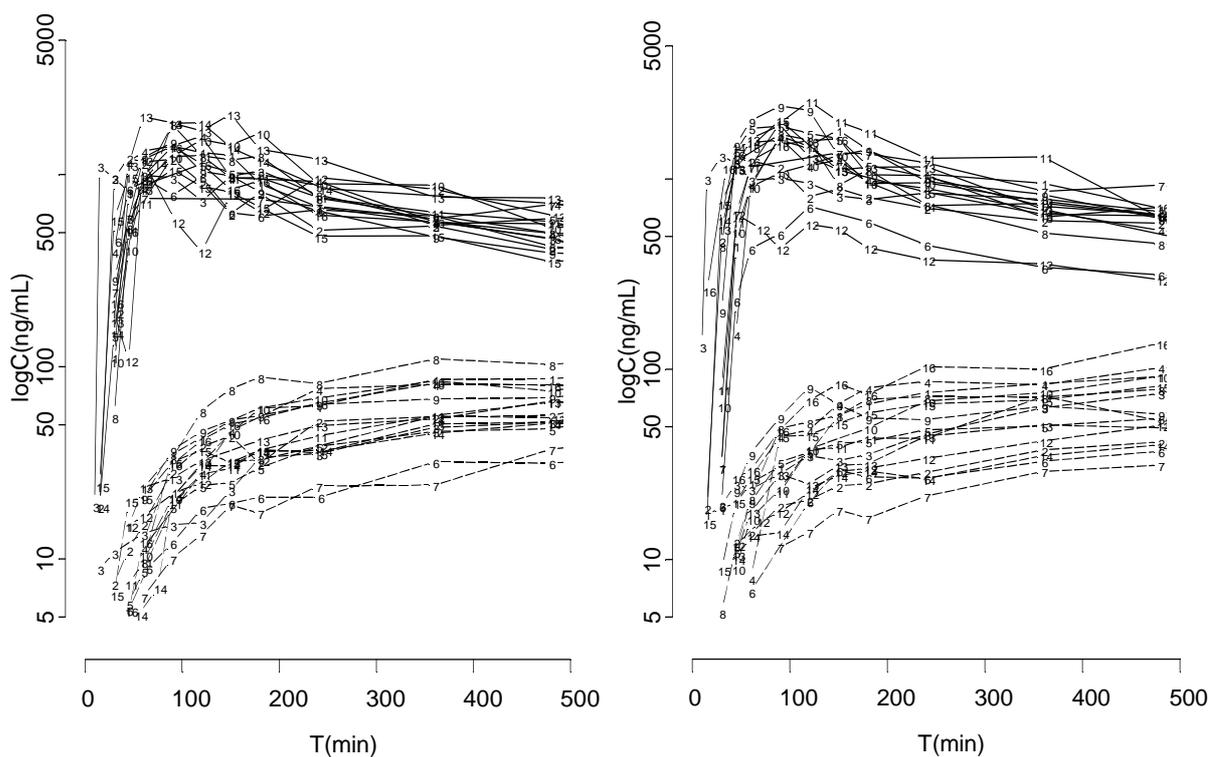
**Figura 36:** Evaluación visual de la capacidad predictiva del modelo farmacocinético seleccionado tras la segunda administración de DZ. Los puntos representan las observaciones de DZ, la línea continua representa la predicción poblacional con el modelo seleccionado y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 2.5 y 97.5 respectivamente.

### 3.1.3.- Desarrollo del modelo FC poblacional de DMDZ tras la administración de DZ por vía oral, fijando DZ.

Se desarrolló la parte estructural y estadística del modelo, pero no se estudiaron las covariables ni se evaluó su capacidad predictiva ya que el objetivo era conocer la estructura del modelo que mejor se ajustaba a nuestros datos y así facilitar la tarea en el desarrollo del modelo simultáneo de DZ + DMDZ.

#### 3.1.3.1.- Análisis exploratorio de datos

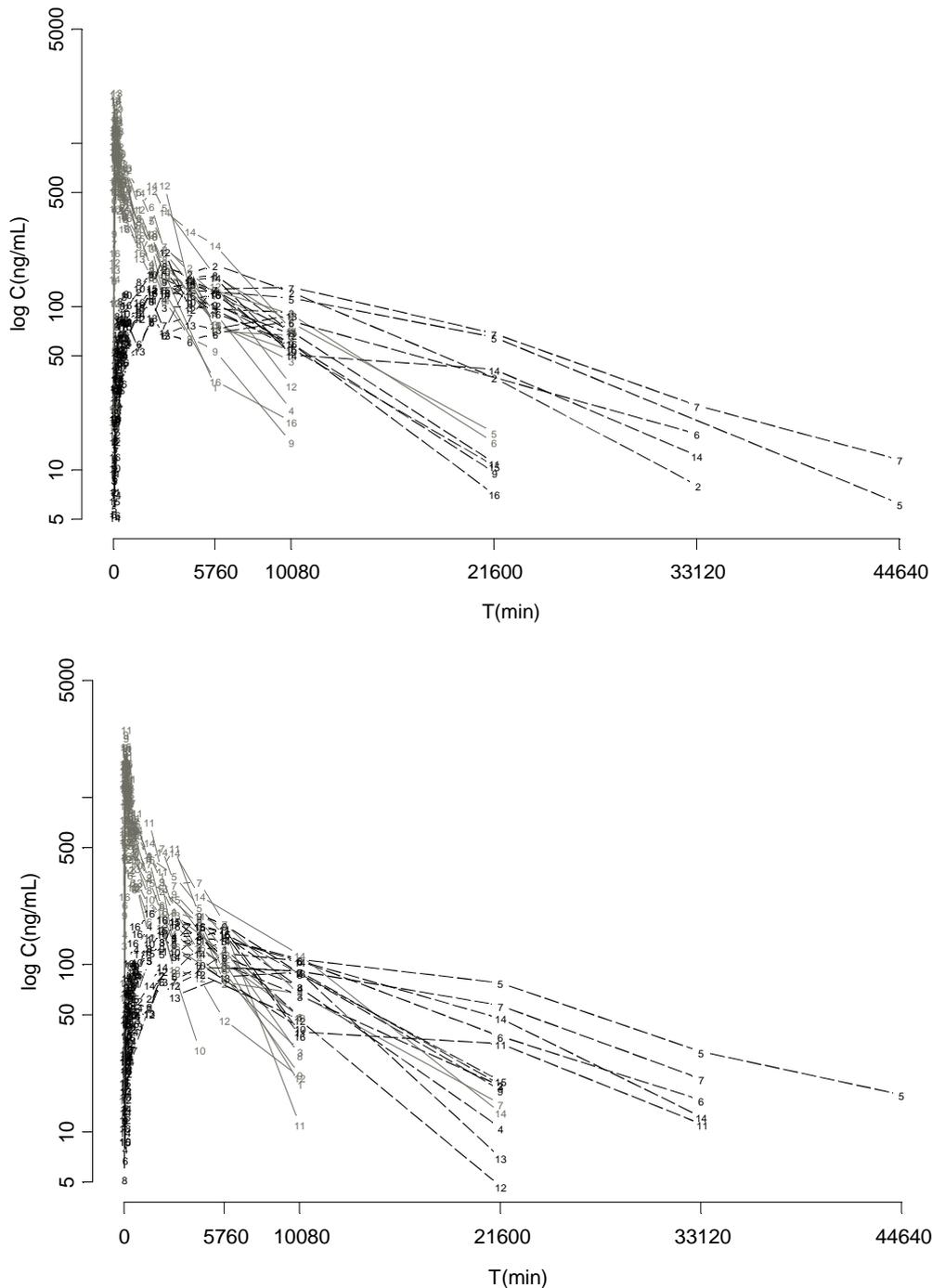
Para visualizar bien qué ocurrió en la fase de formación del metabolito a partir del fármaco, representamos gráficamente el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de DZ y DMDZ hasta los 480 min (Figura 37). Se observó un pequeño retraso en la aparición de concentraciones de DMDZ con respecto a DZ tras ambas administraciones, ya que en el minuto 45 todos los voluntarios presentaron concentraciones de DZ por encima del límite de cuantificación y sin embargo esto no ocurrió hasta el minuto 60 para el DMDZ. No se apreciaron diferencias en el perfil de formación del DMDZ entre ambas administraciones.



**Figura 37:** Concentraciones plasmáticas de DZ (línea continua) y DMDZ (línea discontinua) tras la ingesta de DZ vs tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa las concentraciones plasmáticas observadas a cada punto temporal. Las líneas continuas y discontinuas representan la interpolación lineal de las observaciones tras la administración de DZ1 (panel izquierdo) y tras la administración de DZ2 (panel derecho).

En la Figura 38 se muestra el perfil completo de concentraciones plasmáticas de DZ y DMDZ para cada individuo. Se observa que las  $C_{max}$  de DMDZ ocurren después que las  $C_{max}$  de DZ

(aproximadamente 2880 min vs aproximadamente 90 min, respectivamente). Las concentraciones de DMDZ se mantuvieron cerca de la  $C_{max}$  durante aproximadamente 48 horas, para comenzar a disminuir a partir de ese momento. La pendiente de eliminación de DMDZ fue inferior a la de DZ, y la mayoría de individuos mantenían niveles de DMDZ durante 15 días (21600 min) después de tomar DZ, mientras que ninguno de ellos tuvo concentraciones de DZ superiores al límite de cuantificación a los 15 días. No se observaron diferencias aparentes en el perfil farmacocinético de DMDZ entre las dos administraciones de DZ.



**Figura 38:** Concentraciones plasmáticas de DZ (línea continua gris) y DMDZ (línea discontinua negra) formado tras la ingesta de DZ vs tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa las concentraciones plasmáticas observadas a cada punto temporal. Las líneas continuas y discontinuas representan la interpolación lineal de las observaciones. Panel superior primera administración de DZ y panel inferior segunda administración de DZ.

### 3.1.3.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural

Para realizar el análisis de la farmacocinética de DMDZ formado tras la administración de DZ inicialmente se fijaron los parámetros farmacocinéticos individuales bayesianos de DZ obtenidos en el modelo final seleccionado en el apartado 3.1.2. A pesar de tener una observación de DMDZ (4.73 ng/mL) por debajo del límite de cuantificación (5 ng/mL) la utilizamos para el desarrollo del modelo ya que aportó mucha información acerca de la pendiente de la fase de eliminación para el individuo 12. La Tabla 20 resume los modelos clave de este análisis.

Iniciamos el modelado con una estructura monocompartimental para DMDZ (cuya formación asumimos que provenía del compartimento central de DZ por metabolización con una cinética de formación y de eliminación de primer orden), error aditivo y método de minimización FO. Mediante las gráficas de bondad de ajuste detectamos que el modelo subestimaba las concentraciones altas y sobreestimaba las bajas durante la fase de eliminación del fármaco. Esto era indicativo de que un modelo bicompartmental podía ajustarse mejor a nuestros datos y así lo observamos al introducir un segundo compartimento. Se produjo un descenso de la función objetiva de 118 puntos, y una mejoría en las gráficas de bondad de ajuste, a pesar de que con este modelo la formación del metabolito seguía sin estar bien descrita. Para mejorar esta parte, se testó un modelo en el que el metabolito se formara desde el compartimento periférico del fármaco en lugar de desde el compartimento central. La predicción en la zona de la absorción de metabolito no mejoró y la función objetiva empeoró. Se evaluó un modelo en el que la formación del metabolito fuera además de a partir de las concentraciones plasmáticas de fármaco como resultado de un efecto de primer paso del fármaco siguiendo una función de primer orden. Con este modelo se consiguió una buena predicción, pero con una VII elevada en  $Cl_M/F$ , lo que impidió obtener los errores de estimación. En el siguiente modelo se descartó que la absorción del compartimento depot del metabolito al compartimento central se describiera mejor con una cinética de orden cero. A pesar de que en las gráficas no había indicios de una saturación, se inspeccionó si la formación de DMDZ a partir de DZ en plasma se describía mejor a través de una cinética saturable, pero el modelo no convergió. Por tanto se seleccionó el modelo 4 (Tabla 20) como mejor modelo estructural, a pesar de no obtener la matriz de covarianza.

### 3.1.3.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

En este modelo 4, los gráficos de residuales individuales ponderados vs predicciones individuales, indicaron que podía ser necesario introducir una parte proporcional al modelo de error aditivo. Su introducción mejoró la predicción, y por ello continuamos con este modelo. Se intentó incorporar variabilidad interindividual en otros parámetros además de en  $Cl_M/F$  y  $V_{CM}/F$ , pero los datos no lo permitieron. Seguidamente, cambiamos al método de minimización FOCE, pero aparecían

correlaciones entre parámetros y las etas no estaban centradas en 0. Al tener una parte proporcional en el error es probable que exista correlación entre los valores de épsilon y las etas, por lo que probamos el método FOCE INTERACTION y esto si mejoró el modelo. Aunque algunos parámetros se estimaron con un error superior al que consideramos aceptable, como el objetivo de este ajuste era el de obtener unos estimados que nos sirvieran de punto de partida para el desarrollo del modelo final, seleccionamos el modelo 9 (tabla 20).

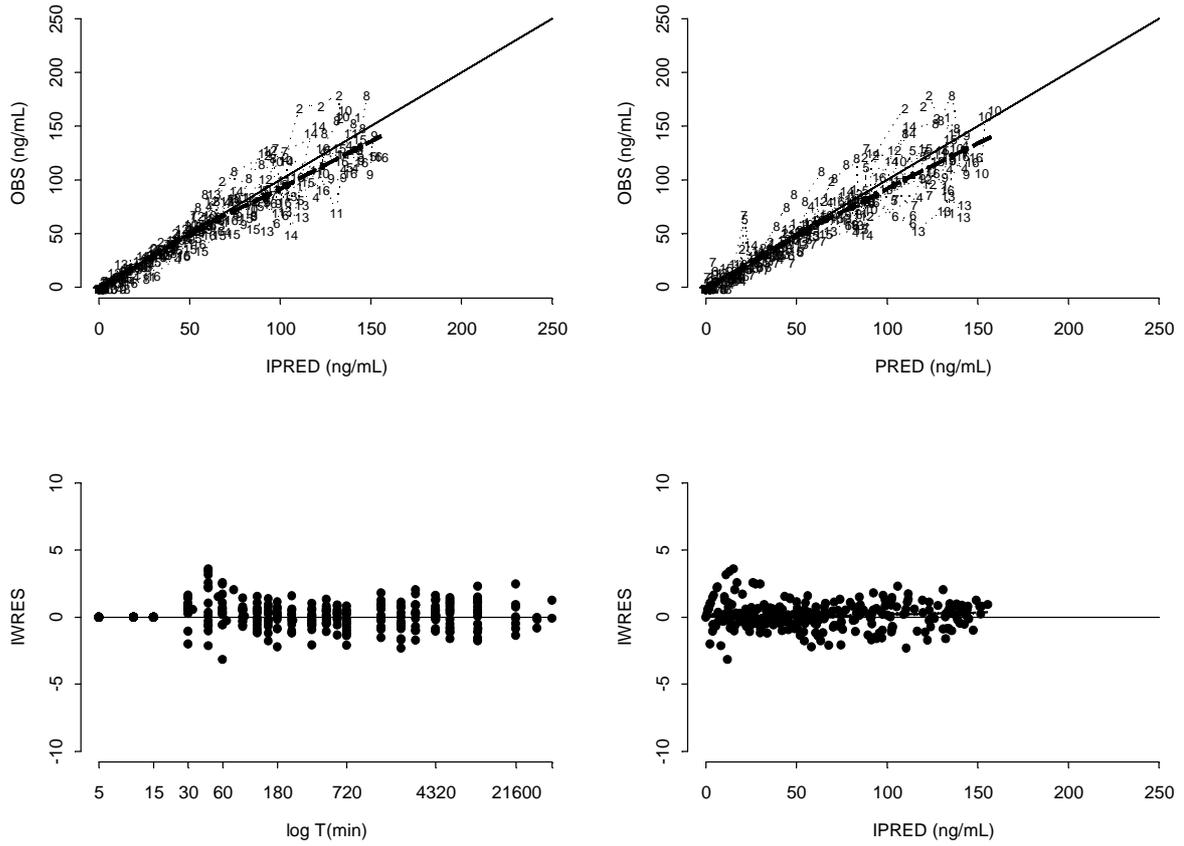
**Tabla 20:** Desarrollo del modelo farmacocinético de DMDZ tras la administración de 30mg de DZ (parámetros farmacocinéticos individuales de DZ fijados).

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	ERROR RESIDUAL		
					VII (CV%) (EER %)	Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿Un modelo de 1 compartimento se ajusta a los datos?	1	Monocompartimental $C_{lm}/F = TVC_{lm}/F * e^{-\eta_{CLM}/F}$ $V_{CM} = TVV_{CM} * e^{-\eta_{VCM}}$ METHOD= FO	4889	$C_{lm}/F = 0.021$ (8.2) $V_{CM}/F = 96.8$ (9.5)	24 (34.8) 27.7 (47.0)	22.67 (23.5)	
¿Mejora el modelo añadiendo un segundo compartimento?	2	Bicompartimental $C_{lm}/F = TVC_{lm}/F * e^{-\eta_{CLM}/F}$ $V_{CM}/F = TVV_{CM}/F * e^{-\eta_{VCM}/F}$ $C_{ldm}/F = TVC_{ldm}/F$ $V_{pM}/F = TVV_{pM}/F$ METHOD= FO	4771	$C_{lm}/F = 0.019$ (7.8) $V_{CM}/F = 49.6$ (27) $C_{ldm}/F = 0.34$ (34) $V_{pM}/F = 73.3$ (12)	29 (37) 71 (67) NE NE	21 (28)	
¿Es necesario asumir la formación de DMDZ desde el compartimento periférico de DZ?	3	Bicompartimental = Run 2, con formación de DMDZ desde el compartimento periférico	4804	$C_{lm}/F = 0.022$ (12.6) $V_{CM}/F = 9.13$ (53.4) $C_{ldm}/F = 0.39$ (33.8) $V_{pM}/F = 171$ (25)	43 (65) 1486 (70) NE NE	21 (28)	
¿Es necesario incorporar parte de la formación de DMDZ como consecuencia de un efecto de primer paso del DZ siguiendo cinética de orden 1?	4	Bicompartimental = Run 2, con DMDZ.	4269	$F1 = 0.916$ (NC) $C_{lm}/F = 0.002$ (NC) $V_{CM}/F = 112$ (NC) $C_{ldm}/F = 0.017$ (NC) $V_{pM}/F = 2980$ (NC) $k_a = 0.033$ (NC) $t_{lag} = 34.8$ (NC)	240 (NC) 24 (NC) NE NE NE NE	14 (NC)	
¿Es necesario incorporar parte de la formación de DMDZ como consecuencia de un efecto de primer paso del DZ siguiendo cinética de orden 0?	5	Bicompartimental = Run 4, con DMDZ formándose por efecto de primer paso con cinética de orden 0 $D_M = TVD_M * e^{-\eta_{DM}}$	4274	$F1 = 0.194$ (NC) $C_{lm}/F = 0.004$ (NC) $V_{CM}/F = 8.5$ (NC) $C_{ldm}/F = 0.09$ (NC) $V_{pM}/F = 14$ (NC) $D_M = 378000$ (NC) $t_{lag} = 3480$ (NC)	22 (NC) 83 (NC) NE NE NE NE	14 (NC)	
¿Es necesario codificar la formación de DMDZ a partir de DZ siguiendo cinética saturable?	6	Bicompartimental =Run 2, con DMDZ formándose mediante cinética saturable Velocidad formación= $(V_{maxM} * A_F) / (K_m + A_F)$		$C_{lm}/F = NC$ $k_m = NC$ $V_{maxM} = NC$ $V_{CM}/F = NC$ $C_{ldm}/F = NC$ $V_{pM}/F = NC$	NC	NC	NC

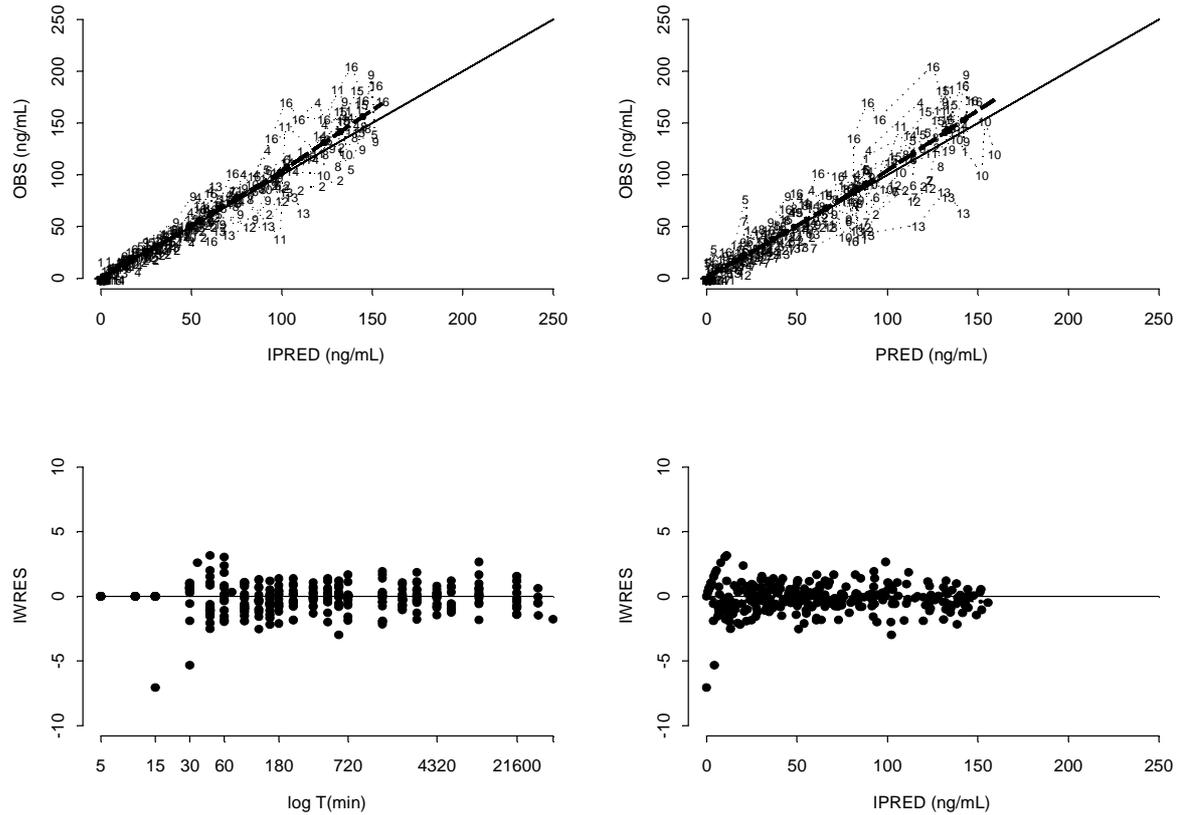
HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿Es necesario añadir una parte proporcional al modelo de error?	7	Bicompartimental = Run 4 con error combinado	3713	F1 = 0.927 (1.6) Cl <sub>M</sub> /F = 0.016 (6.7) V <sub>C<sub>M</sub></sub> /F = 107 (8.6) Cl <sub>D<sub>M</sub></sub> /F = 0.007 (70) V <sub>p<sub>M</sub></sub> /F = 29.1 (25) k <sub>a</sub> = 0.029 (25) t <sub>lag</sub> = 27.3 (5.3)	31 (35) 25 (35) NE NE NE NE	3.01 (33)	22.8 (15)
¿Mejora la estimación de los parámetros el método de minimización FOCE?	8	Bicompartimental = Run 7 con METHOD= FOCE	3723	F1 = 0.91 (NC) Cl <sub>M</sub> /F = 0.016 (NC) V <sub>C<sub>M</sub></sub> /F = 120 (NC) Cl <sub>D<sub>M</sub></sub> /F = 3.7e-10 (NC) V <sub>p<sub>M</sub></sub> /F = 8110 (NC) k <sub>a</sub> = 0.0262 (NC) t <sub>lag</sub> = 27.3 (NC)	29 (NC) 25 (NC) NE NE NE NE	3.17 (NC)	23 (NC)
¿Mejora la estimación de los parámetros el método de minimización FOCE INTERACTION?	9	Bicompartimental = Run 7 con METHOD= FOCE INTER	3628	F1 = 0.95 (1.4) Cl <sub>M</sub> /F = 0.017 (7.9) V <sub>C<sub>M</sub></sub> /F = 34.8 (120) Cl <sub>D<sub>M</sub></sub> /F = 0.78 (73) V <sub>p<sub>M</sub></sub> /F = 74.2 (59) k <sub>a</sub> = 0.0072 (140) t <sub>lag</sub> = 23.8 (13)	29 (34) 55 (210) NE NE NE NE	2.5 (75)	22.6 (28)

Parámetros de efectos fijos: Cl/F (L/min), aclaramiento aparente de eliminación; V<sub>c</sub>/F (L), volumen aparente de distribución del compartimento central; Cl<sub>d</sub>/F (L/min), aclaramiento aparente de distribución; V<sub>p</sub>/F (L), volumen aparente de distribución del compartimento periférico; k<sub>a</sub> (min<sup>-1</sup>), constante de velocidad de absorción de primer orden; t<sub>lag</sub> (min), tiempo de latencia; A: cantidad de fármaco; k<sub>m</sub>, constante de Michaelis-Menten, V<sub>max</sub>, velocidad máxima de transformación de DZ en DMDZ; D<sub>M</sub>, duración del efecto de primer paso de orden 0; F1, fracción de DZ transformada en DMDZ por efecto de primer paso. F: biodisponibilidad de DZ. Los subíndices <sub>F</sub> y <sub>M</sub> corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII) expresada como coeficiente de variación (%CV). La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado.

Las gráficas de bondad de ajuste (Figura 39 y Figura 40) mostraron que la estructura del modelo seleccionado (modelo 9, tabla 20) describía los datos lo suficientemente bien para dar respuesta a nuestro objetivo de obtener la estructura y los iniciales de los parámetros para el metabolito formado a partir de DZ que sirviera para tener una guía a la hora de desarrollar el modelo final de DZ + DMDZ de manera simultánea.



**Figura 39:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado para describir las concentraciones plasmáticas de DMDZ1, tras la primera administración de 30 mg de DZ. Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, concentraciones plasmáticas observadas vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo y panel inferior derecho, IWRES frente a las IPRED. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.



**Figura 40:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado para describir las concentraciones plasmáticas de DMDZ2, tras la segunda administración de 30 mg de DZ. Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, concentraciones plasmáticas observadas vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo y panel inferior derecho, IWRES frente a las IPRED. Paneles superiores, la línea sólida fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia.

### 3.1.4.- Desarrollo del modelo FC poblacional de DZ y DMDZ simultáneamente.

#### 3.1.4.1.- Análisis exploratorio de datos

El curso temporal de las concentraciones plasmáticas de DZ y del DMDZ formado tras las 2 administraciones de DZ se observa en las Figuras 37 y 38 antes comentadas.

#### 3.1.4.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural

El modelo se desarrolló utilizando las concentraciones de DZ y DMDZ observadas tras la administración de 30 mg de DZ por vía oral. En la tabla 21 se encuentra resumido el proceso.

Como tras el análisis de las concentraciones de DZ, la mejor estructura fue bicompartimental (ver sección 3.1.2.2, empezamos el desarrollo del modelo asumiendo esta disposición para DZ y con absorción y eliminación de primer orden para DZ y VII en los parámetros fijos de  $t_{lag}$ ,  $k_a$ ,  $V_c/F$ ,  $V_p/F$  y  $Cl/F$ . El modelo inicial de DMDZ contemplaba el modelo estructural descrito en el apartado (3.1.3), es decir, se asumió una disposición bicompartimental de DMDZ y que su formación a partir de DZ se producía a partir de las concentraciones plasmáticas de diazepam siguiendo un proceso de primer orden. Este modelo predijo concentraciones de DMDZ superiores a las observadas por lo que el siguiente paso consistió en la reducción del modelo de disposición de DMDZ a un solo compartimento, sin embargo este modelo empeoró de manera estadísticamente significativa (incremento de función objetiva de 490 puntos). Seguidamente y volviendo a la asunción de que la disposición de DMDZ es bicompartimental se asumió que durante la absorción de DZ se produce un efecto de primer paso, de orden 1, de manera que el DMDZ se forma como consecuencia de este efecto de primer paso además de a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ. La predicción resultante de este modelo sobreestimaba las concentraciones plasmáticas de DMDZ, sobretudo en la parte de la absorción. Seguidamente se descartó la posibilidad de que parte del fármaco se eliminara directamente desde el compartimento central como fármaco y parte como metabolito ya que no fue posible que el modelo convergiera. Puesto que todos estos modelos además de presentar problemas con la predicción del DMDZ, mostraban problemas en la fase de absorción de DZ, se evaluó un modelo que contara con variabilidad interocasión en la absorción de DZ. Este modelo mejoró las predicciones de DZ sin empeorar las predicciones de DMDZ, a pesar de no poder obtenerse la matriz de covarianza, y de que había un ligero sesgo en los primeros tiempos en las predicciones de DMDZ. El modelo predecía concentraciones en puntos temporales en los que no había observaciones. Se intentó solventar el problema incorporando un compartimento de retraso en la formación de DMDZ a partir de las concentraciones plasmáticas de DZ y se probó si la formación del metabolito se producía desde el compartimento periférico del fármaco. Ninguno de estos modelos llegó a la conversión. Una exploración más detallada de la razón de este posible sesgo de predicción observado en el modelo 5, nos indicó que este era debido a que todas las predicciones del modelo en estos puntos temporales (30 y 45 min) se encontraban por debajo del límite de cuantificación de la técnica, y por tanto era imposible que hubiera observaciones. Por ello se seleccionó en este momento el modelo 5 como mejor modelo (tabla 21).

### 3.1.4.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

Con el fin de refinar el modelo y obtener los errores de estimación de los parámetros, se intentó reducir el número de parámetros a estimar, eliminando la variabilidad interindividual del  $t_{lag}$  puesto que el modelo la estimaba cerca de cero. En este modelo la variabilidad interindividual estimada para el  $V_c/F_M$  fue muy elevada, y además su error de estimación fue superior al 100%. Puesto que el número de parámetros del modelo era elevado, se decidió proceder a la incorporación de VII en los parámetros de la manera más sencilla. El mejor modelo con variabilidad interindividual en un

único parámetro la incorporaba en el CI/F de DZ. La incorporación secuencial de VII en los diferentes parámetros nos llevó a seleccionar el modelo 12. Este modelo incorporaba variabilidad interindividual únicamente en los parámetros  $k_a$  y CI/F para DZ y  $CL_M/F$  para DMDZ.

**Tabla 21:** Desarrollo del modelo farmacocinético poblacional simultáneo de DZ y DMDZ tras administrar 30 mg de DZ..

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿El DMDZ se forma a partir de Cp de DZ y tiene disposición bicompartimental?	1	Bicompartimental; DZ Bicompartimental; DMDZ CI/F = TVCI/F * e <sup>n</sup> <sub>CI/F</sub> Vc/F = TVVc/F * e <sup>n</sup> <sub>Vc/F</sub> Cld/F = TVCld/F Vp/F = TVVp/F k <sub>a</sub> = TVk <sub>a</sub> * e <sup>n</sup> <sub>ka</sub> t <sub>lag</sub> = TVt <sub>lag</sub> CI/F <sub>M</sub> = TVCI/F <sub>M</sub> * e <sup>n</sup> <sub>CI/FM</sub> Vc/F <sub>M</sub> = TVVc/F <sub>M</sub> * e <sup>n</sup> <sub>Vc/FM</sub> Cld/F <sub>M</sub> = TVCld/F <sub>M</sub> Vp/F <sub>M</sub> = TVVp/F <sub>M</sub> METHOD= FOCE INTERACTION	10100	CI/F = 0.015 (NC) Vc/F = 17.2 (NC) Cld/F = 0.06 (NC) Vp/F = 30.2 (NC) k <sub>a</sub> = 0.03 (NC) t <sub>lag</sub> = 23.5 (NC) CI/F <sub>M</sub> = 0.017 (NC) Vc/F <sub>M</sub> = 13 (NC) Cld/F <sub>M</sub> = 0.61 (NC) Vp/F <sub>M</sub> = 86.3 (NC)	27 (NC) 38 (NC) NE NE 73 (NC) 32 (NC) 103 (NC) NE NE	DZ: 24.3 (NC) DMDZ: 2.42 (NC)	DZ: 32.7 (NC) DMDZ: 21.9 (NC)
¿Es necesario asumir disposición monocompartimental para DMDZ?	2	Bicompartimental; DZ Monocompartimental; DMDZ CI/F = TVCI/F * e <sup>n</sup> <sub>CI/F</sub> Vc/F = TVVc/F * e <sup>n</sup> <sub>Vc/F</sub> Cld/F = TVCld/F Vp/F = TVVp/F k <sub>a</sub> = TVk <sub>a</sub> * e <sup>n</sup> <sub>ka1</sub> t <sub>lag</sub> = TVt <sub>lag</sub> CI/F <sub>M</sub> = TVCI/F <sub>M</sub> * e <sup>n</sup> <sub>CI/FM</sub> Vc/F <sub>M</sub> = TVVc/F <sub>M</sub> * e <sup>n</sup> <sub>Vc/FM</sub> METHOD= FOCE INTERACTION	10590	CI/F = 0.015 (NC) Vc/F = 10.5 (NC) Cld/F = 0.08 (NC) Vp = 45.2 (NC) k <sub>a</sub> = 0.14 (NC) t <sub>lag</sub> = 26.5 (NC) CI/F <sub>M</sub> = 0.017 (NC) Vc/F <sub>M</sub> = 85.5 (NC)	25 (NC) 33 (NC) NE NE 100 (NC) NE 31 (NC) 35 (NC)	DZ : 23.4 (NC) DMDZ: 3.49 (NC)	DZ: 45.7 (NC) DMDZ: 20.4 (NC)
¿Es necesario incorporar efecto de primer paso para la formación del DMDZ?	3	Bicompartimental; DZ Bicompartimental ; DMDZ =Run1, más efecto primer paso. F1 = TVF1 ; DZ F2 = 1-F1; DMDZ k <sub>a1</sub> = TVk <sub>a1</sub> * e <sup>n</sup> <sub>ka1</sub> ; DZ t <sub>lag1</sub> = TVt <sub>lag1</sub> + t <sub>lag1</sub> ; DZ k <sub>a2</sub> = TVk <sub>a2</sub> ; DMDZ t <sub>lag2</sub> = TVt <sub>lag1</sub> ; DMDZ	10073	F1 = 0.95 (1.8) F2 = 0.05 CI/F = 0.014 (7.3) Vc/F = 15.6 (13) Cld/F = 0.06 (11) Vp/F = 28 (9.5) k <sub>a1</sub> = 0.04 (25) t <sub>lag1</sub> = 26.2 (5.3) CI/F <sub>M</sub> = 0.017 (8) Vc/F <sub>M</sub> = 20.3 (44) k <sub>a2</sub> = 0.005 (69) t <sub>lag2</sub> = 35 (0.41) Cld/F <sub>M</sub> = 0.85 (30) Vp/F <sub>M</sub> = 85.5 (10)	28 (31) 42 (51) NE NE 85 (46) 2.4 (92) 30 (32) 69 (53) NE NE NE	DZ: 24.7 (45) DMDZ: 2.6 (39)	DZ: 29 (12) DMDZ: 21 (13)
¿Es necesario incorporar eliminación de DZ parte como DZ y parte a través de su metabolismo hacia DMDZ?	4	Bicompartimental; DZ Bicompartimental ; DMDZ =Run1, más eliminación como fármaco. CI1/F <sub>F</sub> = TVCI1/F * e <sup>n</sup> <sub>CI1/F</sub> ; DZ CI2/F <sub>F</sub> = TVCI2/F ; DZ <b>Falta la f para un aclaramiento y el otro aclaramiento.</b>	NC	NC	NC	NC	NC

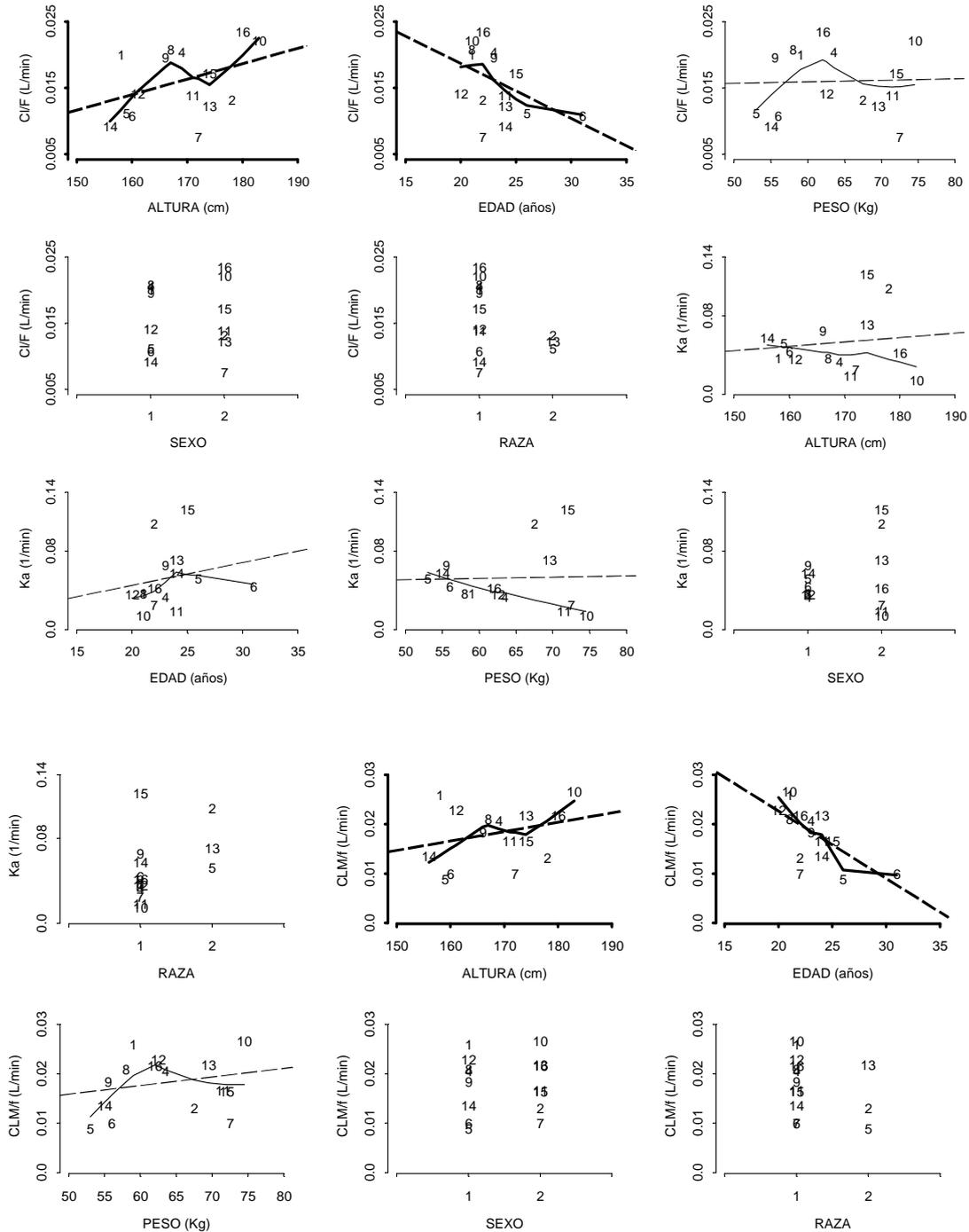
HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿Mejora el modelo 1 con la incorporación de VIO en el parámetro F?	5	Bicompartmental; DZ Bicompartmental; DMDZ  = Run 1, pero con VIO en F	9845	VIO <sub>F</sub> = 19 (NC) Cl/F = 0.015 (NC) Vc/F = 18.7 (NC) Cld/F = 0.051 (NC) Vp/F = 29.7 (NC) k <sub>a</sub> = 0.051 (NC) t <sub>lag</sub> = 26.6 (NC) Cl/F <sub>M</sub> = 0.017 (NC) Vc/F <sub>M</sub> = 16.7 (NC) Cld/F <sub>M</sub> = 0.598 (NC) Vp/F <sub>M</sub> = 84.6 (NC)	40 (NC) 170 (NC) NE NE 69 (NC) 1.8 (NC) 35 (NC) 51 (NC) NE NE	DZ: 24.7 (NC) DMDZ: 2.8 (NC)	DZ: 26 (NC) DMDZ: 15 (NC)
¿Es necesario incorporar un compartimento de retraso?	6	Bicompartmental; DZ Bicompartmental; DMDZ  =Run 5, incorporando un compartimento de retraso	NC				
¿Es necesario asumir la formación de DMDZ desde el compartimento periférico de DZ?	7	Bicompartmental; DZ Bicompartmental; DMDZ  = Run 5, con formación de DMDZ desde el compartimento periférico en lugar de desde el central	NC				
¿Es necesario eliminar la VII en tlag de DZ?	8	Bicompartmental; DZ Bicompartmental; DMDZ  = Run 5, sin VII en t <sub>lag</sub> para DZ	9819	VIO <sub>F</sub> = 18 (25) Cl/F = 0.015 (6.9) Vc/F = 18.5 (9.2) Cld/F = 0.016 (11) Vp/F = 30.6 (9.7) k <sub>a</sub> = 0.05 (22) t <sub>lag</sub> = 26.1 (5.5) Cl/F <sub>M</sub> = 0.017 (7.9) Vc/F <sub>M</sub> = 14.1 (37) Cld/F <sub>M</sub> = 0.61 (10) Vp/F <sub>M</sub> = 84.4 (7.3)	30 (31) 30 (39) NE NE 73 (48) NE 33 (32) 100 (110) NE NE	DZ : 24.5 (47) DMDZ: 2.7 (25)	DZ: 27 (14) DMDZ: 15 (11)
¿Es necesaria la VII en Vc <sub>M</sub> ?	9	Bicompartmental; DZ Bicompartmental; DMDZ  =Run5, sin VII en Vc/F <sub>M</sub> de DZ	9864	VIO <sub>F</sub> = 19 (29) Cl/F = 0.015 (6.7) Vc/F = 1.67 (20) Cld/F = 0.07 (11) Vp/F = 45.6 (6.8) k <sub>a</sub> = 0.004 (14) t <sub>lag</sub> = 25.5 (8.0) Cl/F <sub>M</sub> = 0.017 (7.9) Vc/F <sub>M</sub> = 17.9 (21) Cld/F <sub>M</sub> = 0.57 (15) Vp/F <sub>M</sub> = 84.1 (8.2)	34 (27) 73 (49) NE NE 25 (46) NE 35 (27) NE NE NE	DZ: 23.6 (46) DMDZ: 2.9 (28)	DZ: 29 (13) DMDZ: 15 (11)
Comenzamos inclusión de VII en un único parámetro	10	Bicompartmental; DZ Bicompartmental; DMDZ  =Run5, pero solo VII en Cl/F de DZ	10201	VIO <sub>F</sub> = 18 (25) Cl/F = 0.014 (6.2) Vc/F = 20 (9) Cld/F = 0.047 (12) Vp/F = 37 (15) k <sub>a</sub> = 0.04 (17) t <sub>lag</sub> = 22 (9.6) Cl/F <sub>M</sub> = 0.017 (7.9) Vc/F <sub>M</sub> = 17.1 (23) Cld/F <sub>M</sub> = 0.54 (19) Vp/F <sub>M</sub> = 78.8 (20)	30 (31) NE NE NE NE NE NE NE NE NE	DZ: 22.9 (45) DMDZ: 3.4 (23)	DZ: 34 (8.4) DMDZ: 2 (13)

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL	
						Aditivo (ng/mL) (EER %)	Proporcional (%) (EER %)
¿Se puede incorporar VII en un segundo parámetro además de en CL de DZ?	11	Bicompartimental; DZ Bicompartimental; DMDZ =Run 10, pero con VII en Cl/F <sub>M</sub>	10018	VIO <sub>F</sub> = 18 (29)			
				Cl/F = 0.015 (7.3)	33 (28)		
				Vc/F = 19.1 (8.8)	NE		
				Cl <sub>d</sub> /F = 0.05 (10)	NE		
				Vp/F = 31.5 (8.1)	NE	DZ: 23 (44)	DZ: 32.3 (8.3)
				k <sub>a</sub> = 0.04 (16)	NE	DMDZ: 3.2 (22)	DMDZ: 17.1 (13)
				t <sub>lag</sub> = 21.7 (9.6)	NE		
				Cl/F <sub>M</sub> = 0.017 (7.8)	33 (27)		
				Vc/F <sub>M</sub> = 18.8 (22)	NE		
				Cl <sub>d</sub> /F <sub>M</sub> = 0.6 (19)	NE		
Vp/F <sub>M</sub> = 84.8 (9.8)	NE						
¿Mejora el modelo incorporando VII en ka?	12	Bicompartimental, DZ Bicompartimental; DMDZ =Run10, pero VII en k <sub>a</sub>	9896	VIO <sub>F</sub> = 18 (29)			
				Cl/F = 0.015 (7)	33 (26)		
				Vc/F = 18.5 (10)	NE		
				Cl <sub>d</sub> /F = 0.054 (9.9)	NE		
				Vp/F = 31.3 (9.2)	NE	DZ: 23.7 (46)	DZ: 29.5 (13)
				k <sub>a</sub> = 0.046 (22)	57 (48)	DMDZ: 3.0 (26)	DMDZ: 16 (11)
				t <sub>lag</sub> = 25.5 (6.4)	NE		
				Cl/F <sub>M</sub> = 0.017 (8)	34 (26)		
				Vc/F <sub>M</sub> = 17.7 (24)	NE		
				Cl <sub>d</sub> /F <sub>M</sub> = 0.62 (17)	NE		
Vp/F <sub>M</sub> = 85.4 (8.6)	NE						

Parámetros de efectos fijos: Cl/F (L/min), aclaramiento plasmático total; Vc/F (L), volumen aparente de distribución del compartimento central; Cl<sub>d</sub>/F (L/min), aclaramiento de distribución; Vp/F (L), volumen aparente de distribución del compartimento periférico; k<sub>a</sub> (min<sup>-1</sup>), constante de velocidad de absorción de primer orden; t<sub>lag</sub> (min), tiempo de latencia de absorción; F<sub>1</sub>, fracción de DZ que llega inalterado a circulación sistémica. F<sub>2</sub>, fracción de fármaco que se transforma en DMDZ antes de llegar a circulación sistémica. F: biodisponibilidad de DZ. Los subíndices <sub>F</sub> y <sub>M</sub> corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII) se expresa como coeficiente de variación (%CV), variabilidad interocasión (VIO) expresada como coeficiente de variación (%CV). La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado. NC: no converge.

#### 3.1.4.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables

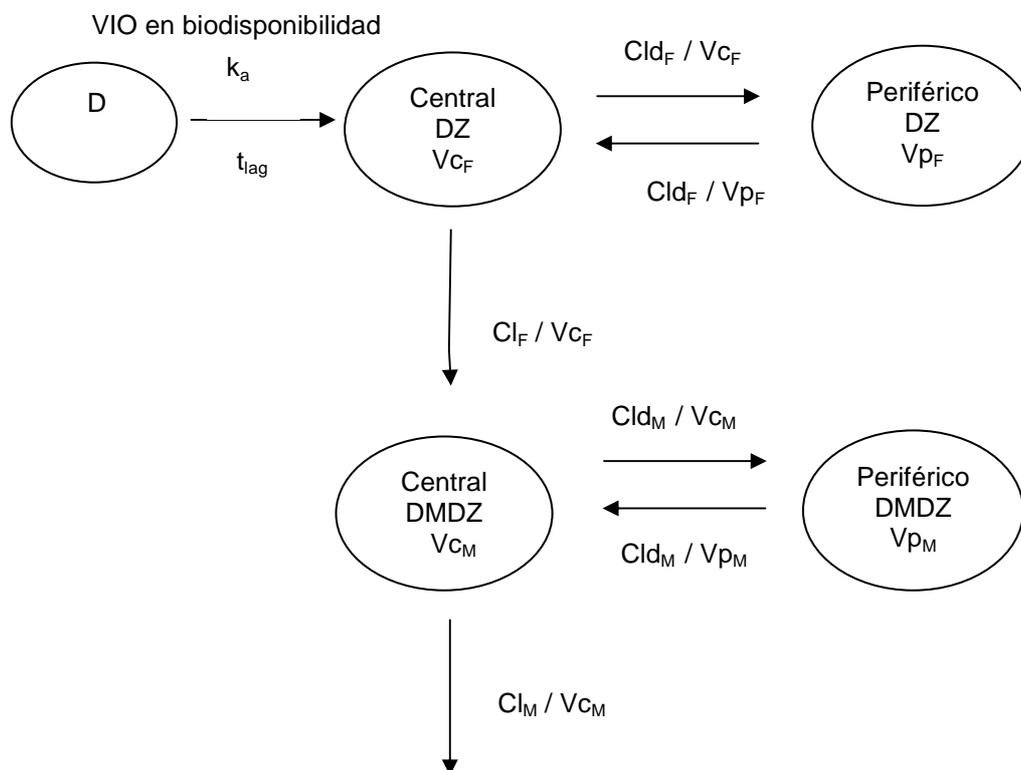
Para terminar, se exploró de manera preliminar la relación entre cada parámetro individual estimado en el modelo 12, con cada una de las covariables recogidas durante el estudio (edad, peso, altura, sexo y raza). Se observó cierta correlación lineal con pendiente positiva entre Cl/F de DZ y altura y entre el Cl<sub>M</sub>/f de DMDZ y la altura, y con pendiente negativa entre Cl/F de DZ y edad y entre Cl<sub>M</sub>/f de DMDZ y edad (Figura 41).



**Figura 41:** Gráfico de dispersión bivariado que muestra la relación entre los parámetros farmacocinéticos individuales de DZ y DMDZ estimados por el modelo 12 y las covariables. Los números representan el valor individual. La línea discontinua es la línea de tendencia y la línea continua es la recta de regresión lineal.

Posteriormente se realizó un análisis GAM de las covariables y las que salieron significativas, teniendo en cuenta el criterio de Akaike, fueron para DZ, la edad en el Cl/F y en la  $k_a$  y para DMDZ, la edad en el  $Cl_M/f$ . No se pudo incorporar ninguna de estas covariables de manera estadísticamente significativa en NONMEM. Así pues, la farmacocinética del DZ y DMDZ tras

administrar 30 mg por vía oral se caracterizó con un modelo de 2 compartimentos para fármaco y para metabolito representado en la Figura 42.

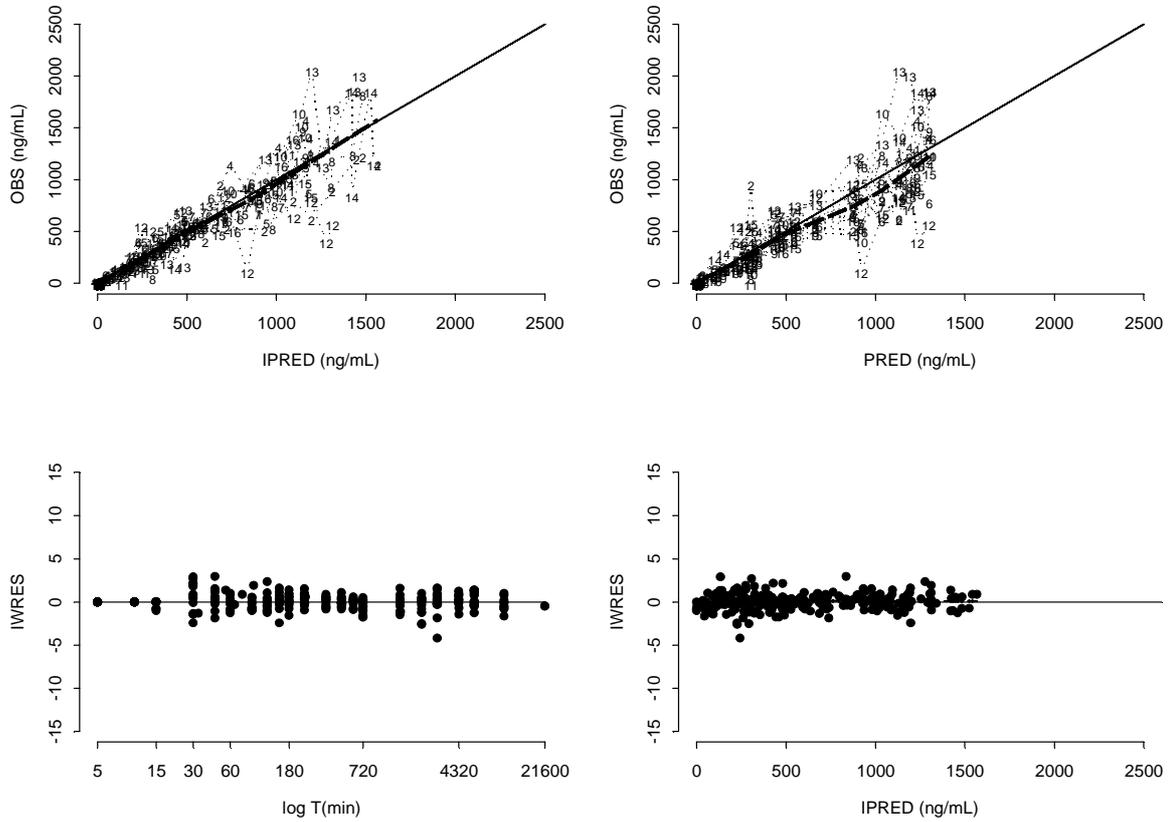


**Figura 42:** Representación esquemática del modelo farmacocinético seleccionado. D: dosis de DZ administrada por vía oral,  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cl_{D_F} / V_{C_F}$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_{P_F}$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl_F / V_{C_F}$ : aclaramiento aparente de distribución compartimento central,  $Cl_{D_M} / V_{C_M}$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_{P_M}$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico y  $Cl_M / V_{C_M}$ : aclaramiento aparente. Los subíndices  $F$  y  $M$  corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (biodisponibilidad del fármaco) para simplificar la representación.

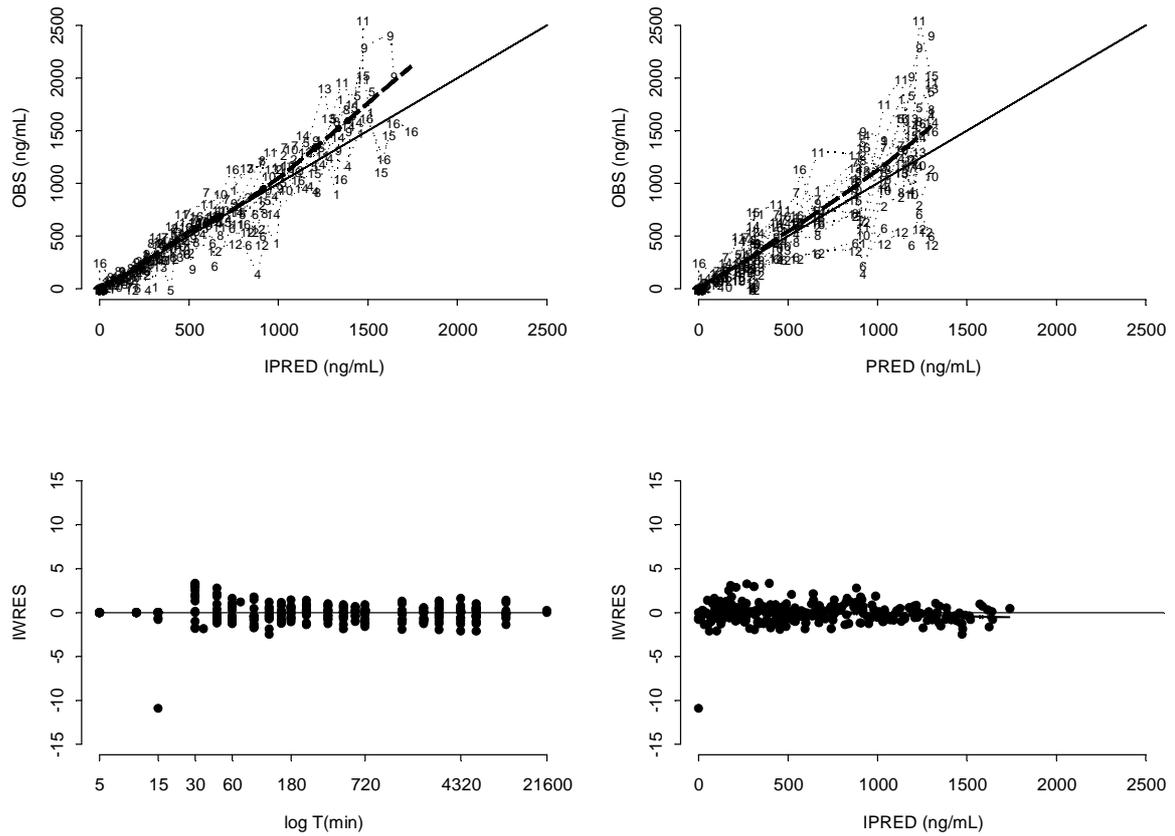
Con este modelo se consiguió una buena caracterización de los datos de DZ y DMDZ formado tras la administración de DZ. Tras la primera administración de DZ, se logró caracterizar los datos desde el punto de vista individual (Figura 43, panel superior izquierdo) como poblacional (Figura 43, panel superior derecho) y con errores de estimación para todos los parámetros inferiores al 50%. La estimación de los parámetros aleatorios no generó desviaciones sistémicas en las predicciones (Figura 43, paneles inferior izquierdo y derecho). Tras la segunda administración de DZ, también se consiguió una buena descripción de los datos (Figura 44) aunque con una ligera infra estimación de las concentraciones máximas. En las gráficas de residuales ponderados, se observó un punto con un valor demasiado grande, que se correspondió con un punto al comienzo de la absorción que no se predijo bien. Este punto careció de importancia en el ajuste global del modelo.

El DMDZ formado tras la administración de DZ1 como de DZ2 también se caracterizó correctamente tanto desde el punto de vista individual (Figuras 45 y 46, panel superior izquierdo)

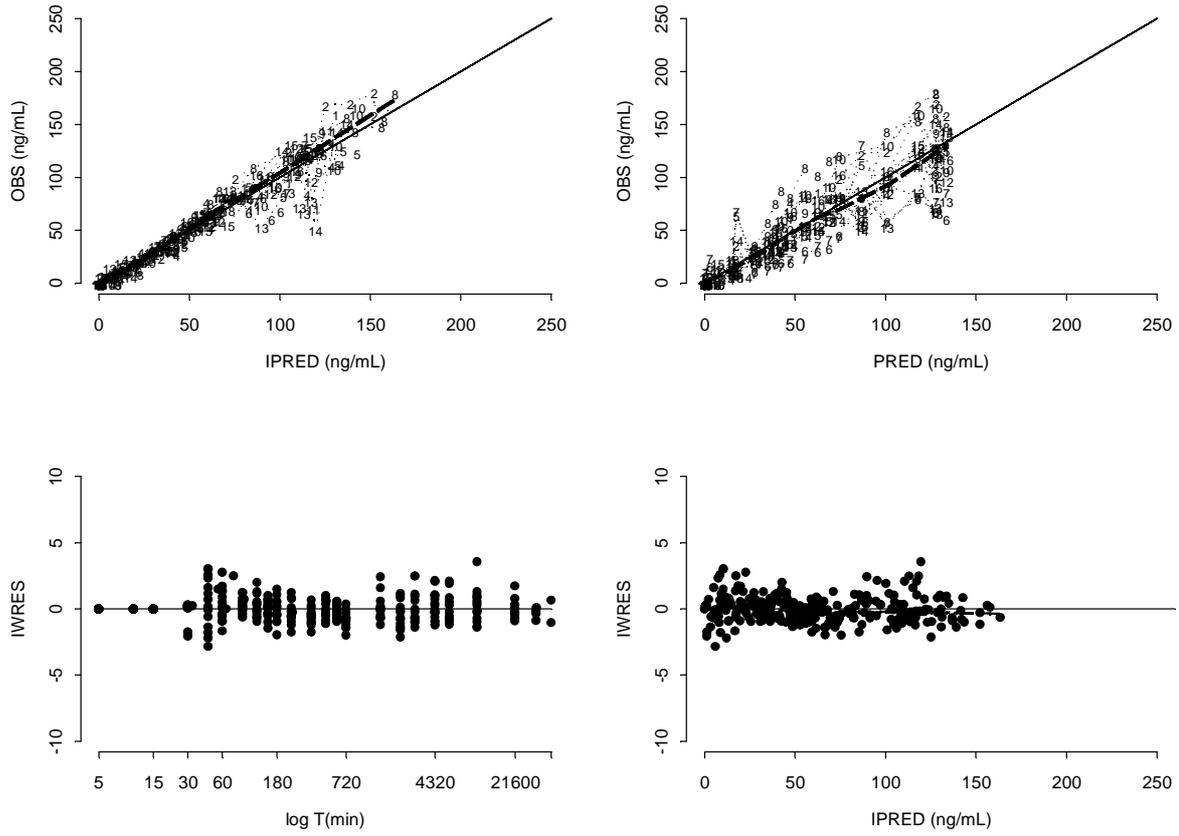
como poblacional (Figuras 45 y 46, panel superior derecho). La estimación de parámetros aleatorios no conllevó sesgos de predicción (Figuras 45 y 46, paneles inferior izquierdo y derecho) y los errores de estimación (EER) fueron inferiores al 50% para todos los parámetros. En la Tabla 22 se muestran los parámetros del modelo farmacocinético final seleccionado.



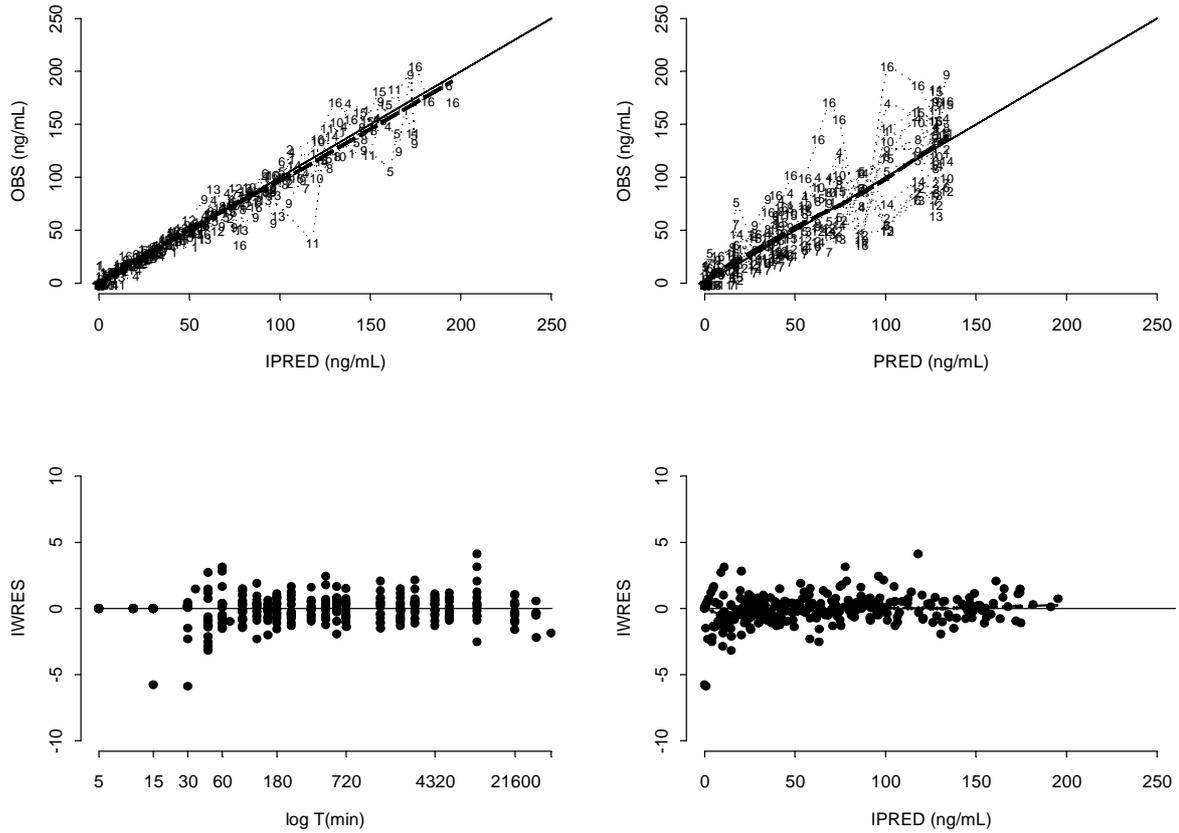
**Figura 43:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo simultáneo de DZ+DMDZ seleccionado considerando las concentraciones plasmáticas de DZ1 (tras la primera administración de 30 mg de DZ). Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, OBS vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuos individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo; y panel inferior derecho, IWRES frente a las IPRED. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.



**Figura 44:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo simultáneo de DZ+DMDZ seleccionado considerando las concentraciones plasmáticas de DZ2 (tras la segunda administración de 30 mg de DZ). Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, OBS vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo; y panel inferior derecho, IWRES frente IPRED. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.



**Figura 45:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo simultáneo de DZ+DMDZ seleccionado considerando las concentraciones plasmáticas de DMDZ1 (generado tras la primera administración de 30 mg de DZ). Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, (OBS) vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo; y panel inferior derecho, IWRES frente a las concentraciones individuales predichas (IPRED). Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.



**Figura 46:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo simultáneo de DZ+DMDZ seleccionado considerando las concentraciones plasmáticas de DMDZ2 (generado tras la segunda administración de 30 mg de DZ). Panel superior izquierdo, concentraciones plasmáticas observadas (OBS) vs concentraciones individuales predichas (IPRED); panel superior derecho, OBS vs concentraciones poblacionales predichas (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs el logaritmo del tiempo; y panel inferior derecho, IWRES frente a las IPRED. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.

**Tabla 22:** Parámetros estimados por el modelo farmacocinético simultáneo seleccionado para describir las concentraciones de DZ y DMDZ tras la administración oral de 30 mg de DZ.

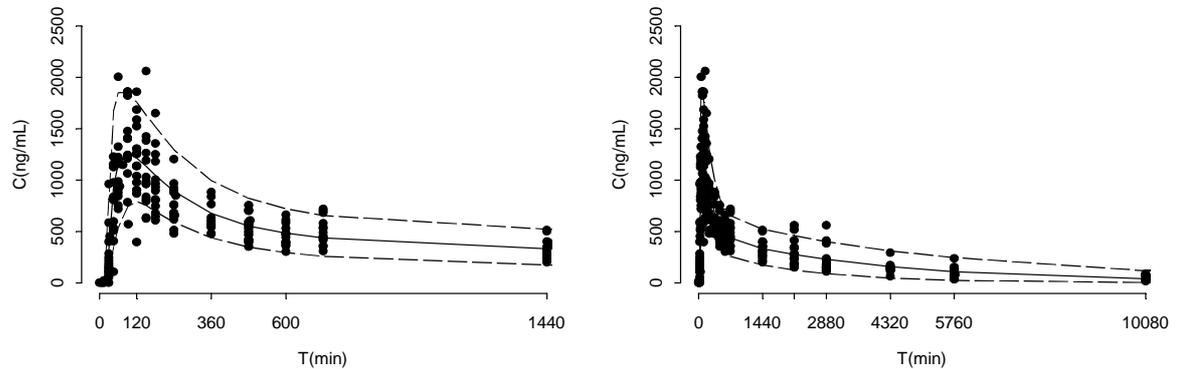
PARÁMETRO	ESTIMADO	EER (%)	VII (CV%)	EER (%)
<b>Diazepam</b>				
F1	1 FIJADO	-	-	-
VIO	-	-	18	29
Cl/F (L/min)	0.015	7	33	26
Vc/F (L)	18.5	10	NE	NE
Cld/F (L/min)	0.054	9.9	NE	NE
Vp/F (L)	31.3	9.2	NE	NE
k <sub>a</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.046	22	57	48
t <sub>lag</sub> (min)	25.5	6.4	NE	NE
Error residual (ng/mL)	23.7	46	-	-
Error residual (%)	29.5	13	-	-
<b>Desmetildiazepam</b>				
Cl <sub>M</sub> /f (L/min)	0.017	8	34	36
Vc <sub>M</sub> /f (L)	17.7	24	NE	NE
Cld <sub>M</sub> /f (L/min)	0.62	17	NE	NE
Vp <sub>M</sub> /f (L)	85.4	8.6	NE	NE
Error residual (ng/mL)	3.0	26	-	-
Error residual (%)	16	11	-	-

Parámetros de efectos fijos: Cl/F, aclaramiento aparente de eliminación; Vc/F, volumen aparente de distribución del compartimento central; Cld/F, aclaramiento aparente de distribución; Vp/F, volumen aparente de distribución del compartimento periférico; k<sub>a</sub>, constante de velocidad de absorción de primer orden; t<sub>lag</sub>, tiempo de latencia de absorción; F, biodisponibilidad de DZ; F1, biodisponibilidad ficticia de DZ; f, fracción de DZ transformado en DMDZ. Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII), se expresa como coeficiente de variación (%CV), variabilidad interocasión (VIO) expresada como coeficiente de variación (%CV). La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado.

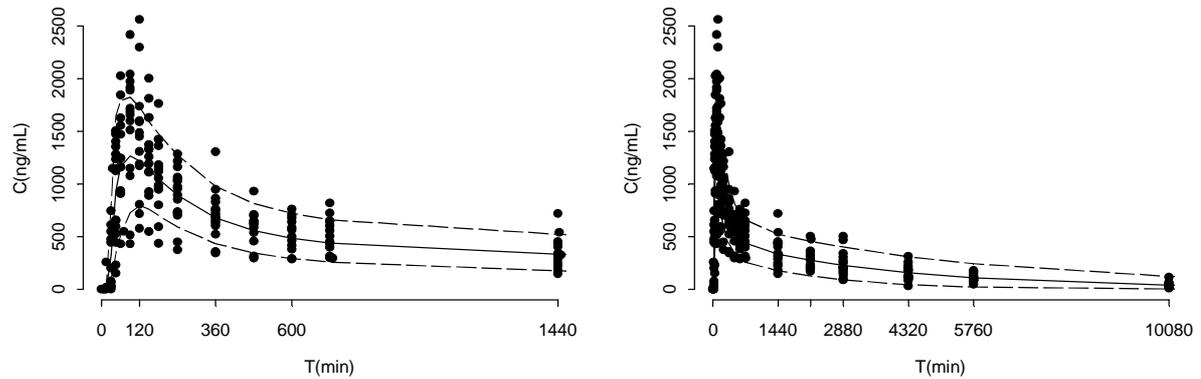
### 3.1.4.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

El modelo final se evaluó realizando 1000 simulaciones de Monte Carlo utilizando los parámetros fijos y aleatorizados de DZ y DMDZ obtenidos con el modelo final seleccionado. Se calcularon los percentiles 2.5 y 97.5 de las concentraciones plasmáticas simuladas y se representaron junto a las concentraciones observadas frente al tiempo, añadiendo el promedio de las concentraciones simuladas. Podemos ver que, aproximadamente el 2.5% de las concentraciones plasmáticas del fármaco se distribuyeron de manera homogénea por debajo y por encima del percentil 2.5 y 97.5% respectivamente. El curso temporal de DZ1 se representa en la Figura 47 y el de DZ2 en la Figura 48. En ambos casos se presenta una figura hasta el min 1440 para mostrar la fase correspondiente a la absorción y otra, para mostrar la fase de eliminación, hasta los 10080 min, ya

que solo hay 4 observaciones a los 21600 min y el hecho de alargar la gráfica hasta ese valor dificulta la interpretación de la misma.

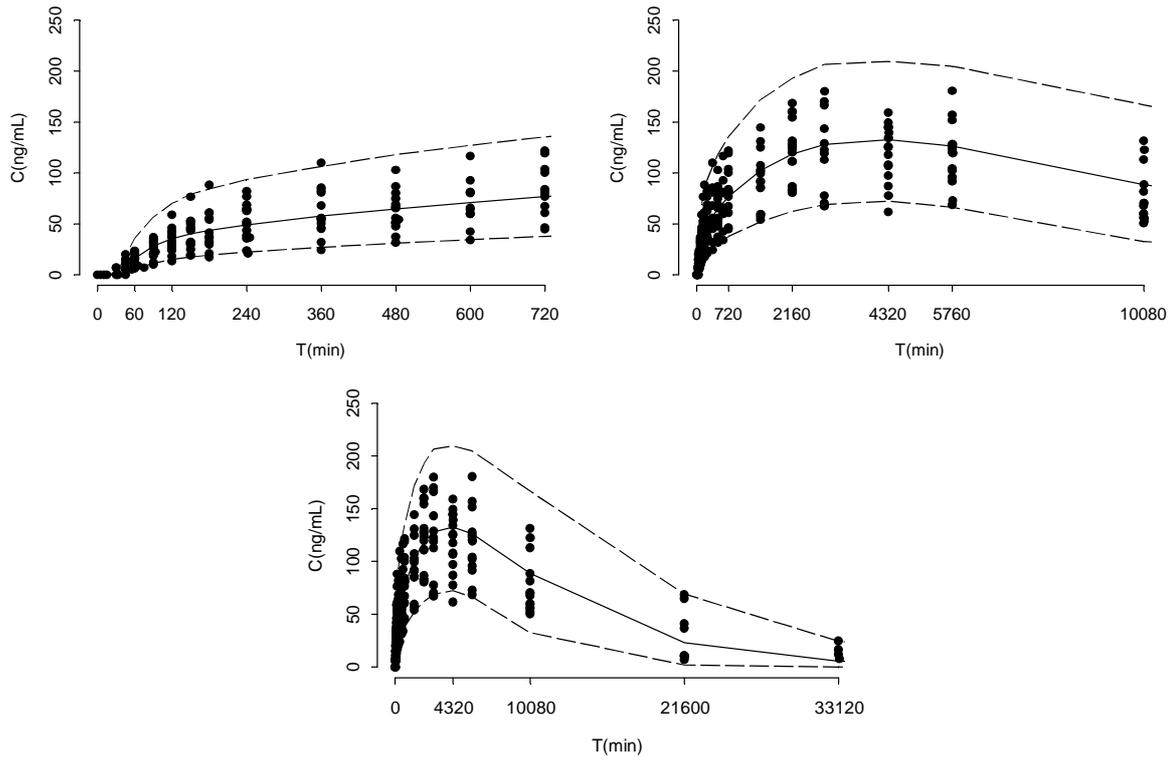


**Figura 47:** Concentraciones plasmáticas de DZ1 tras la primera administración del mismo. Los puntos representan las observaciones de DZ, la línea continua representa la media de los perfiles simulados y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 2.5 y 97.5 de los perfiles simulados respectivamente.

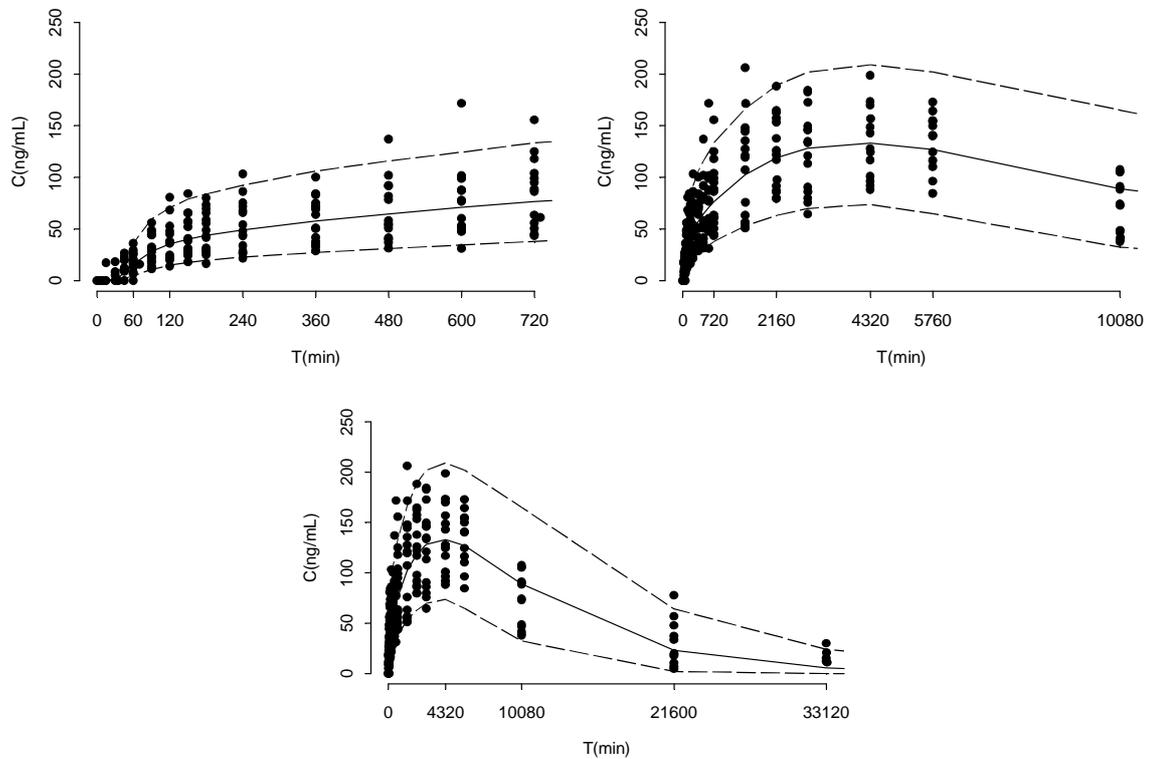


**Figura 48:** Concentraciones plasmáticas de DZ2 tras la segunda administración del mismo. Los puntos representan las observaciones de DZ, la línea continua representa la media de los perfiles simulados y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 2.5 y 97.5 de los perfiles simulados respectivamente.

El curso temporal de DMDZ1 (Figura 49) y DMDZ2 (Figura 50) se presenta hasta los 33120 min, ya que solo hay 3 puntos temporales en 44640 min y el hecho de alargar la gráfica hasta ese valor dificulta la interpretación de los resultados. Aunque el perfil de las predicciones y las observaciones es similar, el intervalo de predicción del 95% engloba casi el 100% de las observaciones, indicando que la variabilidad interindividual estimada por el modelo es ligeramente superior a la observada en los datos.



**Figura 49:** Concentraciones plasmáticas de DMDZ1 tras la primera administración de DZ. Los puntos representan las observaciones de DMDZ, la línea continua representa la media de los perfiles simulados y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 2.5 y 97.5 de los perfiles simulados respectivamente.



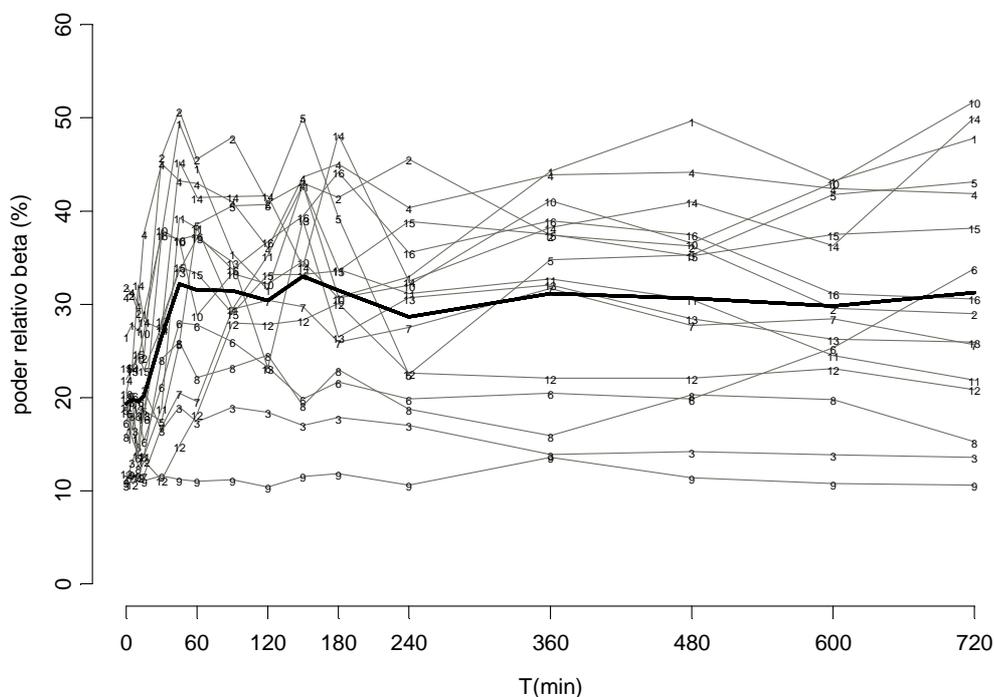
**Figura 50:** Concentraciones plasmáticas de DMDZ2 tras la segunda administración de DZ. Los puntos representan las observaciones de DMDZ, la línea continua representa la media de los perfiles simulados y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 2.5 y 97.5 de los perfiles simulados respectivamente.

### 3.2.- FARMACODINAMIA

#### 3.2.1.- Desarrollo del modelo FD poblacional de DMDZ tras su administración por vía oral.

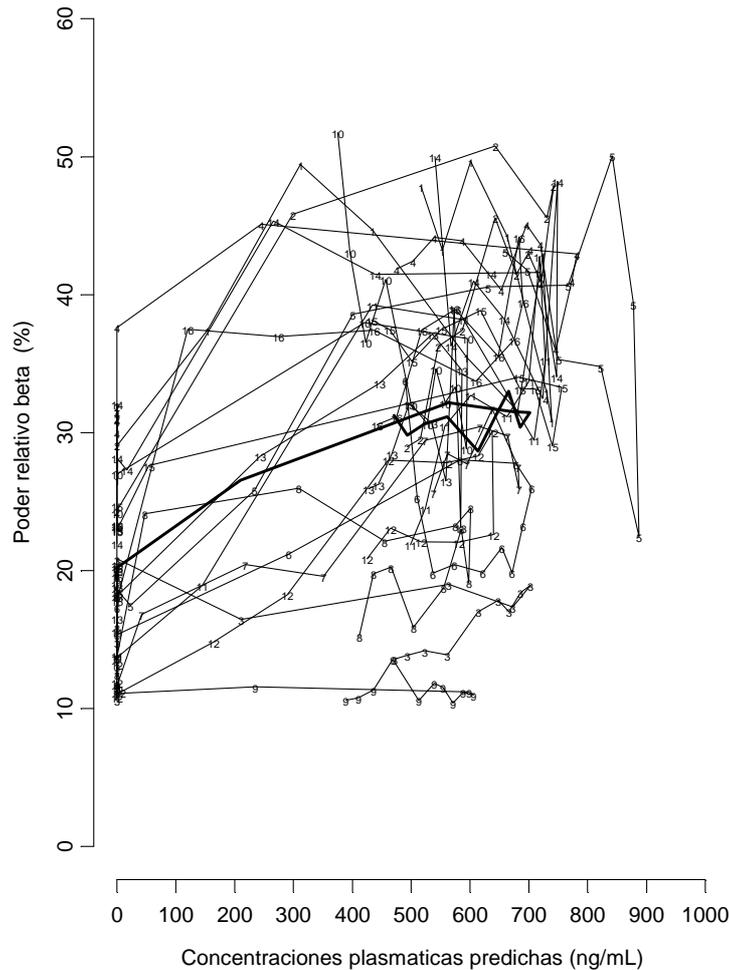
##### 3.2.1.1.- Análisis exploratorio de datos

El efecto (poder relativo beta) derivado del EEG producido tras la administración de 30 mg de DMDZ por vía oral se representa en la Figura 51. Al tratarse de una variable relativa, su margen podría oscilar entre 0 y 100. Apreciamos un incremento en el valor de la variable estudiada con respecto al valor basal de alrededor de un 15%, aunque no todos los voluntarios respondieron de la misma manera.



**Figura 51:** Poder relativo beta observado tras 30 mg de DMDZ expresado como porcentaje de la señal total recogida en el EEG, frente al tiempo. Cada número se corresponde con un voluntario y representa el poder relativo beta observado a cada punto temporal, las líneas continuas representan la interpolación lineal de las observaciones y la línea continua gruesa representa la media del poder relativo beta observado frente al tiempo.

La Figura 52 muestra que el efecto medio observado frente a la concentración poblacional predicha de manera ordenada en el tiempo describe una recta o hipérbola (en la que no se ve claramente que se haya alcanzado el máximo). Este comportamiento se observó para la mayor parte de los individuos y sugeriría una relación directa entre el efecto y las concentraciones plasmáticas de DMDZ.



**Figura 52:** Poder relativo beta observado tras 30 mg de DMDZ expresado como porcentaje de la señal total recogida en el EEG, frente a la concentración individual predicha por el mejor modelo farmacocinético para DMDZ (modelo 8, tabla 14). Cada número se corresponde con un voluntario y representa el poder relativo beta observado a cada concentración plasmática predicha, las líneas continuas representan la interpolación lineal de las observaciones y la línea continua gruesa representa la media del poder relativo beta observado frente a la concentración poblacional predicha de DMDZ.

### 3.2.1.2.- Desarrollo del sub-modelo estructural

No se observó efecto placebo en la variable poder relativo beta (ver apartado 2.2.2.3) por lo que este efecto no se tuvo en cuenta al establecer la relación FC/FD de DMDZ. Durante el análisis farmacodinámico se fijaron los estimados bayesianos de los parámetros farmacocinéticos obtenidos con el modelo farmacocinético de DMDZ tras su administración por vía oral (modelo 8, tabla 14). En la Tabla 23, se recogen los principales pasos seguidos para describir la parte estructural del modelo que relaciona las concentraciones plasmáticas de DMDZ y los cambios (incrementos) en el poder relativo beta. Comenzamos el desarrollo del modelo empleando una función lineal (Tabla 23) por ser la función más sencilla que se podría aplicar a nuestros datos teniendo en cuenta lo observado en la Figura 52. Este modelo infrapredecía el efecto observado, por lo que se evaluó un modelo de efecto máximo. Las predicciones se acercaron más a las

observaciones que el modelo lineal y la función objetiva indicó mejora estadísticamente significativa, por lo que se incrementó la flexibilidad de la función empleando un modelo de efecto máximo sigmoide, pero con este modelo aparecía correlación entre  $EC_{50}$  y  $\gamma$ , además de aumentar los EER y la disminución de la OBJ no era estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Para descartar la presencia de tolerancia, se probó un modelo de tolerancia en el que se asumió la generación de un metabolito hipotético capaz de inhibir el efecto del fármaco (Porchet et al., 1988). Dicho modelo no llegó a la conversión, lo que es indicativo de ausencia de tolerancia al efecto en el poder relativo beta. Aunque de los modelos obtenidos hasta el momento el de efecto máximo producía una mejor predicción, la estimación de parámetros fue mejor con el modelo lineal por lo que se pasó a evaluar el sub-modelo estadístico de ambos modelos.

### 3.2.1.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

Se cambió el método de minimización a FOCE en los dos modelos (lineal y efecto máximo). El error de estimación de los parámetros incrementó con respecto al obtenido con el método FO. A pesar de que los errores de estimación del modelo de  $E_{max}$  seguían siendo superiores a los del efecto lineal, se decidió continuar con el modelo de efecto máximo. El error de estimación de  $EC_{50}$  y de IIV para  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  era superior al 50% lo que suele ser indicativo de sobreparametrización. Se eliminó VII en los diferentes parámetros de uno en uno, llegándose como mejor modelo a aquel que únicamente incorporaba VII en  $E_0$  y  $EC_{50}$  (modelo 7). En este punto y con el objetivo de obtener unos parámetros mejor estimados, debido al hecho que no teníamos claro que alcanzábamos el efecto máximo del fármaco en nuestros datos, el modelo se reparametrizó siguiendo el modelo descrito en 1998 por (Schoemaker et al., 1998). Con esta estrategia, no se consiguió una mejoría de la predicción a nivel poblacional ni individual, ni se mejoraron los residuales poblacionales e individuales frente al tiempo, pero se disminuyó el EER en el parámetro  $S_0$  respecto al obtenido para  $EC_{50}$ . No se encontró correlación alguna entre los parámetros fijos y aleatorizados entre sí. En la Tabla 24 se muestran los parámetros del modelo final seleccionado.

Tabla 23: Desarrollo del modelo farmacodinámico poblacional de DMDZ tras la administración de 30 mg.

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL
						Aditivo relativo beta (EER%)
¿El modelo de efecto lineal se ajusta a nuestros datos?	1	Modelo Lineal $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $SLP = TVSLP * e^{\eta_{SLP}}$ $EFF = E_0 + (SLP * CP)$ METHOD= FO	1149	$E_0 = 21.1 (8.6)$ $SLP = 0.0168 (12)$	34 (25) 41 (64)	4.9 (18)
¿El modelo de efecto máximo predice mejor el efecto que observamos?	2	Modelo Efecto máximo $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $E_{max} = TVE_{max} * e^{\eta_{E_{max}}}$ $EC_{50} = TVEC_{50} * e^{\eta_{EC_{50}}}$ $EFF = E_0 + (E_{max} * CP) / (EC_{50} + CP)$ METHOD= FO	1106	$E_0 = 19.7 (8.1)$ $E_{max} = 13.9 (17)$ $EC_{50} = 118 (47)$	31 (26) 45 (62) 160 (110)	4.4 (18)
¿La introducción de un factor de sigmoidicidad mejora la predicción?	3	Modelo Efecto máximo sigmoide $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $E_{max} = TVE_{max} * e^{\eta_{E_{max}}}$ $EC_{50} = TVEC_{50} * e^{\eta_{EC_{50}}}$ $\gamma = TV\gamma$ $EFF = E_0 + (E_{max} * CP^\gamma) / (EC_{50}^\gamma + CP^\gamma)$ METHOD= FO	1103	$E_0 = 19.9 (8.3)$ $E_{max} = 12 (17)$ $EC_{50} = 157 (166)$ $\gamma = 1.76 (72.1)$	31 (28.9) 47 (60.6) 139 (127) NE	4.3 (76.8)
¿Un modelo de tolerancia se ajusta mejor a nuestros datos?	4	Modelo de tolerancia $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $SLP = TVSLP * e^{\eta_{SLP}}$ $CT_{50} = TVCT_{50}$ $EFF = E_0 + (SLP * CP) / (1 + (CT / CT_{50}))$ METHOD= FO	NC			
¿Es necesario incorporar el método de minimización FOCE al modelo lineal?	5	Modelo Lineal = Run 1 con METHOD= FOCE	1153	$E_0 = 19.7 (9.3)$ $SLP = 0.016 (15.1)$	38.2 (26.6) 41.3 (71.3)	4.9 (18.1)
¿La predicción mejora con un modelo de efecto máximo y un método de minimización FOCE?	6	Modelo Efecto máximo =Run 2 con METHOD= FOCE	1104	$E_0 = 18.8 (6.2)$ $E_{max} = 16.1 (13.1)$ $EC_{50} = 192 (64.6)$	31.1 (8.9) 20.1 (84.6) 180 (67.3)	4.4 (17)
¿Es necesaria la VII en Emax en el modelo de Efecto máximo?	7	Modelo Efecto máximo =Run 6 sin VII en Emax	1106	$E_0 = 18.9 (8.4)$ $E_{max} = 16.6 (13.7)$ $EC_{50} = 198 (69)$	30.8 (31) NE 180 (67)	4.5 (17)
¿Es necesario reparametrizar el modelo de Efecto máximo?	8	Modelo Efecto máximo reparametrizado $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $E_{max} = TV E_{max}$ $S_0 = TV S_0 * e^{\eta_{S_0}}$ $EFF = E_0 + (S_0 * E_{max} * CP) / (E_{max} + S_0 * CP)$ METHOD=FOCE	1106	$E_0 = 18.9 (8.4)$ $E_{max} = 16.6 (13.7)$ $S_0 = 0.084 (59.3)$	30.1(30.8) NE 176 (66.3)	4.5 (17.1)

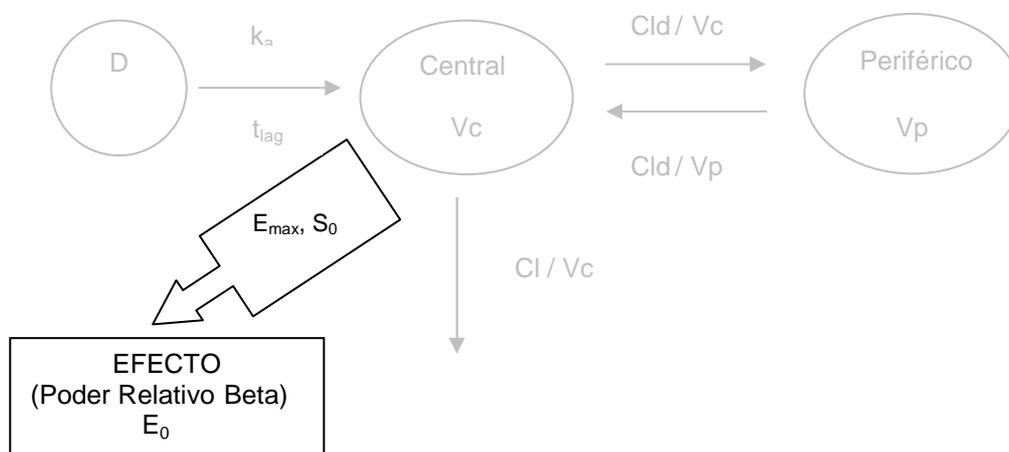
$E_0$ : Valor basal,  $E_{max}$ : Efecto máximo,  $EC_{50}$ : concentración a la que se observa la mitad del efecto máximo,  $S_0 = E_{max} / EC_{50}$ . CT: concentración de fármaco en el compartimento de tolerancia,  $CT_{50}$ : concentración de fármaco en el compartimento de tolerancia, que provoca el 50% del efecto máximo. EFF: Efecto observado, Parámetros de efectos aleatorios: Variabilidad interindividual (VII) se expresa como coeficiente de variación (%CV). La exactitud de los parámetros de efectos fijos estimados así como de los efectos aleatorios se expresa como el porcentaje del error estándar relativo (EER) entre paréntesis. NE: no estimado. NC: no converge. \*: VII está expresada como desviación estándar.

### 3.2.1.4.- Desarrollo del sub-modelo de covariables

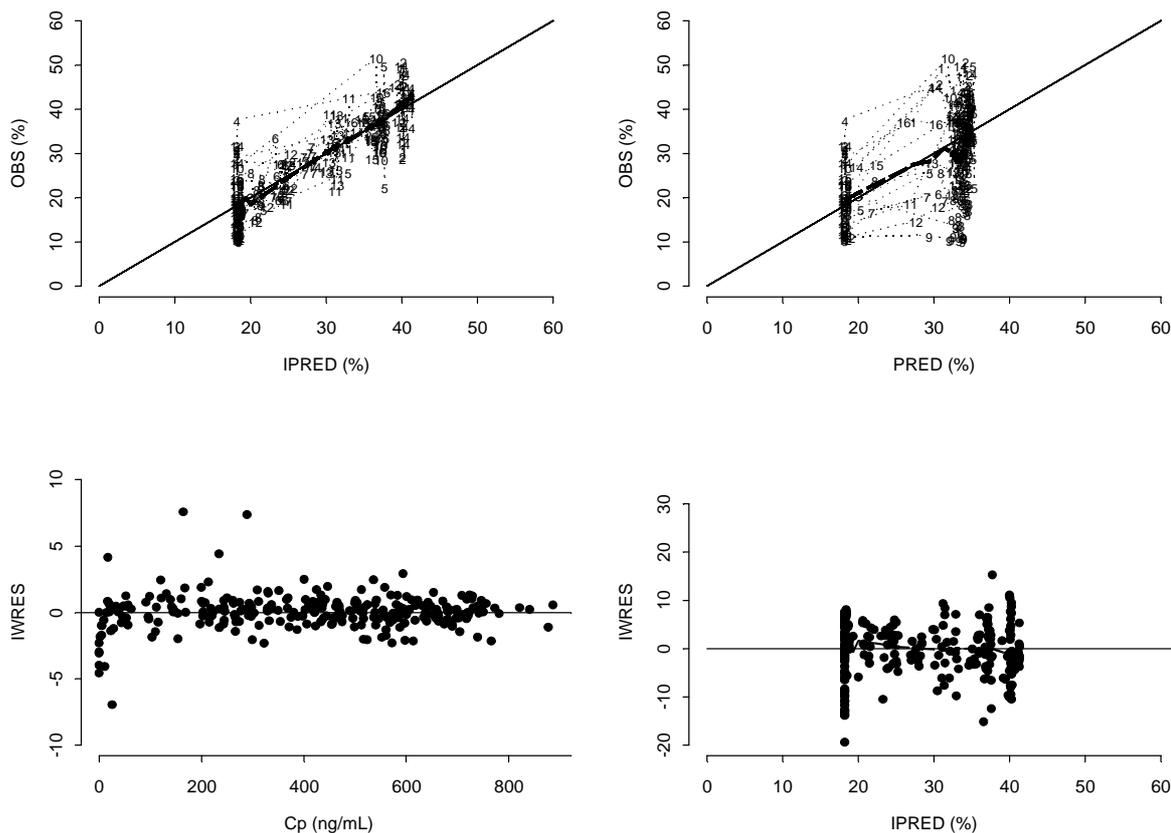
No encontramos ninguna correlación al representar gráficamente los parámetros FD individuales frente a las covariables recogidas (altura, peso, sexo, raza o edad) y tampoco se encontró correlación alguna tras aplicar el GAM a los parámetros obtenidos con el modelo seleccionado. Por lo tanto no se probó la introducción de ninguna covariable en NONMEM y el modelo final seleccionado fue el recogido en la figura 53.

### 3.2.1.5.- Modelo seleccionado

La farmacodinamia de DMDZ tras administración de 30 mg por vía oral se caracterizó satisfactoriamente utilizando un modelo de efecto máximo reparametrizado (Figura 53). Se logró caracterizar los datos desde el punto de vista individual (Figura 54, panel superior izquierdo) y poblacional (Figura 54, panel superior derecho) y con errores de estimación para todos los parámetros aceptables. No se observaron sesgos en la predicción del modelo que indicaran sobreestimación de parámetros aleatorios (Figura 54, paneles inferior izquierdo y derecho). La tabla 24 recoge los estimados de los parámetros de este modelo.



**Figura 53:** Representación esquemática del modelo farmacocinético / farmacodinámico seleccionado para DMDZ. D: dosis administrada por vía oral,  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $C_{ld}$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_p$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación,  $E_0$ : poder relativo beta en basal,  $E_{max}$ : Efecto máximo,  $S_0$ :  $E_{max}/EC_{50}$ . Se ha omitido la F (fracción de DZ absorbido) en los parámetros para simplificar la representación



**Figura 54:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo farmacodinámico seleccionado para DMDZ (tras la administración de 30 mg DMDZ). Panel superior izquierdo, cambios del poder relativo beta observados (OBS) vs cambios predichos a nivel individual (IPRED); panel superior derecho, OBS vs cambios predichos a nivel poblacional (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) vs Concentraciones plasmáticas observadas (Cp) y panel inferior derecho, residuales individuales ponderados (IWRES) frente al efecto individual predicho (IPRED). Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.

**Tabla 24:** Parámetros estimados por modelo farmacodinámico seleccionado tras administrar 30 mg de DMDZ.

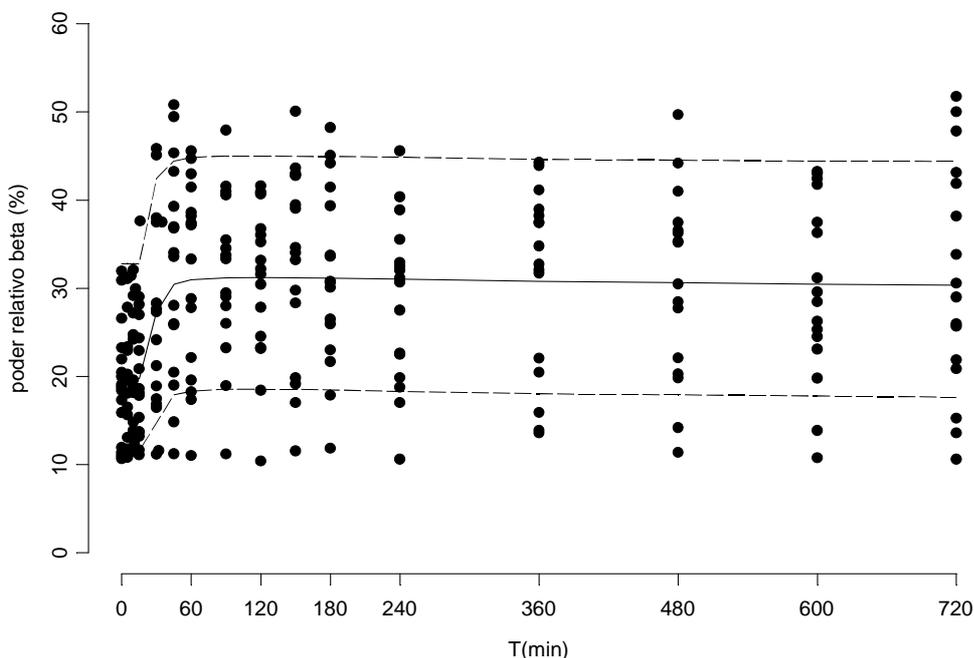
PARÁMETRO	ESTIMADO	EER (%)	VII (CV%)	EER (%)
$E_0$ (%)	18.9	8.4	30.1	30.8
$E_{max}$ (%)	16.6	13.7	NE	-
$S_0$	0.084	59.3	176	66.3
Error residual (%)	4.5	17.1	-	-

$E_0$ : Valor basal,  $E_{max}$ : Efecto máximo,  $S_0 = E_{max}/EC_{50}$ ,  $EC_{50}$ : concentración a la que se observa la mitad del efecto máximo, NE: no estimado

**3.2.1.6.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo**

El intervalo de predicción del 90 % de los 1000 perfiles individuales de efecto generados mediante simulaciones de Monte Carlo a partir del modelo seleccionado, se representó junto a los cambios observados en el EEG frente al tiempo, añadiendo el promedio de las simulaciones (predicción

poblacional). Aproximadamente el 90 % de las observaciones estuvieron dentro del intervalo de predicción del 90 % (Figura 55), hecho que reflejó una buena capacidad predictiva del modelo seleccionado.

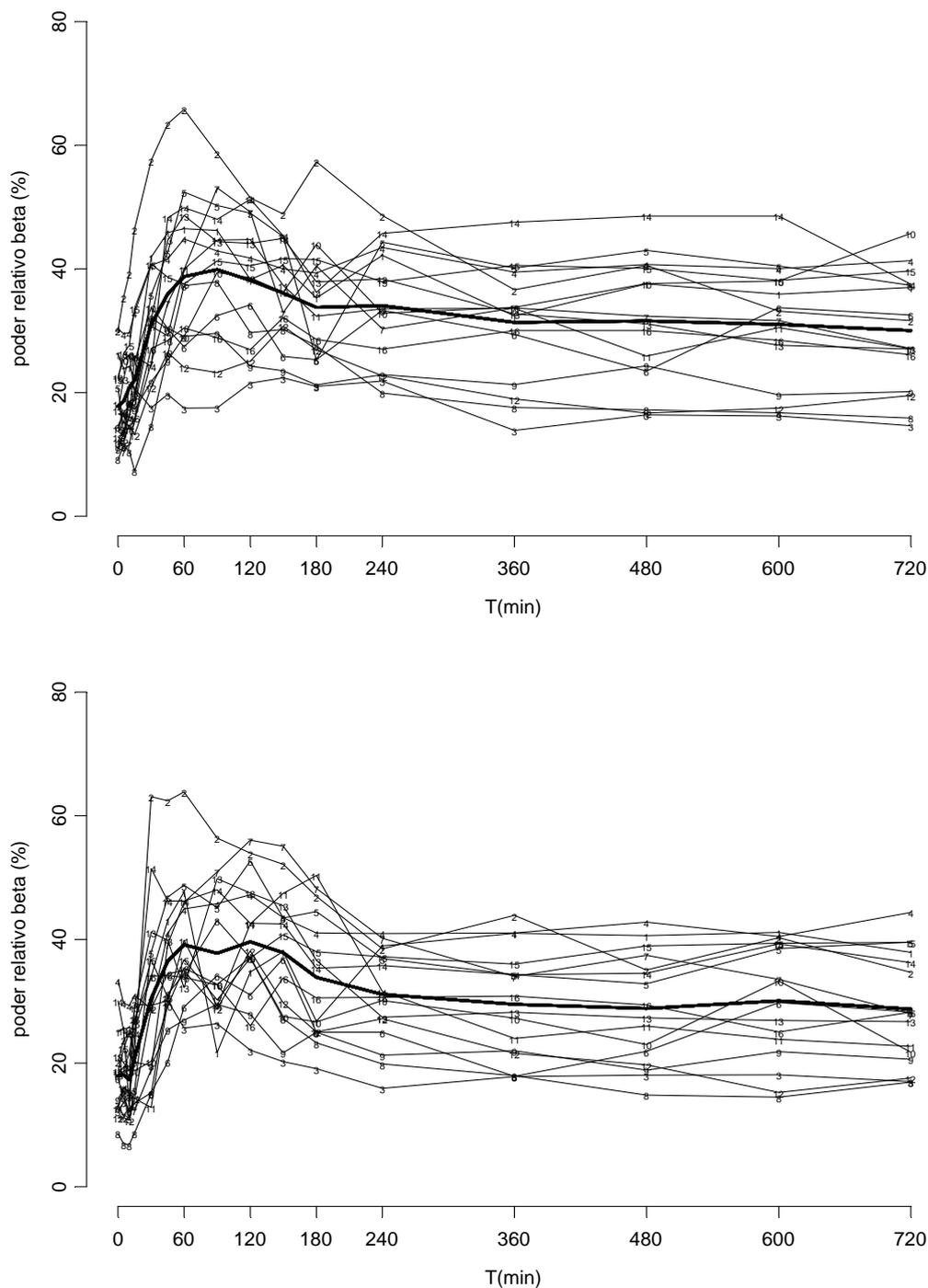


**Figura 55:** Evaluación visual de la capacidad predictiva del modelo farmacodinámico seleccionado para DMDZ. Los puntos representan el efecto observado tras tomar DMDZ, la línea continua representa la predicción media poblacional del modelo seleccionado y las líneas discontinuas delimitan el intervalo de predicción del 90%.

### 3.2.2.- Desarrollo del modelo FD poblacional de DZ tras su administración por vía oral

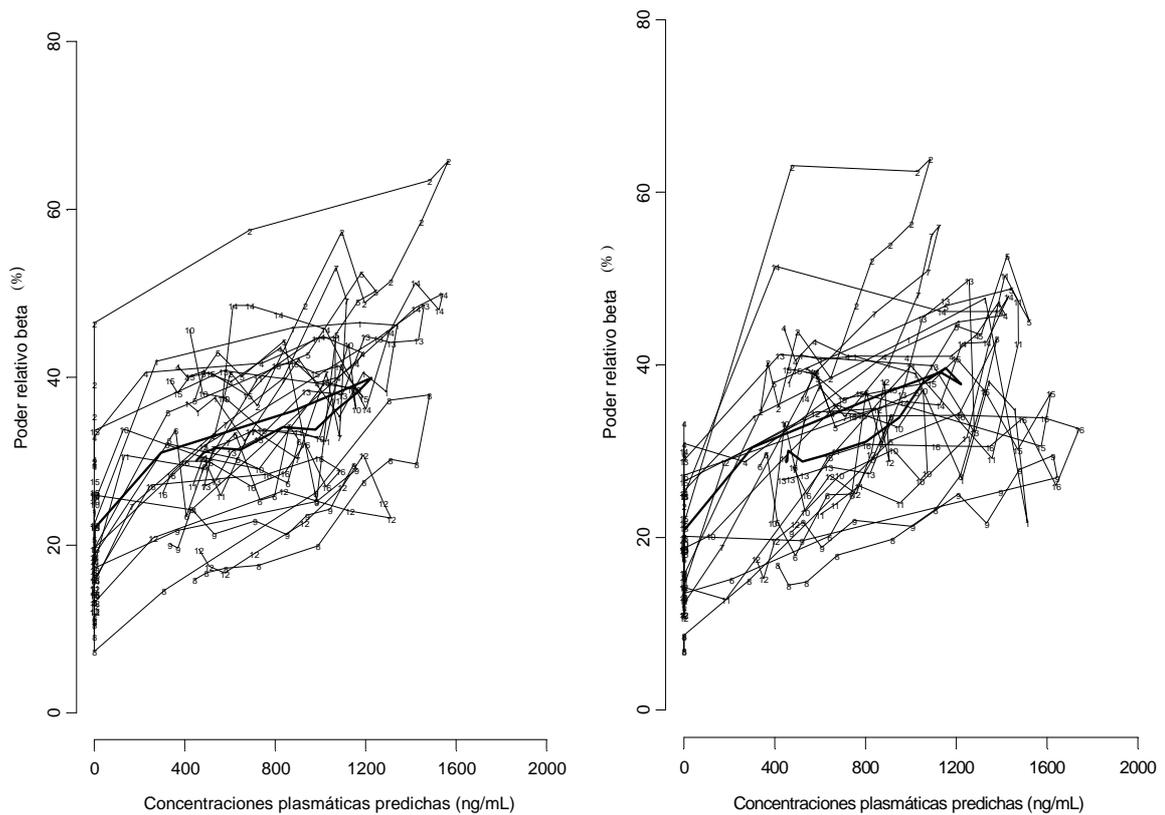
#### 3.2.2.1.- Análisis exploratorio de datos

El efecto (poder relativo beta) derivado del EEG producido tras la primera administración de 30 mg de DZ por vía oral osciló entre 7.31 % y 65.81 %. Tras la segunda administración de DZ, el efecto medido osciló entre 6.80 % y 63.84 %. En la Figura 56 se muestra el curso temporal del efecto hasta las 12 h (720 min).



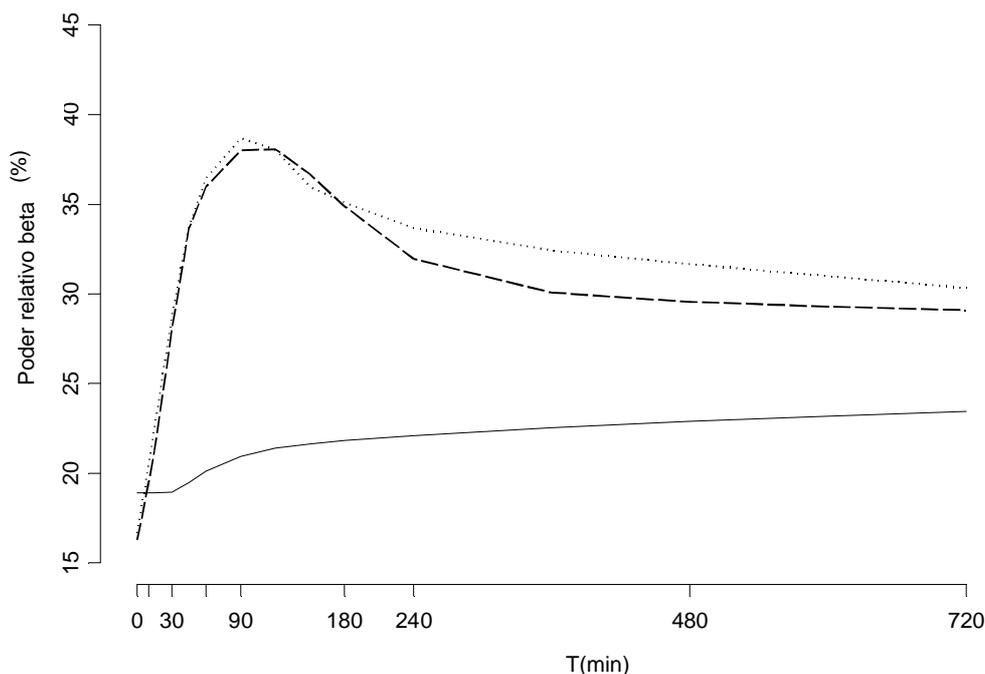
**Figura 56:** Poder relativo beta expresado como porcentaje de la señal total recogida en el EEG. En el panel superior se representa el efecto observado tras DZ1 y en el panel inferior, el efecto observado tras DZ2. Cada número se corresponde con un voluntario y representa el poder relativo beta observado a cada tiempo, las líneas continuas representan la interpolación lineal de las observaciones y la línea continua gruesa representa la media del poder relativo beta observado frente al tiempo.

Las gráficas representadas en la Figura 57 muestran que, el efecto medio observado frente al promedio de la concentración poblacional predicha por el mejor modelo farmacocinético (modelo 12, tabla 21) de manera ordenada en el tiempo, y para ambas ocasiones, describió una recta. Este mismo comportamiento se observa para la mayor parte de los individuos.



**Figura 57:** Poder relativo beta expresado como porcentaje de la señal total recogida en el EEG, frente a la concentración individual de DZ predicha por el modelo farmacocinético simultáneo de DZ + DMDZ seleccionado (modelo 12, tabla 21). En el panel izquierdo tras la primera administración de 30 mg de DZ y en el panel derecho tras la segunda administración de 30 mg de DZ. Cada número se corresponde con un voluntario y representa el poder relativo beta observado a cada concentración plasmática predicha, las líneas continuas representan la interpolación lineal de las observaciones y la línea continua gruesa representa la media del poder relativo beta observado frente a la concentración media poblacional predicha.

Los resultados de simular el efecto que se observaría tras la administración de una dosis única de 30 mg de DZ si solo se tuvieran en cuenta las concentraciones de DMDZ formado y el modelo FD descrito en el apartado (3.2.1), mostraron que el efecto era inferior al observado y por lo tanto el DZ también tenía un efecto claro.



**Figura 58:** Poder relativo beta expresado como porcentaje de la señal total recogida en el EEG, frente al tiempo. La línea continua representa el efecto simulado tras la administración de una dosis de 30 mg de DZ suponiendo que solo existieran concentraciones plasmáticas de DMDZ. La línea punteada es el promedio del efecto observado tras DZ1 y la línea discontinua es el promedio del efecto observado tras DZ2.

### 3.2.2.2.- Análisis PD fijando los estimados bayesianos de DMDZ

#### 3.2.2.2.1.- Desarrollo del sub-modelo estructural

Al no observarse efecto placebo en la variable poder relativo beta (evaluado en el análisis no compartimental, en la sección 2.2.1.1), este efecto no se tuvo en cuenta al establecer la relación FC/FD de DZ y DMDZ.

Inicialmente, el análisis farmacodinámico del efecto global ocasionado por DZ y DMDZ se llevó a cabo fijando los estimados bayesianos individuales de los parámetros farmacocinéticos de DZ y DMDZ obtenidos en el apartado 3.1.4 (análisis FC poblacional simultáneo de DZ y DMDZ, Modelo 12, Tabla 21) y los estimados bayesianos individuales de los parámetros farmacodinámicos de DMDZ, obtenidos tras administrar 30 mg de DMDZ por vía oral (apartado 3.2.1, Modelo 8, Tabla 23). En la Tabla 25 se recogen los modelos clave seguidos para el desarrollo del modelo farmacodinámico de DZ en las condiciones descritas anteriormente. Empezamos el modelado de la interacción de DZ y DMDZ con un modelo de efecto máximo para DZ, efecto máximo reparametrizado para DMDZ y una interacción de tipo aditivo. La predicción obtenida mostró que un modelo de efecto máximo para DZ no se ajustaba a nuestros datos ya que estimaba un valor de  $EC_{50}$  para el fármaco muy elevado, más allá del valor de concentraciones observado, y el efecto máximo cercano al 100% lo que era indicativo de que el valor de  $E_{max}$  y el de  $EC_{50}$  estaban

correlacionados porque en los datos no hay una clara definición del  $E_{max}$ . Además el modelo no generó la matriz de covarianza. Se simplificó por tanto el modelo de DZ a uno lineal. Con este modelo obtuvimos unos parámetros más plausibles, y con unos EER menores, aunque presentaba una ligera subestimación en los valores máximos de efecto. Por ello, siguiendo la misma estrategia descrita para el metabolito, se probó un modelo de efecto máximo reparametrizado para el fármaco. En este caso, la reparametrización del modelo de  $E_{max}$  para DZ no supuso una disminución en la OBJ, ni una mejora en las predicciones, ni en los errores de estimación de los parámetros con respecto al modelo lineal, y por ello se descartó el modelo reparametrizado para DZ. Seguidamente se probó un modelo de interacción competitiva entre DZ y DMDZ con un modelo de efecto máximo reparametrizado para ambos analitos, pero los parámetros estimados por este modelo no eran plausibles, ya que estimaba un  $E_{max}$  superior al 100%. Por ello el modelo seleccionado en este momento fue un modelo de interacción aditiva con efecto lineal para DZ (Modelo 2, Tabla 25).

#### 3.2.2.2.2.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

Continuamos, incorporando VIO en el parámetro  $E_0$ , hecho que mejoró el modelo provocando una disminución en la OBJ estadísticamente significativa y una disminución en la variabilidad residual, aunque el problema de la subestimación de parte del efecto continuaba presente. Finalmente, se evaluó si el modelo estaba sobreparametrizado en términos de variabilidad interindividual, llegándose a la conclusión de que los datos soportaban variabilidad interindividual en el SLP y el  $E_0$ , además de variabilidad entre ocasiones en  $E_0$  utilizando una ecuación exponencial para su estimación.

El mejor modelo farmacodinámico obtenido tras fijar los estimados farmacodinámicos bayesianos individuales de DMDZ a los valores estimados tras el análisis de 30 mg de DMDZ, se caracterizó por un modelo aditivo con modelo lineal para fármaco y de efecto máximo reparametrizado ( $E_{max}$ ) para su metabolito (Figura 62).

**Tabla 25:** Desarrollo del modelo farmacodinámico de DZ y DMDZ tras administrar 30 mg de DZ con los estimados bayesianos farmacocinéticos de DZ y DMDZ fijados a los obtenidos por el modelo 12, tabla 21 y estimados bayesianos farmacodinámicos de DMDZ fijados a los obtenidos por el modelo final seleccionado del análisis de DMDZ tras su administración por vía oral (modelo 8, tabla 23).

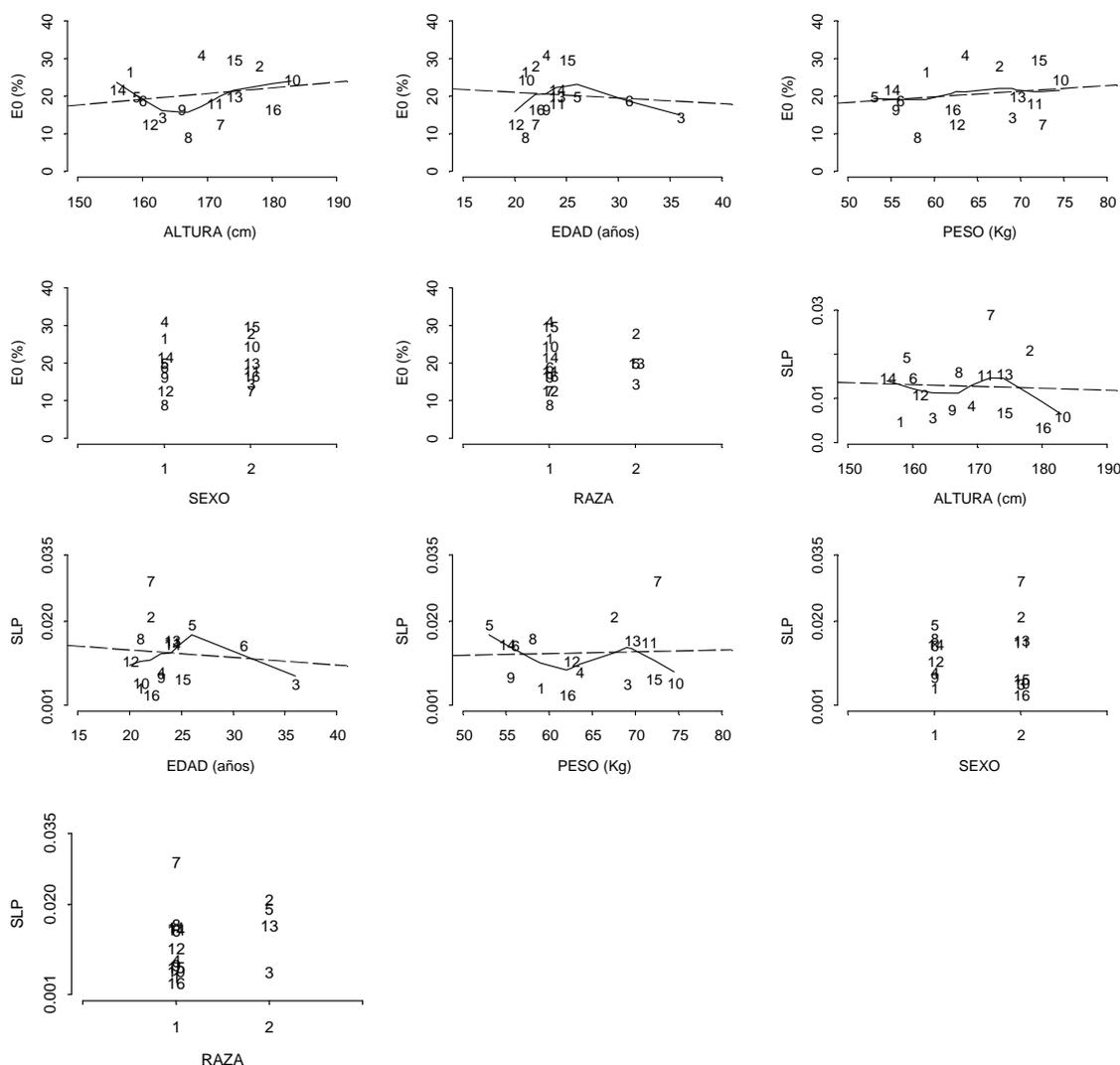
HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL Aditivo relativo beta (%) EER (%)
¿Un modelo de interacción aditiva y efecto máximo para DZ predice correctamente el efecto observado?	1	Efecto máximo; DZ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{\eta_{EmaxF}}$ $EC_{50F} = TVEC_{50F} * e^{\eta_{EC50F}}$ Modelo de interacción aditivo $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	2386	$E_0 = 18.9$ (NC) $E_{maxF} = 94.8$ (NC) $EC_{50F} = 7560$ (NC)	31.6 (NC) 59.4 (NC) $7.2 e^{-2}$ (NC)	5.66 (NC)
¿El efecto observado se ajusta mejor a un modelo de interacción aditiva y efecto lineal para DZ?	2	= Run1, con efecto de DZ lineal $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E0}}$ $SLP = TVSLP * e^{\eta_{SLP}}$ Modelo de interacción aditivo $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	2387	$E_0 = 19.1$ (8.5) $SLP = 0.0106$ (18.0)	31.4 (40) 61.4 (35.5)	5.67 (13.9)
Modelo de $E_{max}$ reparametrizado para fármaco	3	= Run 1, con efecto máximo reparametrizado; DZ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{\eta_{EmaxF}}$ $S_{0F} = TV_{S0F}$ Modelo de interacción aditivo $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	2387	$E_0 = 18.3$ (8.96) $E_{maxF} = 29.9$ (40.1) $S_{0F} = 0.026$ (21.5)	32.8 (49) 136 (34) NE	5.68 (13.8)
¿El efecto observado se ajusta mejor a un modelo de interacción competitiva (o antagonismo competitivo) entre DZ y DMDZ?	4	Efecto máximo reparametrizado; DZ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{\eta_{EmaxF}}$ $EC_{50F} = TVEC_{50F} * e^{\eta_{EC50F}}$ Modelo de interacción competitiva $E = E_0 + ((S_0 * E_{maxF}) * (CPF / EC_{50F}) + S_0 * E_{maxM} * (CPM / (E_{maxM} + S_0))) / (1 + (CPF / EC_{50F}) + (CPM / (E_{maxM} + S_0)))$ METHOD = FOCE	2295	$E_0 = 18.1$ (7.9) $E_{maxF} = 321$ (35.5) $EC_{50F} = 140$ (49.6)	30 (35.5) 130 (28.8) 130 (52.9)	4.8 (11)
¿Es necesario incorporar VIO en el $E_0$ ?	5	= Run 2, con VIO $VIO_{E0}$ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E0}}$ $SLP = TVSLP * e^{\eta_{SLP}}$ Modelo aditivo $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	2371	11.2 (50.2)* $E_0 = 19$ (8.7) $SLP = 0.011$ (18.5)	30 (42.6) 61.8 (36.8)	5.45 (15.7)

$E_0$ : Valor basal,  $E_{max}$ : Efecto máximo,  $EC_{50F}$ : concentración de fármaco a la que se observa la mitad del efecto máximo,  $S_0 = E_{max} / EC_{50}$ , SLP: pendiente. Los subíndice F y M, corresponden a fármaco y metabolito respectivamente, EFF: efecto observado, EFFDZ: efecto producido por DZ y EFFDMDZ efecto producido por DMDZ \* valor estimado de variabilidad interocasión (VIO) en  $E_0$ . NC: no converge.

**3.2.2.2.3.- Desarrollo del sub-modelo de covariables**

Tras explorar los parámetros FD individuales frente a las covariables recogidas (altura, peso, sexo, raza o edad) no encontramos ninguna correlación, como puede apreciarse en la Figura 59. El

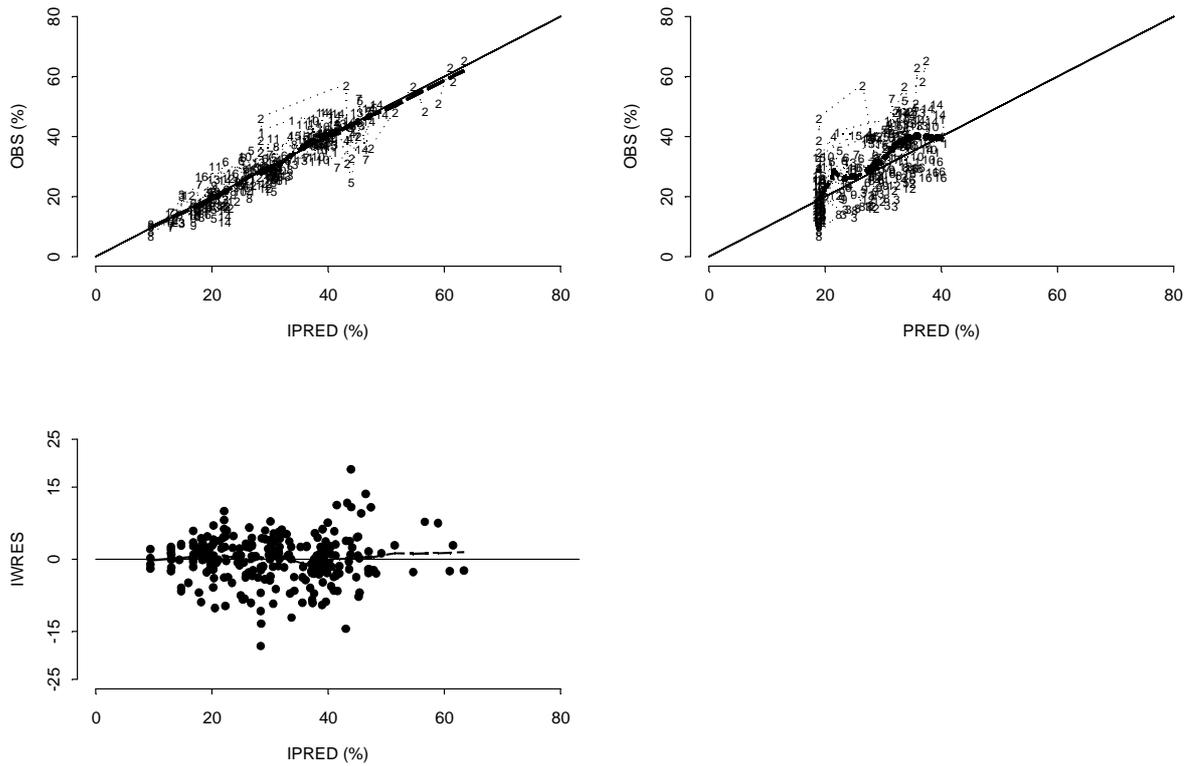
GAM aplicado tampoco halló ninguna correlación, por lo tanto no se probó la introducción de ninguna covariable en NONMEM y el modelo seleccionado fue el modelo final sin covariables.



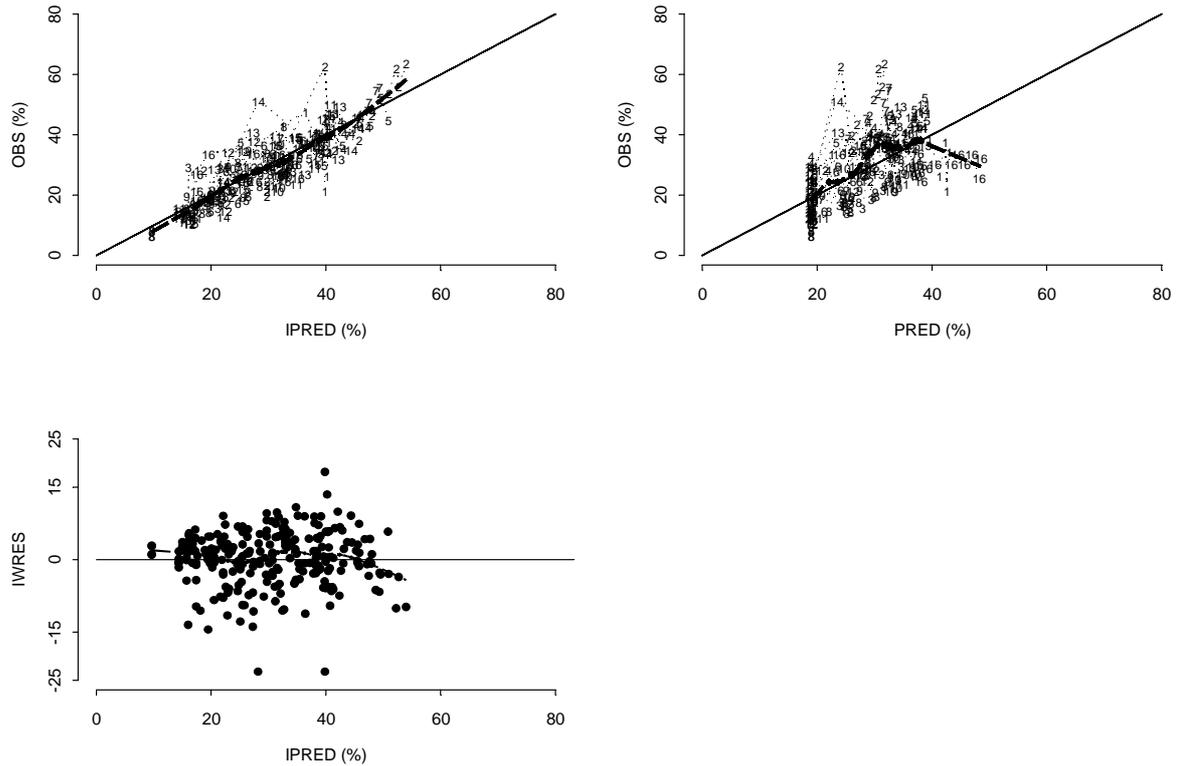
**Figura 59:** Gráfico de dispersión bivariado mostrando la relación entre los parámetros farmacodinámicos individuales estimados por el modelo 5 y las covariables. Los números representan el valor individual. La línea continua es la línea de tendencia y la línea discontinua es la recta de regresión lineal.

### 3.2.2.2.4.- Modelo seleccionado

El modelo final seleccionado para describir los efectos observados tras administrar DZ fijando los parámetros a los estimados bayesianos de DMDZ (Modelo 5, tabla 25) caracterizó satisfactoriamente los datos tanto tras la primera administración de DZ (Figura 60) como tras la segunda administración de DZ (Figura 61) y desde el punto de vista poblacional (Figuras 60 y 61, panel superior derecho) como individual (Figuras 60 y 61, panel superior izquierdo). La estimación de parámetros aleatorios no conllevó sesgos de predicción (Figuras 60 y 61, panel inferior izquierdo), y los errores de estimación de los parámetros fueron inferiores al 50%.

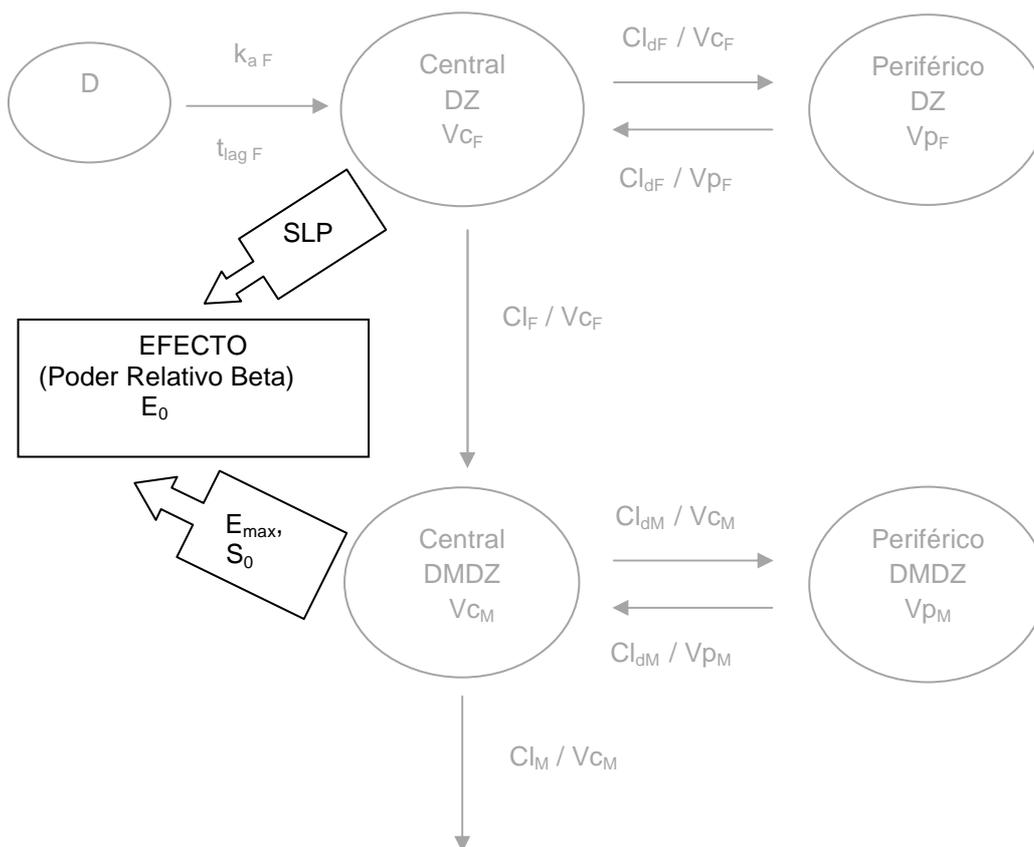


**Figura 60:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado para describir el poder relativo beta (tras la primera administración de 30 mg de DZ, fijando los parámetros a los estimados bayesianos de DMDZ). Panel superior izquierdo, poder relativo beta observado (OBS) vs poder relativo beta individual predicho (IPRED); panel superior derecho, OBS vs poder relativo beta poblacional predicho (PRED); panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados (IWRES) frente IPRED. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.



**Figura 61:** Gráficas de bondad de ajuste para el modelo seleccionado para describir el poder relativo beta (tras la segunda administración de 30 mg de DZ, fijando los parámetros a los estimados bayesianos de DMDZ). Panel superior izquierdo, poder relativo beta observado vs poder relativo beta individual predicho; panel superior derecho, poder relativo beta observado vs poder relativo beta poblacional predicho; panel inferior izquierdo, residuales individuales ponderados frente al poder relativo beta individual predicho. Paneles superiores, la línea continua fina es la línea identidad y la línea discontinua es la línea de tendencia de las observaciones.

La relación entre las concentraciones plasmáticas de DZ y los cambios (incrementos) en el poder relativo beta se describió empleando un modelo de interacción aditiva, lineal para DZ y de efecto máximo reparametrizado para DMDZ (Figura 62). Los parámetros estimados por este modelo (Modelo 5, Tabla 25) están recogidos en la Tabla 26.



**Figura 62:** Representación gráfica del modelo farmacocinético / farmacodinámico seleccionado. D: dosis de DZ administrada por vía oral,  $t_{lag}$ : tiempo de latencia,  $k_a$ : constante de absorción de primer orden,  $V_c$ : volumen aparente de distribución del compartimento central,  $Cl_d$ : aclaramiento aparente de distribución,  $V_p$ : volumen aparente de distribución del compartimento periférico,  $Cl$ : aclaramiento aparente de eliminación,  $E_0$ : poder relativo beta en basal,  $E_{max}$ : Efecto máximo,  $S_0$ :  $E_{max}/EC_{50}$ ,  $EC_{50}$ : concentración a la que se observa la mitad del efecto máximo, SLP: pendiente. Los subíndices  $F$  y  $M$ , corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. Se ha omitido la  $F$  (fracción de DZ absorbido) y la  $f$  (fracción de DZ transformado en DMDZ) en los parámetros para simplificar la representación

**Tabla 26:** Parámetros farmacodinámicos estimados para el efecto observado tras administrar diazepam cuando se fijan los estimados bayesianos individuales para el efecto de DMDZ (modelo 5, tabla 25) con el modelo final seleccionado

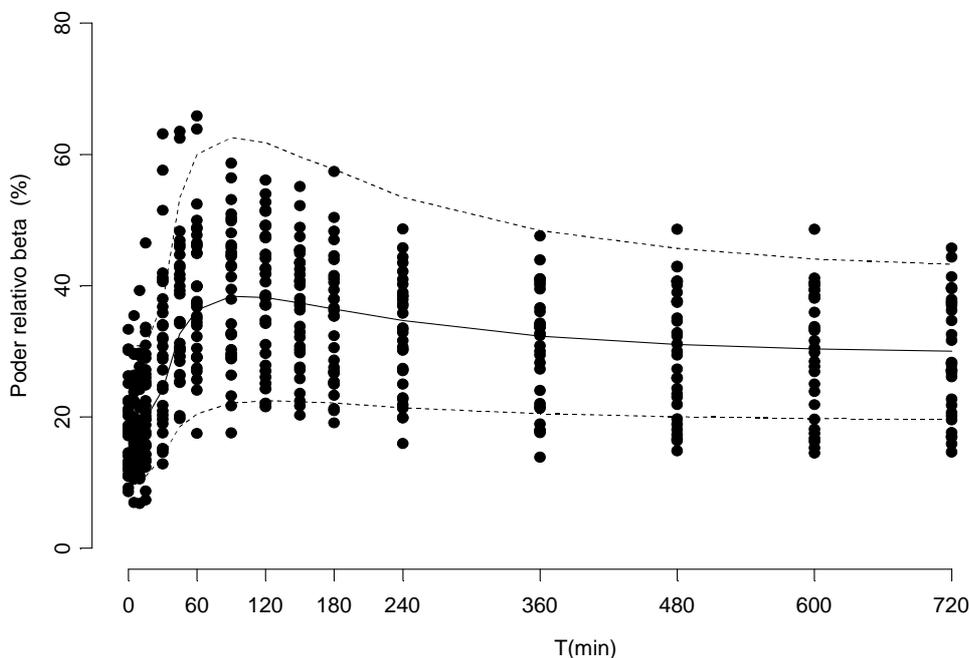
PARÁMETRO	ESTIMADO	EER (%)	VII (CV%)	EER (%)
$E_0$ (%)	19	8.7	30	42.6
VIO	-	-	11.2	50.2
SLP	0.011	18.5	61.8	36.8

$E_0$ : Valor basal, SLP: pendiente, variabilidad interocasión (VIO) expresada como coeficiente de variación (%CV).

### 3.2.2.2.5.- Evaluación de la capacidad predictiva del modelo

El intervalo de predicción del 90% de los 1000 perfiles individuales de efecto generados mediante simulaciones de Monte Carlo en las que se fijaron los parámetros típicos poblacionales y su dispersión a los estimados por el modelo 5 tabla 25, se representó junto a los cambios observados

en el EEG frente al tiempo añadiendo el promedio de las simulaciones (predicción poblacional). En la Figura 51 se muestra el VPC del 90% del efecto con el modelo final seleccionado y se observa que aproximadamente el 5% de las observaciones de efecto están por encima de este intervalo y otro 5% por debajo del mismo.



**Figura 63:** Evaluación visual de la predicción simulada del modelo final seleccionado. Los puntos representan el efecto observado tras tomar 30 mg de DZ. La línea continua representa la predicción poblacional con el modelo final seleccionado y las líneas discontinuas se corresponden con los percentiles 5 y 95% respectivamente.

### 3.2.2.3.- Análisis PD fijando los estimados poblacionales de DMDZ

La siguiente estrategia consistió en fijar los parámetros poblacionales del modelo del metabolito como opción intermedia entre fijar los parámetros individuales y no fijar ningún parámetro (Tabla 27). Con esta estrategia, confirmamos que el modelo que describió mejor el comportamiento de nuestros datos, fue un modelo lineal para el fármaco, de efecto máximo reparametrizado para el metabolito y una interacción de tipo aditivo. El modelo de interacción aditiva con efecto máximo aplicado a DZ y efecto máximo reparametrizado aplicado a DMDZ, estimó el efecto del fármaco en un rango lineal de la curva de  $C_p$  y con un efecto máximo demasiado elevado. Además, el modelo de interacción aditiva con efecto máximo reparametrizado para DZ y DMDZ tampoco mejoró la predicción y estimó una  $V_{II}$  para  $E_{max}$  y  $S_0$  muy elevada, aumentó la OBJ y no pudimos obtener los EER de estimación de los parámetros.

**Tabla 27:** Desarrollo del modelo farmacodinámico de DZ y DMDZ con los estimados poblacionales de DMDZ fijados al modelo final seleccionado del análisis de DMDZ tras su administración por vía oral (modelo 8, tabla 23).

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL
						Aditivo relativo beta (%) EER (%)
¿El efecto observado tras la administración de DZ se puede describir con modelo de interacción aditiva y efecto lineal para DZ?	1	Efecto lineal; DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $SLP = TVSLP * e^{\eta_{SLP}}$ Modelo de interacción aditiva $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	3484	$E_0 = 19.6$ (7.7) $SLP = 0.0116$ (13.4) $E_{maxM} = 16.6$ FIJADO $S_{0M} = 0.084$ FIJADO	29.8 (25.7) 48.7 (35.9)	5.34 (12.2)
¿El efecto observado se explica mejor mediante un modelo de interacción aditiva para DZ y efecto máximo reparametrizado para DMDZ?	3	Efecto máximo; DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{\eta_{E_{maxF}}}$ $EC_{50F} = TVEC_{50F} * e^{\eta_{EC_{50F}}}$ Modelo de interacción aditiva $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	3838	$E_0 = 23.8$ (7.9) $E_{maxF} = 100$ (0.09) $EC_{50F} = 10900$ (18) $E_{maxM} = 16.6$ FIJADO $S_{0M} = 0.084$ FIJADO	30.29 (25.7) 58.7 (38.8) $7.2 e^{-8}$ (>500)	6.85 (12.7)
¿El efecto observado se explica mejor mediante un modelo de $E_{max}$ reparametrizado para fármaco y metabolito?	4	Efecto máximo reparametrizado; DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{\eta_{E_0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{\eta_{E_{maxF}}}$ $S_{0F} = TVS_{0F} * e^{\eta_{S_{0F}}}$ Modelo de interacción aditiva $EFF = EFFDZ + EFFDMDZ$ METHOD = FOCE	3404	$E_0 = 18.3$ (NC) $E_{maxF} = 32.8$ (NC) $S_{0F} = 0.036$ (NC) $E_{maxM} = 16.6$ FIJADO $S_{0M} = 0.084$ FIJADO	33 (NC) 193 (NC) 182 (NC)	5.03 (NC)

$E_0$ : Valor basal,  $E_{maxF}$ : Efecto máximo del fármaco,  $E_{max}$ : Efecto máximo,  $EC_{50}$ : concentración de fármaco a la que se observa la mitad del efecto máximo,  $S_0 = E_{max}/EC_{50}$ , SLP: pendiente, EFF: Efecto observado. EFFDZ: efecto producido por DZ y EFFDMDZ efecto producido por DMDZ Los subíndices  $F$  y  $M$  corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. NC: no converge.

### 3.2.2.4.- Análisis farmacodinámico de DZ y DMDZ simultáneamente

#### 3.2.2.4.1.- Desarrollo del sub-modelo estructural

Finalmente se procedió al análisis simultáneo de los efectos observados tras las dos administraciones de 30 mg de DZ y aquellos observados tras la administración de DMDZ. En la Tabla 28 se recogen los modelos clave de este desarrollo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados (3.2.1, 3.2.2.2 y 3.2.2.3) se empezó el análisis simultáneo con un modelo lineal para DZ, de efecto máximo reparametrizado para DMDZ y una interacción de tipo aditivo. El efecto predicho por este modelo era algo inferior al observado tras la administración de DZ especialmente en la zona de mayor efecto. El siguiente paso fue probar un modelo aditivo de efecto máximo para DZ y de efecto máximo reparametrizado

para DMDZ, pero de nuevo estimaba el parámetro EC50 para el fármaco muy elevado, más allá del valor de concentraciones observado. La evaluación de un modelo aditivo lineal para DZ y DMDZ resultó en un ajuste estadísticamente inferior ya que la OBJ aumentó.

Como los resultados obtenidos *in vitro* (Gobbi et al., 1987) hacían pensar en la posibilidad de encontrarnos con un antagonismo competitivo, probamos un modelo de interacción de antagonismo competitivo de efecto máximo reparametrizado para DZ y DMDZ. Esto permitió descartar dicho antagonismo, ya que el modelo tampoco aportó buenas predicciones y el parámetro  $S_0$  para DMDZ era demasiado elevado, concretamente 4 veces superior al obtenido tras DMDZ solo, se estimaba con un EER > 50% y además la VII era de casi un 300%, valor que no lo hacía plausible. Viendo que parecía probable que no nos encontráramos delante de un antagonismo competitivo, intentamos estudiar más a fondo el modelo aditivo. Para ello, probamos un modelo de interacción aditiva con modelos de efecto máximo reparametrizado para DZ y DMDZ y obtuvimos la misma pendiente para ambos analitos, la OBJ no indicó mejora estadística y los errores de estimación de los parámetros aumentaron ligeramente respecto del modelo lineal para DZ y reparametrizado para DMDZ. Por lo tanto, se continuó el desarrollo del modelo a partir del modelo de interacción aditiva con efecto lineal para DZ y efecto máximo reparametrizado para DMDZ.

#### 3.2.2.4.2.- Desarrollo del sub-modelo estadístico

A partir del mejor modelo estructural, que fue el modelo aditivo con efecto lineal para DZ y efecto máximo reparametrizado para DMDZ, se añadió variabilidad interindividual en los diferentes parámetros fijos uno a uno e incorporamos variabilidad interocasiones en  $E_0$ . Seguidamente, se evaluó un modelo con un error residual diferente para cada analito pero su incorporación no mejoró ni las predicciones, ni la precisión en la estimación de los parámetros con respecto al modelo anterior, por lo que, a pesar de que el modelo 7, tabla 28 estimó un valor de  $S_0$  para DMDZ (0.04) inferior al estimado al administrarlo solo (0.084), puesto que la descripción de los datos era adecuada se seleccionó como modelo para describir los datos tras la toma de DZ.

#### 3.2.2.4.3.- Desarrollo del sub-modelo estadístico de covariables

Tras explorar los parámetros FD individuales frente a las covariables recogidas (altura, peso, sexo, raza o edad) no encontramos ninguna correlación evidente. El GAM aplicado tampoco halló ninguna correlación, por lo tanto no se probó la introducción de ninguna covariable en NONMEM y el modelo seleccionado fue el modelo final sin covariables.

Puesto que el análisis simultáneo de DZ y DMDZ daba lugar a estimados para DMDZ que no se corresponden con los observados tras la administración de si mismo, no se presentan gráficas de bondad de ajuste para este modelo simultáneo porque no lo consideramos mejor que el modelo en el que se fijan los estimados bayesianos individuales de DMDZ.

**Tabla 28:** Desarrollo del modelo farmacodinámico simultáneo de DZ y DMDZ tras administrar 30 mg de DZ y 30 mg de DMDZ.

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL Aditivo relativo beta (%) EER (%)
¿Un modelo de interacción aditiva con efecto lineal para DZ y efecto máximo reparametrizado para DMDZ predice el efecto observado?	1	Efecto lineal; DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $SLP = TVSLP * e^{n_{SLP}}$ $E_{maxM} = TVE_{maxM}$ $S_{0M} = TVS_0 * e^{n_{S0}}$ Modelo de interacción aditiva EFF=EFFDZ+EFFDMDZ METHOD = FOCE	3473	$E_0 = 19.6 (8.0)$ $SLP = 0.0124 (13.5)$ $E_{maxM} = 22.2 (12)$ $S_{0M} = 0.033 (32)$	31.1 (23.9) 44.7 (33.5) NE 107 (70.7)	5.31 (12)
¿El efecto observado se ajusta mejor a un modelo de interacción aditivo con efecto máximo para DZ y efecto máximo reparametrizado para DMDZ?	2	Efecto máximo; DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{n_{EmaxF}}$ $EC_{50F} = TVEC_{50F} * e^{n_{C50F}}$ $E_{maxM} = TVE_{maxM}$ $S_{0M} = TVS_0 * e^{n_{S0}}$ Modelo de interacción aditiva EFF=EFFDZ+EFFDMDZ METHOD = FOCE	3461	$E_0 = 19.1 (NC)$ $E_{maxF} = 49.3 (NC)$ $EC_{50F} = 2680 (NC)$ $E_{maxM} = 25.8 (NC)$ $S_{0M} = 0.03 (NC)$	31.6 (NC) 41.9 (NC) 0.25 (NC) NE 92.7(NC)	5.27 (NC)
¿El efecto observado se ajusta mejor a un modelo de interacción aditivo con efecto lineal para DZ y para DMDZ??	3	Efecto lineal; DZ Efecto lineal; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $SLP_F = TVSLP_F * e^{n_{SLPF}}$ $SLP_M = TVSLP_M * e^{n_{SLPM}}$ Modelo de interacción aditiva EFF=EFFDZ+EFFDMDZ METHOD = FOCE	3502	$E_0 = 19.8 (8.2)$ $SLP_F = 0.013 (12)$ $SLP_M = 0.015 (18.3)$	31.6 (21.7) 43.1(30.5) 48.8 (95.8)	4.8 (12.5)
¿Mejora la predicción un modelo de interacción (de antagonismo competitivo) entre DZ y DMDZ?	4	Efecto máximo reparametrizado;DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{n_{EmaxF}}$ $E_{maxM} = TVE_{maxM}$ $S_{0M} = TVS_{0M} * e^{n_{S0M}}$ $S_{0F} = TVS_{0F}$ Modelo de interacción competitiva $E = E_0 + ((E_{maxF} * (CP_F / EC_{50F}) + E_{maxM} * (CP_M / EC_{50M})) / (1 + (CP_F / EC_{50F}) + (CP_M / EC_{50M})))$ METHOD = FOCE	3388	$E_0 = 18.2 (8.5)$ $E_{maxF} = 42 (35)$ $E_{maxM} = 13.7 (9.9)$ $S_{0M} = 0.31 (80.6)$ $S_{0F} = 0.039 (18)$	10.8 (35.7) 117 (41.5) NE 270 (51) NE	5 (11.92)

HIPÓTESIS	MODELO	ESTRUCTURA	OBJ	PARÁMETROS (EER %)	VII (CV%) (EER %)	ERROR RESIDUAL
						Aditivo relativo beta (%) EER (%)
¿En el modelo de interacción aditiva, es necesario reparametrizar el efecto máximo de DZ además de en DMDZ?	5	Efecto máximo reparametrizado; DZ Efecto máximo reparametrizado; DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $E_{maxF} = TVE_{maxF} * e^{n_{EmaxF}}$ $E_{maxM} = TVE_{maxM}$ $S_{0F} = TVS_{0F}$ $S_{0M} = TVS_{0M} * e^{n_{S0M}}$ Modelo de interacción aditiva EFF=EFFDZ+EFFDMDZ	3437	$VIO_{E0}$ $E_0 = 18.8 (8.2)$ $E_{maxF} = 33.5 (28.9)$ $E_{maxM} = 25.5 (25.3)$ $S_{0F} = 0.029 (16.4)$ $S_{0M} = 0.029 (27.3)$	12.2 (63.6) 30.9 (23.9) 102 (38.1) NE NE 84.8 (78.5)	5.03 (13.5)
¿Es necesario incorporar VIO en E0 al modelo 1?	6	=Run 1 con VIO en E0 $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $SLP = TVSLP * e^{n_{SLP}}$ $E_{maxM} = TVE_{maxM}$ $S_{0M} = TVS_0 * e^{n_{S0}}$ Modelo aditivo EFF=EFFDZ+EFFDMDZ	3445	$VIO_{E0}$ $E_0 = 19.4 (8.04)$ $SLP = 0.0123 (14.95)$ $E_{maxM} = 19.6 (17.95)$ $S_{0M} = 0.04 (35.1)$	11.9 (51.3) 29.35 (25.6) 47.7 (31.1) NE 112.7 (66.9)	5.1 (14.8)
¿Es necesario incorporar un error residual para cada analito?	7	=Run 6 con error residual Distinto para DZ y DMDZ $E_0 = TVE_0 * e^{n_{E0}}$ $SLP = TVSLP * e^{n_{SLP}}$ $E_{maxM} = TVE_{maxM}$ $S_{0M} = TVS_{0M} * e^{n_{S0M}}$ Modelo aditivo EFF=EFFDZ+EFFDMDZ	3440	$VIO_{E0}$ $E_0 = 19.4 (7.98)$ $SLP = 0.0123 (15.36)$ $E_{maxM} = 19.6 (19.38)$ $S_{0M} = 0.04 (36.4)$	11.7 (54) 29.2 (24.8) 47.4 (32.4) NE 114.4 (69)	: DZ: 4.6 (16.3) DMDZ: 5.29 (15.8)

E<sub>0</sub>: Valor basal, E<sub>maxF</sub>: Efecto máximo del fármaco, E<sub>maxM</sub>: Efecto máximo, EC<sub>50F</sub>: concentración de fármaco a la que se observa la mitad del efecto máximo, S<sub>0</sub> = E<sub>max</sub>/EC<sub>50</sub>, SLP: pendiente, EFF: efecto observado. EFFDZ: efecto producido por DZ y EFFDMDZ efecto producido por DMDZ. Los subíndices F y M corresponden a fármaco y metabolito respectivamente. NC: no converge.

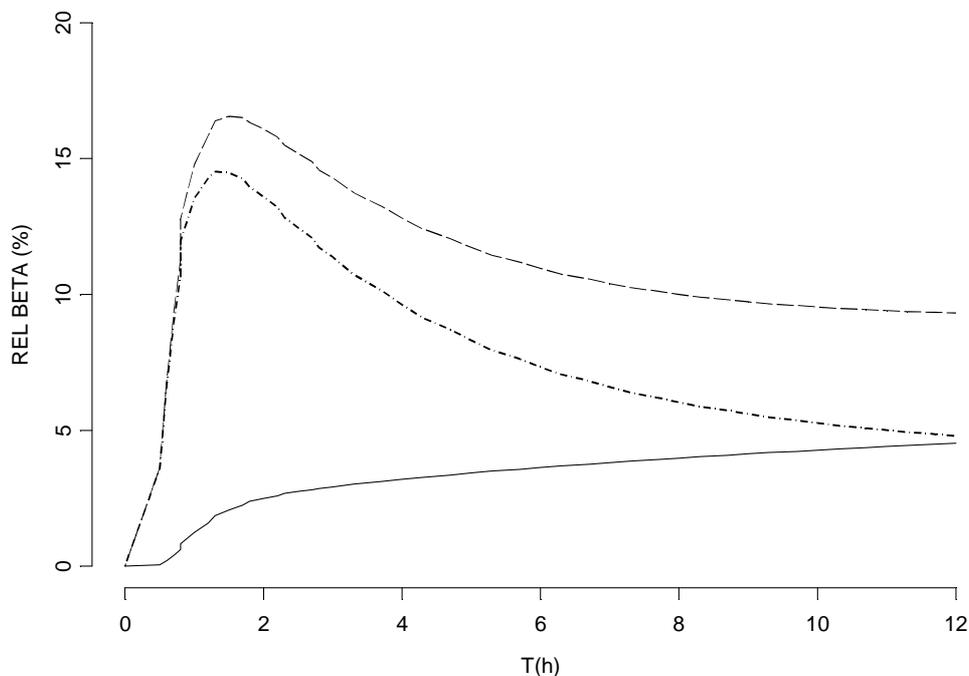
### 3.3.- SIMULACIONES

#### 3.3.1.- Contribución del DMDZ en el efecto observado tras administrar una dosis de 30 mg de DZ

La simulación a partir del modelo seleccionado (tabla 26) del efecto producido tras 30 mg de DZ hasta +12 h, se observa en la Figura 64. A partir de estos valores medios se calculó el AUC del efecto global predicho por el modelo y el AUC del efecto predicho por el modelo para fármaco y metabolito (ver tabla 29). Como vemos en la tabla 29, el DMDZ contribuye en un 29.7% al efecto total observado.

**Tabla 29:** Porcentaje de efecto debido a DZ y DMDZ a partir del modelo final de DZ + DMDZ

Parámetro	DZ	DMDZ	TOTAL (DZ+DMDZ)
Poder relativo beta	5603.3	2376.2	7979.5
Media AUC (%/min)			
% efecto respecto efecto total	70.22	29.7	100

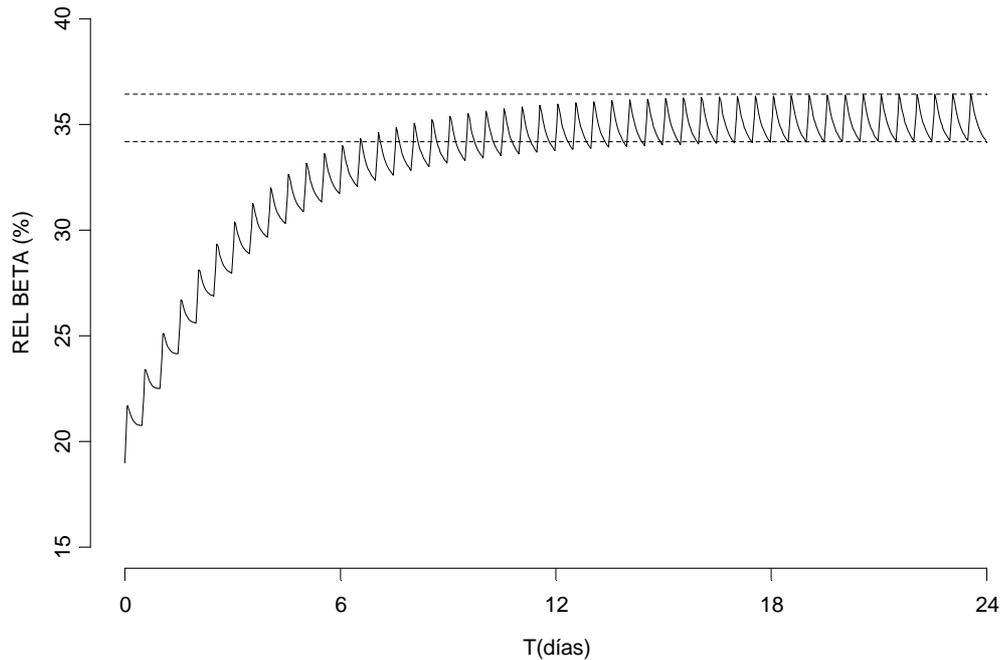


**Figura 64:** Simulación del poder relativo beta obtenido tras administración oral de 30 mg de DZ, utilizando los parámetros del modelo final seleccionado (modelo 5 tabla 25), hasta las 12 h. La línea discontinua representa el efecto total una vez restado el valor basal, la línea continua representa el efecto debido a DMDZ y la línea punteada el efecto debido a DZ.

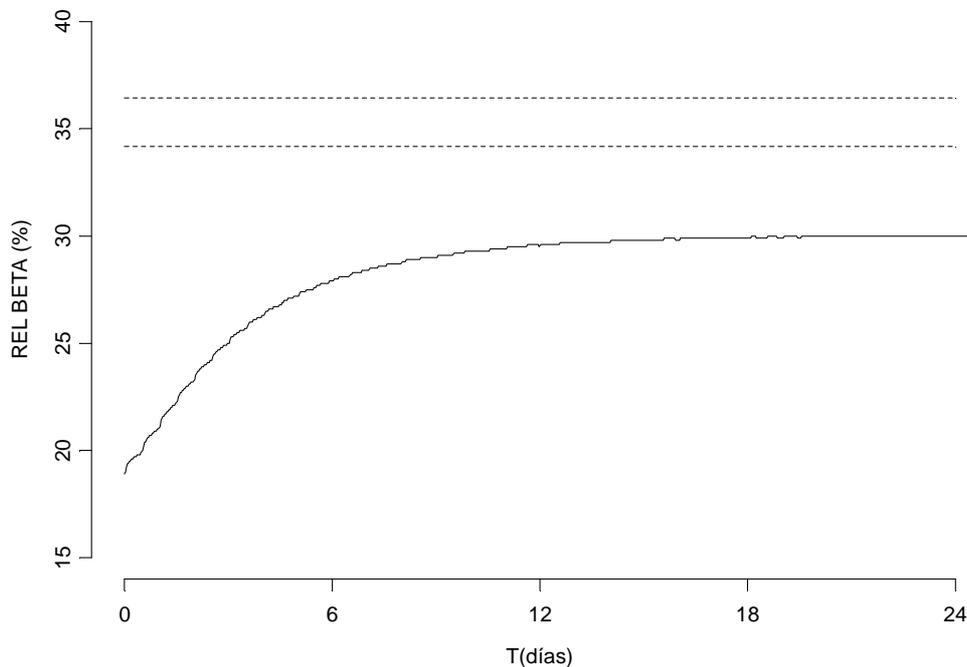
### 3.3.2.- Efecto predicho por el modelo sobre el EEG en el estado de equilibrio estacionario tras administrar dosis clínicas de DZ (5 mg/12h) y contribución de DMDZ en dicho efecto

La simulación del efecto producido tras 5 mg de DZ cada 12 h se observa en la Figura 65. Como se puede apreciar, tras aproximadamente 15 días de tratamiento con dicho intervalo posológico, se ha alcanzado el estado de equilibrio estacionario en el efecto sobre el EEG, en el que se predice un efecto de un incremento de un 26% en la variable poder relativo beta sobre el valor basal.

Además como se puede observar en la figura 66, el DMDZ sería responsable de un 66.6% del efecto observado en el estado de equilibrio estacionario.



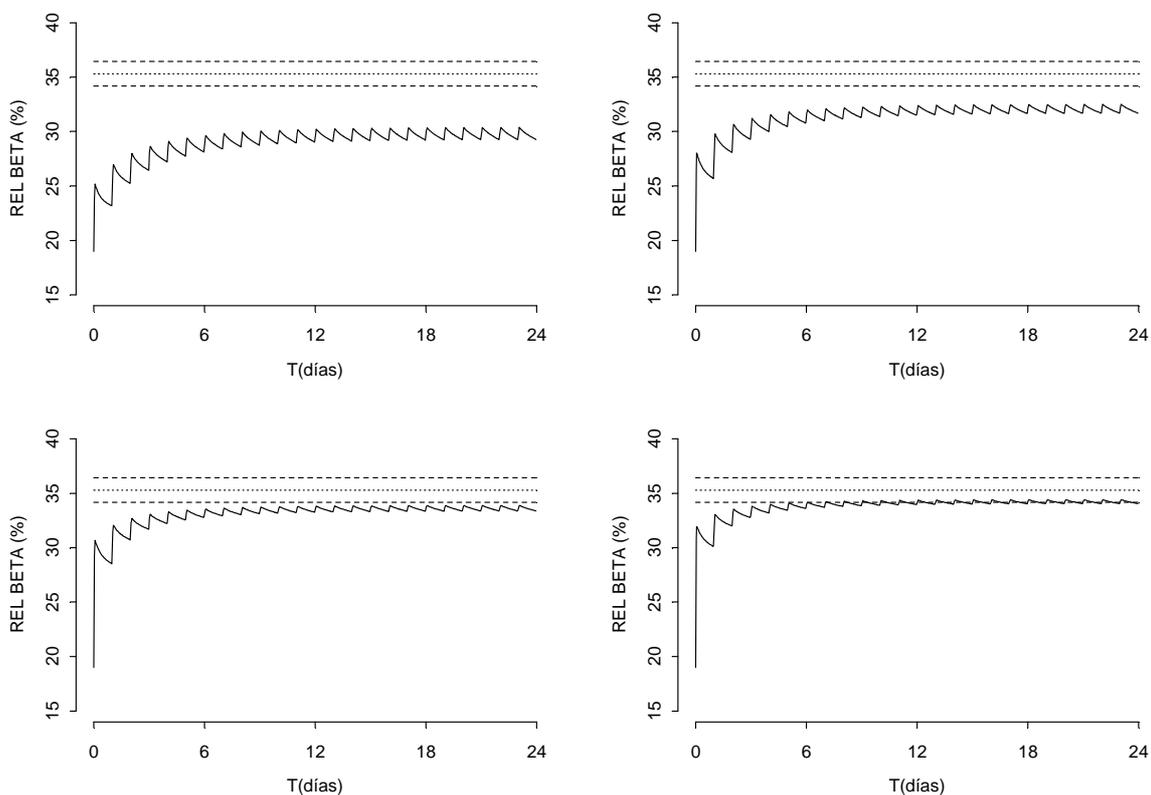
**Figura 65:** Simulación del poder relativo beta obtenido tras administración oral de 5 mg de DZ cada 12 h, utilizando los parámetros del modelo final seleccionado (modelo 5 tabla 25) durante 24 días de tratamiento. La línea continua representa el efecto simulado y las líneas discontinuas se corresponden con el efecto máximo y mínimo simulado en el estado de equilibrio estacionario.



**Figura 66:** Simulación del poder relativo beta obtenido tras 5 mg de DZ cada 12 h, debido solo al DMDZ formado, utilizando los parámetros del modelo FC final seleccionado (DZ+DMDZ) y del modelo FD final seleccionado (tras 30 mg de DMDZ) durante 24 días de tratamiento. La línea continua representa el efecto simulado, las líneas discontinuas se corresponden con el efecto máximo y mínimo en el estado de equilibrio estacionario obtenido tras 5 mg de DZ cada 12 h.

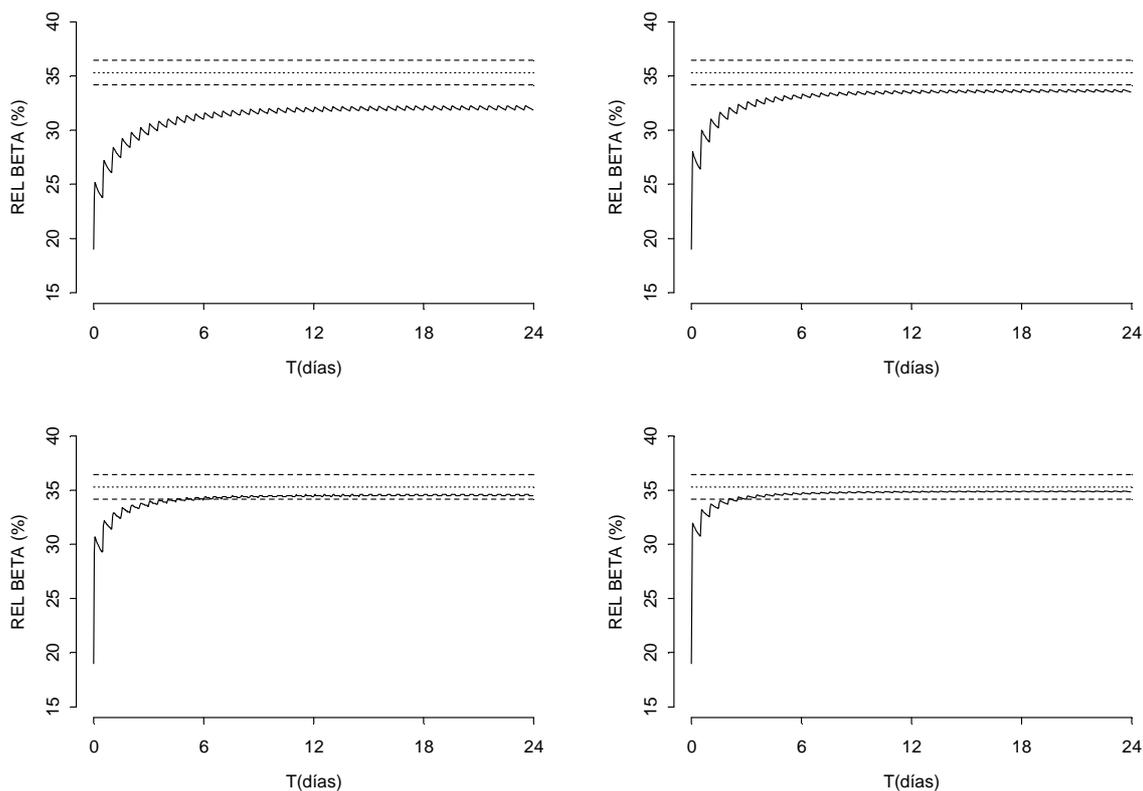
### 3.3.3.- Búsqueda de dosis de DMDZ equivalente a 5 mg/12 h de DZ

Tras simular el efecto que se obtendría en el estado de equilibrio estacionario tras administrar dosis únicas diarias de 5, 10, 20 y 30 mg de DMDZ (Figura 67) se observó que ninguna de las 4 dosis llegaba al efecto obtenido tras la dosis de DZ utilizada en la práctica clínica habitual (5 mg de DZ cada 12 horas), ver Figura 65 para comparar.



**Figura 67:** Simulación del poder relativo beta obtenido tras administración oral de 5 mg de DMDZ, (cuadrante superior izquierdo), 10 mg de DMDZ (cuadrante superior derecho), 20 mg de DMDZ (cuadrante inferior izquierdo) y 30 mg de DMDZ (cuadrante inferior derecho) cada 24 h, utilizando los parámetros del modelo final seleccionado (modelo 5 tabla 25) durante 24 días de tratamiento. La línea continua representa el efecto simulado, las líneas discontinuas se corresponden con el efecto máximo y mínimo y la línea punteada se corresponde con el promedio del efecto en estado de equilibrio estacionario simulado tras la administración de 5 mg de DZ cada 12 horas durante 24 días.

Tras simular 48 dosis de 5, 10, 20 y 30 mg de DMDZ (1 dosis cada 12 h), se observó que la dosis de 30 mg de DMDZ cada 12 horas (Figura 68, cuadrante inferior derecho) constituía la dosis equivalente a 5 mg de DZ cada 12 horas (ver Figura 65).



**Figura 68:** Simulación del poder relativo beta obtenido tras administración oral de 5 mg de DMDZ, (cuadrante superior izquierdo), 10 mg de DMDZ (cuadrante superior derecho), 20 mg de DMDZ (cuadrante inferior izquierdo) y 30 mg de DMDZ (cuadrante inferior derecho) cada 12 h, utilizando los parámetros del modelo final seleccionado (modelo 5 tabla 25) durante 24 días de tratamiento. La línea continua representa el efecto simulado, las líneas discontinuas se corresponden con el efecto máximo y mínimo y la línea punteada se corresponde con el promedio del efecto en estado de equilibrio estacionario simulado tras la administración de 5 mg de DZ cada 12 horas durante 24 días.

Como se aprecia en la figura 68, panel inferior derecho, aproximadamente a partir del día 5, el efecto observado tras DMDZ estaría dentro de los valores máximos y mínimos del efecto simulado en estado de equilibrio estacionario tras administrar dosis terapéuticas de diazepam. Este período es aproximadamente la tercera parte del tiempo necesario para alcanzar dicho efecto cuando se administra el fármaco. Es de destacar, sin embargo, que tras la administración del metabolito no se llegaría al alcanzar el efecto máximo capaz de producir la administración de diazepam, aunque si se alcanzarían los niveles terapéuticos.

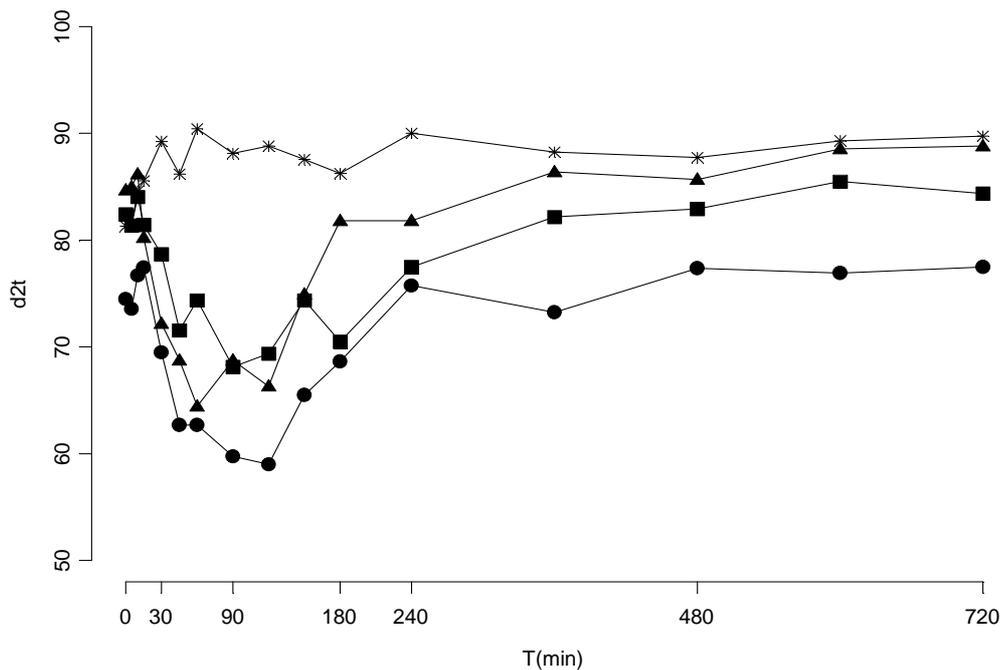
## 4.- EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO PSICOMOTOR Y VAS

### 4.1.- Rendimiento Psicomotor (Test de cancelación d2)

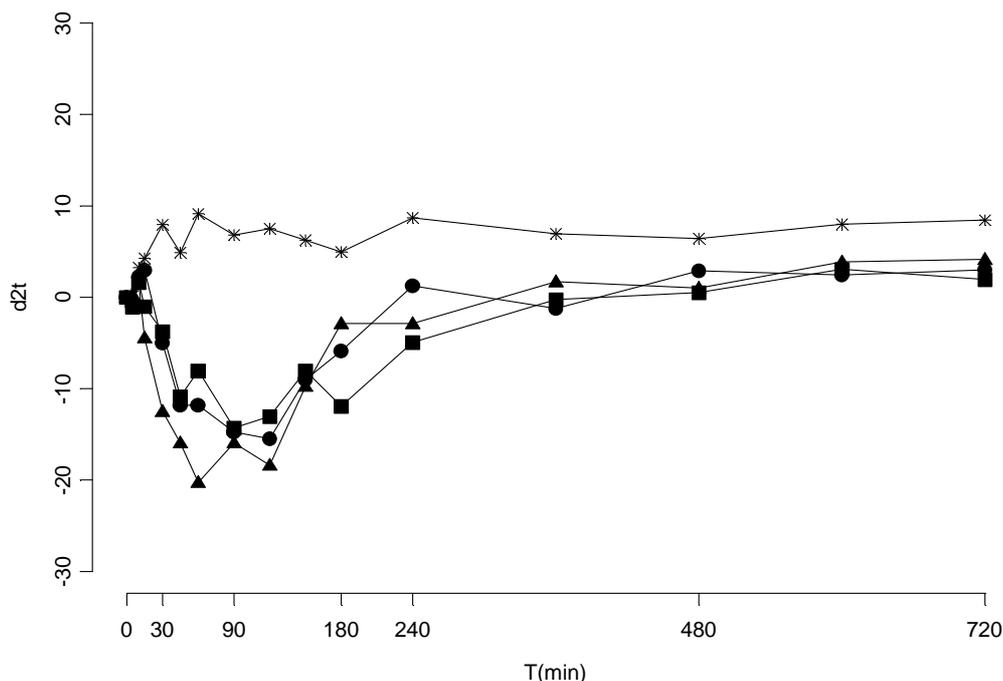
A partir de este test, se analizaron las variables d2c y d2t, que son el número de respuestas correctas y el número de respuestas totales respectivamente.

#### 4.1.1.- d2t

En la Figura 69 se representa el curso temporal de la variable d2t. Observamos que tras placebo, se produce un ligero incremento en el número de respuestas correctas a lo largo de las 12 horas de registro. Por el contrario, se observa un marcado efecto, traducido como un menor número de respuestas correctas para los 3 tratamientos activos. En general, con los 3 tratamientos el mayor pico de efecto fue entre los 90 minutos y las 2 h.



**Figura 69:** Curso temporal del efecto d2t promedio tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).



**Figura 70:** Curso temporal del efecto d2t promedio expresado respecto del valor basal, tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

#### 4.1.1.2.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.022$ ) entre los 4 tratamientos en condiciones basales. Al comparar dos a dos los valores basales de los cuatro tratamientos se vieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores observados para DZ1 y los observados con el resto de los tratamientos incluido placebo, como se resume en la siguiente tabla:

**Tabla 30:** Media de los valores basales obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos para la variable d2t.

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
Media Valores basales d2t $\pm$ DE	81.31 $\pm$ 14.0	74.52 $\pm$ 10.9	84.69 $\pm$ 14.1	82.43 $\pm$ 12.5
Placebo	-	<b>p=0.047</b>	p=0.104	p=0.761
DZ1	-	-	<b>p=0.002</b>	<b>p=0.036</b>
DZ2	-	-	-	p=0.525

#### 4.1.1.3.- Efecto global de los tratamientos

Seguidamente, se aplicó a los datos directos una estadística multivariante en la que se compararon todos los tratamientos y todos los tiempos, encontrándose diferencias

estadísticamente significativas para el factor tiempo ( $p < 0.001$ ), para el factor tratamiento ( $p < 0.001$ ) y para la interacción tiempo x tratamiento ( $p < 0.001$ ).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas al valor de AUC calculado empleando el valor resultante de restar el valor basal a los datos directos, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los 4 tratamientos. La posterior aplicación de un test de t de Student pareado, mostró que la administración de los diferentes tratamientos activos supuso un descenso significativo del valor de AUC con respecto al placebo, no hallándose diferencias estadísticamente significativas al comparar entre tratamientos activos. (Tabla 31).

**Tabla 31:** Media y desviación estándar de los parámetros de tolerabilidad obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos para la variable d2t.

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Media AUC (n°*min) ± DE</b>	5149.06 ± 4554.7	-1144.22 ± 4578.5	-1592.50 ± 3820.23	-1938.90 ± 4961.6
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.737	p=0.611
DZ2	-	-	-	p=0.845
<b>Media E<sub>max</sub> (n°) ± DE</b>	-3.00 ± 6.05	-23.75 ± 12.5	-31.68 ± 14.4	-21.12 ± 14.7
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	<b>p=0.047</b>	p=0.496
DZ2	-	-	-	p=0.053
<b>Mediana t<sub>max</sub> (min)* [min-máx.]</b>	15 [5-720]	105 [15-720]	75 [30-150]	90 [45-180]
Placebo	-	p=0.352	p=0.796	p=0.280
DZ1	-	-	p=0.058	p=0.408
DZ2	-	-	-	p=0.067

Los valores son la media aritmética ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetro expresado como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon (t<sub>max</sub>). t<sub>max</sub>, tiempo al cual aparece el efecto máximo (E<sub>max</sub>); AUC, área bajo la curva del efecto.

Aplicando una ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los 4 tratamientos para el E<sub>max</sub> (Tabla 31). La comparación por pares indicó que todos los tratamientos producían un mayor descenso del número máximo de d2t que placebo. Además, DZ2 produjo un mayor descenso de E<sub>max</sub> comparado con DZ1 y DMDZ (con tendencia a la significación estadística).

Al aplicar el test de Friedman de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.096$ ) entre los 4 tratamientos para el t<sub>max</sub>. El posterior test de Wilcoxon para datos pareados, no mostró diferencias estadísticamente significativas en el valor de este parámetro (Tabla 31).

#### 4.1.1.4.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para evaluar si existían diferencias entre los 16 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los 4 tratamientos ( $p < 0.001$ ). Como observamos en la Tabla 32, la administración de los 3 tratamientos activos supuso descensos en el número de respuestas d2t con respecto al valor basal entre aproximadamente los 30 minutos y las 2.5 horas. Con el placebo por el contrario, los ligeros incrementos en el número de respuestas aparecieron tras 30 minutos y se mantuvieron a lo largo de todo el día experimental.

**Tabla 32:** Comparación de los valores medios de la variable d2t, antes (basal) y tras la administración de los diferentes tratamientos a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 5 min	81.3 vs 81.4	0.938	74.5 vs 73.6	0.449	84.7 vs 85.0	0.845	82.4 vs 81.4	0.460
0 vs 10 min	81.3 vs 84.6	0.063	74.5 vs 76.7	0.246	84.7 vs 86.2	0.468	82.4 vs 84.1	0.256
0 vs 15 min	81.3 vs 85.6	0.082	74.5 vs 77.4	0.266	84.7 vs 80.2	0.121	82.4 vs 81.4	0.700
0 vs 30 min	81.3 vs 89.2	<b>&lt;0.001</b>	74.5 vs 69.5	<b>0.037</b>	84.7 vs 72.2	<b>0.020</b>	82.4 vs 78.7	0.238
0 vs 45 min	81.3 vs 86.2	<b>0.012</b>	74.5 vs 62.7	<b>&lt;0.001</b>	84.7 vs 68.7	<b>&lt;0.001</b>	82.4 vs 71.6	<b>0.003</b>
0 vs 1 h	81.3 vs 90.4	<b>&lt;0.001</b>	74.5 vs 62.7	<b>0.002</b>	84.7 vs 64.4	<b>&lt;0.001</b>	82.4 vs 74.4	<b>0.024</b>
0 vs 1.5 h	81.3 vs 88.1	<b>&lt;0.001</b>	74.5 vs 59.7	<b>0.003</b>	84.7 vs 68.7	<b>&lt;0.001</b>	82.4 vs 68.1	<b>0.005</b>
0 vs 2 h	81.3 vs 88.8	<b>0.001</b>	74.5 vs 59.0	<b>0.001</b>	84.7 vs 66.3	<b>&lt;0.001</b>	82.4 vs 69.4	<b>0.002</b>
0 vs 2.5 h	81.3 vs 87.6	<b>0.003</b>	74.5 vs 65.5	<b>0.009</b>	84.7 vs 74.9	<b>&lt;0.001</b>	82.4 vs 74.4	<b>0.016</b>
0 vs 3 h	81.3 vs 86.2	<b>0.024</b>	74.5 vs 68.6	0.073	84.7 vs 81.8	0.152	82.4 vs 70.5	<b>0.003</b>
0 vs 4 h	81.3 vs 90.0	<b>&lt;0.001</b>	74.5 vs 75.7	0.530	84.7 vs 81.8	0.240	82.4 vs 77.5	0.088
0 vs 6 h	81.3 vs 88.2	<b>0.001</b>	74.5 vs 73.2	0.525	84.7 vs 86.4	0.229	82.4 vs 82.2	0.902
0 vs 8 h	81.3 vs 87.7	<b>0.001</b>	74.5 vs 77.4	<b>0.033</b>	84.7 vs 85.7	0.618	82.4 vs 82.9	0.746
0 vs 10 h	81.3 vs 89.3	<b>0.002</b>	74.5 vs 76.9	0.216	84.7 vs 88.6	0.090	82.4 vs 85.5	0.460
0 vs 12 h	81.3 vs 89.7	<b>0.001</b>	74.5 vs 77.5	0.251	84.7 vs 88.8	0.021	82.4 vs 84.4	0.256

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo a los valores corregidos por su valor basal, y se hallaron diferencias estadísticamente significativas para todos los tiempos evaluados entre los 30 min y las 6 h post-tratamiento. Todos los tratamientos activos fueron diferentes de placebo entre 30 min y 8 h, pero no se encontraron diferencias entre tratamientos activos (Tabla 33).

**Tabla 33:** Comparación de los valores medios de la variable d2t para cada uno de los tratamientos en los diferentes puntos temporales una vez sustraído el valor basal correspondiente.

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	p Placebo-DMDZ	p DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
5 min	0.12	-1.75	1.12	-1.06	0.409	0.665	0.629	0.115	0.729	0.223
10 min	3.25	1.93	1.75	1.62	0.521	0.573	0.435	0.940	0.894	0.954
15 min	4.25	0.25	1.75	-1.0	0.183	0.176	0.184	0.687	0.726	0.874
30 min	7.93	-5.93	-11.56	-3.75	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	0.295	0.524	0.157
45 min	4.87	-12.93	-14.81	-10.87	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	0.664	0.606	0.363
1 h	9.12	-12.50	-19.56	-8.06	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	0.048	0.326	0.021
1.5 h	6.81	-16.37	-14.31	-14.31	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.631	0.685	>0.99
2 h	7.5	-15.31	-18.56	-13.06	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.448	0.552	0.285
2.5 h	6.25	-9.06	-9.68	-8.06	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	0.842	0.743	0.578
3 h	4.93	-5.50	-3.25	-11.94	<b>0.004</b>	<b>0.005</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.543	0.077	0.032
4 h	8.68	1.75	-3.37	-4.94	<b>0.006</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	0.061	0.029	0.698
6 h	6.93	-0.56	1.0	-0.25	<b>0.002</b>	<b>0.019</b>	<b>0.011</b>	0.515	0.918	0.639
8 h	6.43	2.81	1.06	0.50	<b>0.007</b>	<b>0.047</b>	<b>0.015</b>	0.432	0.233	0.837
10 h	8.00	2.43	3.87	3.03	<b>0.018</b>	0.146	0.055	0.627	0.823	0.762
12 h	8.43	2.75	4.37	1.93	0.074	0.218	<b>0.005</b>	0.509	0.804	0.414

**4.1.1.5.- Reproducibilidad del efecto observado**

El efecto de DZ sobre la variable d2t fue reproducible, ya que en la comparación de los valores de esta variable corregidos por el valor basal mediante coeficiente de correlación intraclase (CCI) para todos los voluntarios y tiempos conjuntamente, se obtuvo un CCI de 0.50 con un valor de  $p < 0.001$ . Posteriormente se realizaron 16 CCI, uno por voluntario y como se muestra en la Tabla 34, el efecto fue reproducible para 13 de los 16 voluntarios, ya que se obtuvieron CCI entre 0.51 y 0.73 con valores de  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 34:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 16 individuos.

VOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCI	0.73	0.66	0.25	0.51	0.72	0.73	0.73	0.42	0.65	0.53	0.55	0.25	0.61	0.37	0.65	0.73
p	*	*	0.146	*	*	*	*	*	*	*	*	0.148	*	0.057	*	*

\*,  $p \leq 0.05$

Sin embargo, cuando se evaluó la reproducibilidad del efecto de los tratamientos en cada punto temporal, el efecto tras ambas administraciones de 30 mg de DZ únicamente fue reproducible a los 60 min post-administración del fármaco ( $p = 0.01$ ).

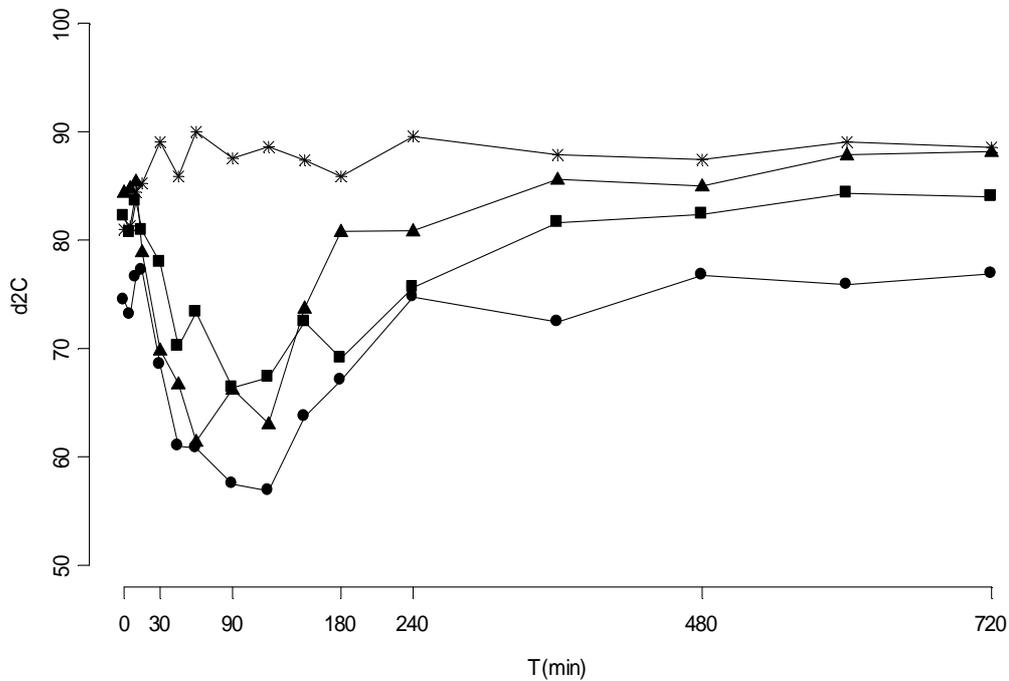
**Tabla 35:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los tiempos.

Tiempo	5'	10'	15'	30'	45'	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
CCI	0.13	0.19	-0.49	0.01	-0.19	0.56	0.24	0.28	0.36	0.01	0.24	0.08	0.13	-0.03	0.34
p	0.30	0.23	0.98	0.36	0.77	*	0.18	0.14	0.78	0.49	0.17	0.38	0.31	0.54	0.09

\*, p≤0.05

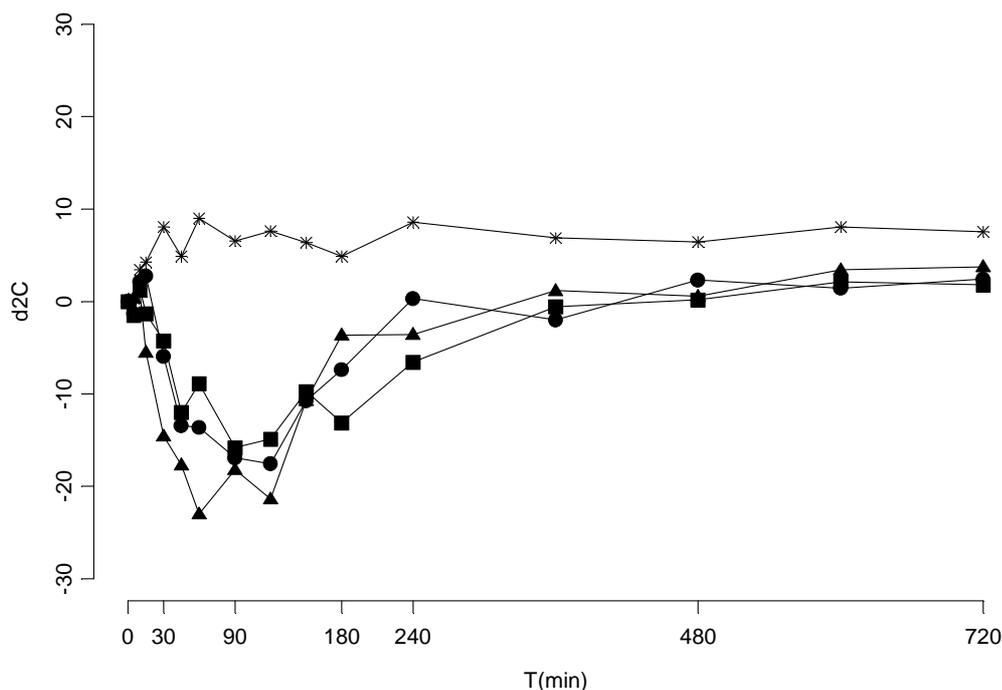
### 4.1.2- d2c

La gráfica del curso temporal de los datos directos (Figura 71) y la correspondiente a la representación de los valores como diferencia respecto del valor basal (Figura 72) reflejaron el mismo perfil que el observado para la variable d2t y una intensidad similar.



**Figura 71:** Curso temporal del efecto d2c promedio tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

Al expresar los resultados como diferencia respecto del valor basal, las gráficas del curso temporal (Figura 72) reflejaron igualmente un marcado efecto entre 30 min y 240 min para los 3 tratamientos activos.



**Figura 72:** Curso temporal del efecto d2c promedio expresado respecto del valor en basal tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

**4.1.2.1.- Evaluación de la situación basal**

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró que en condiciones basales, había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.028$ ) entre los 4 tratamientos. Seguidamente se aplicó un test de t de Student a los datos directos de los valores basales de todos los posibles pares de tratamientos que mostró un menor valor de efecto basal (estadísticamente significativo) de la primera administración de DZ con respecto a los valores previos a la segunda administración de DZ y a la de DMDZ y una tendencia a dicha diferencia con respecto a placebo (Tabla 36).

**Tabla 36:** Media de los valores basales obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos para la variable d2c.

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
Media Valores basales d2c ± DE	81.00 ± 14.0	74.44 ± 10.9	84.44 ± 14.3	82.18 ± 12.6
Placebo	-	$p=0.058$	$p=0.098$	$p=0.749$
DZ1	-	-	<b><math>p=0.002</math></b>	<b><math>p=0.042</math></b>
DZ2	-	-	-	$p=0.537$

#### 4.1.2.2.- Efecto global de los tratamientos

Tras aplicar la estadística multivariante a los valores directos obtenidos tras placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ se hallaron diferencias estadísticamente significativas para el factor tiempo ( $p < 0.001$ ), para el factor tratamiento ( $p < 0.001$ ) y para la interacción tiempo x tratamiento ( $p < 0.001$ ).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas al AUC calculado a partir de los datos directos, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los 4 tratamientos para esta variable. La posterior aplicación de un test de t de Student pareado, mostró que la administración de los diferentes tratamientos activos supuso un descenso significativo del valor de AUC con respecto al placebo, no hallándose diferencias estadísticamente significativas al comparar entre tratamientos activos (Tabla 37).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre los 4 tratamientos para el  $E_{max}$ . Al aplicar un test de t de Student pareado, hallamos valores de  $E_{max}$  inferiores de manera estadísticamente significativa en los diferentes tratamientos activos con respecto al placebo. Además, todos los tratamientos fueron diferentes entre sí (Tabla 37). El mayor  $E_{max}$  medio observado para DZ2 con respecto a D1 puede ser debido a la presencia de un individuo que tuvo grandes diferencias en dicho valor entre ambas administraciones llegando a tener un  $E_{max}$  tras la segunda administración de -71%. Esta diferencia en el efecto desapareció al eliminar este sujeto de los análisis (datos no mostrados).

Al aplicar un test de Friedman de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.119$ ) entre los 4 tratamientos para el  $t_{max}$ . Sin embargo, el posterior test de Wilcoxon halló diferencias estadísticamente significativas puntuales entre las dos administraciones de DZ, con un incremento en el  $t_{max}$  tras DZ1 con respecto a DZ2.

**Tabla 37:** Descriptivos de los parámetros farmacodinámicos obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos para la variable d2c.

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Media AUC (n°*min) ± DE</b>	5083.43 ± 4332.4	-1870.62 ± 4616.9	-2193.12 ± 3919.8	-2532.8 ± 5353.6
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.812	p=0.678
DZ2	-	-	-	p=0.858
<b>Media <math>E_{max}</math> (n°) ± DE</b>	-3.06 ± 5.0	-26.00 ± 14.0	-35.00 ± 14.0	-22.00 ± 15.0
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	<b>p=0.029</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ2	-	-	-	<b>p=0.022</b>

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Mediana t<sub>max</sub> (min)* [mín-máx.]</b>	15 [5-720]	105 [15-720]	60 [30-120]	90 [30-180]
Placebo	-	p=0.352	p=0.917	p=0.426
DZ1	-	-	<b>p=0.033</b>	p=0.195
DZ2	-	-	-	p=0.295

Los valores son el promedio ± desviación estándar (DE) excepto cuando se indica. (\*) parámetro expresado como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon (t<sub>max</sub>). t<sub>max</sub>, tiempo al cual aparece el efecto máximo (E<sub>max</sub>); AUC, área bajo la curva del efecto vs tiempo.

**4.1.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto**

Para evaluar si existían diferencias entre los 16 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los 4 tratamientos (p<0.001).

Como se observa en la Tabla 38, tras la administración de placebo se produjo un incremento en el número de respuestas correctas (d2c) de manera estadísticamente significativa con respecto a la situación basal en todos los tiempos excepto al minuto 15 (donde existe una tendencia a la significación). Por el contrario la administración de los 3 tratamientos activos supuso descensos estadísticamente significativos del número de respuestas correctas entre aproximadamente el minuto 30 y las 3 h después de la administración de la medicación.

**Tabla 38:** Comparación de los valores medios de d2c, antes (tiempo=0) y tras la administración de los diferentes tratamientos a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 5 min	81.0 vs 81.3	0.842	74.4 vs 73.1	0.302	84.4 vs 84.8	0.817	82.2 vs 80.7	0.306
0 vs 10 min	81.0 vs 84.4	<b>0.048</b>	74.4 vs 76.6	0.256	84.4 vs 85.4	0.639	82.2 vs 83.6	0.339
0 vs 15 min	81.0 vs 85.2	0.071	74.4 vs 77.2	0.299	84.4 vs 78.9	0.078	82.2 vs 80.9	0.617
0 vs 30 min	81.0 vs 89.1	<b>&lt;0.001</b>	74.4 vs 68.5	<b>0.018</b>	84.4 vs 69.9	<b>0.014</b>	82.2 vs 77.9	0.216
0 vs 45 min	81.0 vs 85.9	<b>0.010</b>	74.4 vs 61.0	<b>&lt;0.001</b>	84.4 vs 66.7	<b>&lt;0.001</b>	82.2 vs 70.2	<b>0.002</b>
0 vs 1 h	81.0 vs 90.0	<b>&lt;0.001</b>	74.4 vs 60.8	<b>0.002</b>	84.4 vs 61.4	<b>&lt;0.001</b>	82.2 vs 73.3	<b>0.018</b>
0 vs 1.5 h	81.0 vs 87.6	<b>&lt;0.001</b>	74.4 vs 57.5	<b>0.002</b>	84.4 vs 66.2	<b>&lt;0.001</b>	82.2 vs 66.4	<b>0.004</b>
0 vs 2 h	81.0 vs 88.6	<b>0.001</b>	74.4 vs 56.9	<b>&lt;0.001</b>	84.4 vs 63.0	<b>&lt;0.001</b>	82.2 vs 67.3	<b>0.001</b>
0 vs 2.5 h	81.0 vs 87.4	<b>0.002</b>	74.4 vs 63.7	<b>0.004</b>	84.4 vs 73.7	<b>&lt;0.001</b>	82.2 vs 72.4	<b>0.008</b>
0 vs 3 h	81.0 vs 85.9	<b>0.025</b>	74.4 vs 67.1	<b>0.045</b>	84.4 vs 80.8	0.082	82.2 vs 69.1	<b>0.003</b>
0 vs 4 h	81.0 vs 89.6	<b>&lt;0.001</b>	74.4 vs 74.7	0.878	84.4 vs 80.9	0.154	82.2 vs 75.6	0.052
0 vs 6 h	81.0 vs 87.9	<b>0.001</b>	74.4 vs 72.4	0.320	84.4 vs 85.6	0.411	82.2 vs 81.6	0.784
0 vs 8 h	81.0 vs 87.4	<b>0.001</b>	74.4 vs 76.7	0.065	84.4 vs 85.0	0.785	82.2 vs 82.4	0.908

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 10 h	81.0 vs 89.1	<b>0.002</b>	74.4 vs 75.9	0.456	84.4 vs 87.9	0.140	82.2 vs 84.3	0.243
0 vs 12 h	81.0 vs 88.6	<b>0.002</b>	74.4 vs 76.9	0.355	84.4 vs 88.2	0.039	82.2 vs 84.0	0.334

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo a los valores corregidos por su valor basal, se observó una disminución en el número de respuestas canceladas correctamente en los 3 tratamientos activos respecto placebo, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos activos (Tabla 39).

**Tabla 39:** Comparación de los valores medios de d2c para cada uno de los tratamientos en los diferentes puntos temporales una vez sustraído el valor basal correspondiente.

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	p Placebo-DMDZ	p DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
5 min	0.31	-1.31	0.00	-1.50	0.432	0.899	0.447	0.480	0.925	0.446
10 min	3.44	2.12	0.87	1.37	0.519	0.360	0.309	0.605	0.735	0.831
15 min	4.25	2.75	-6.00	-1.31	0.673	<b>0.007</b>	0.148	0.077	0.310	0.308
30 min	8.06	-5.94	-15.06	-4.25	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>	0.109	0.619	0.079
45 min	4.87	-13.44	-18.75	-12.00	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	0.213	0.706	0.166
1 h	9.00	-13.62	-22.00	-8.87	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.014	0.329	0.007
1.5 h	6.56	-16.94	-16.94	-15.81	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	1.0	0.837	0.840
2 h	7.62	-17.56	-20.50	-14.87	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.514	0.486	0.304
2.5 h	6.37	-10.75	-8.50	-9.75	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.546	0.753	0.716
3 h	4.87	-7.37	-3.62	-13.12	<b>0.002</b>	<b>0.004</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.359	0.135	0.028
4 h	8.56	0.31	-2.37	-6.56	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.258	0.047	0.338
6 h	6.87	-2.00	1.00	-0.56	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.020</b>	<b>0.008</b>	0.214	0.641	0.547
8 h	6.44	2.31	-0.06	0.18	<b>0.002</b>	<b>0.017</b>	<b>0.013</b>	0.282	0.278	0.929
10 h	8.06	1.43	2.62	2.12	<b>0.006</b>	<b>0.05</b>	<b>0.030</b>	0.671	0.817	0.875
12 h	7.56	2.43	4.75	1.81	0.1	0.218	<b>0.023</b>	0.309	0.845	0.282

#### 4.1.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado

El efecto de DZ sobre la variable d2c fue reproducible, ya que en la comparación de los valores de esta variable corregidos por el valor basal mediante coeficiente de correlación intraclase (CCI) para todos los voluntarios y tiempos conjuntamente se obtuvo un CCI de 0.51 con un valor de  $p < 0.001$ .

Posteriormente se realizaron 16 CCI, uno por voluntario y como se muestra en la Tabla 40, el efecto fue reproducible para 13 de los 16 voluntarios, ya que se obtuvieron CCI entre 0.49 y 0.72 con valores de  $p \leq 0.05$ .

**Tabla 40:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 16 voluntarios.

VOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCI	0.71	0.71	0.31	0.50	0.72	0.70	0.73	0.49	0.63	0.54	0.59	0.22	0.58	0.29	0.72	0.70
p	*	*	0.095	*	*	*	*	*	*	*	*	0.184	*	0.111	*	*

\*, p≤0.05

Sin embargo, cuando se evaluó la reproducibilidad del efecto de los tratamientos en cada punto temporal, el efecto tras ambas administraciones de 30 mg de DZ únicamente fue reproducible a los 60 min post-administración del fármaco (p=0.002).

**Tabla 41:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los tiempos.

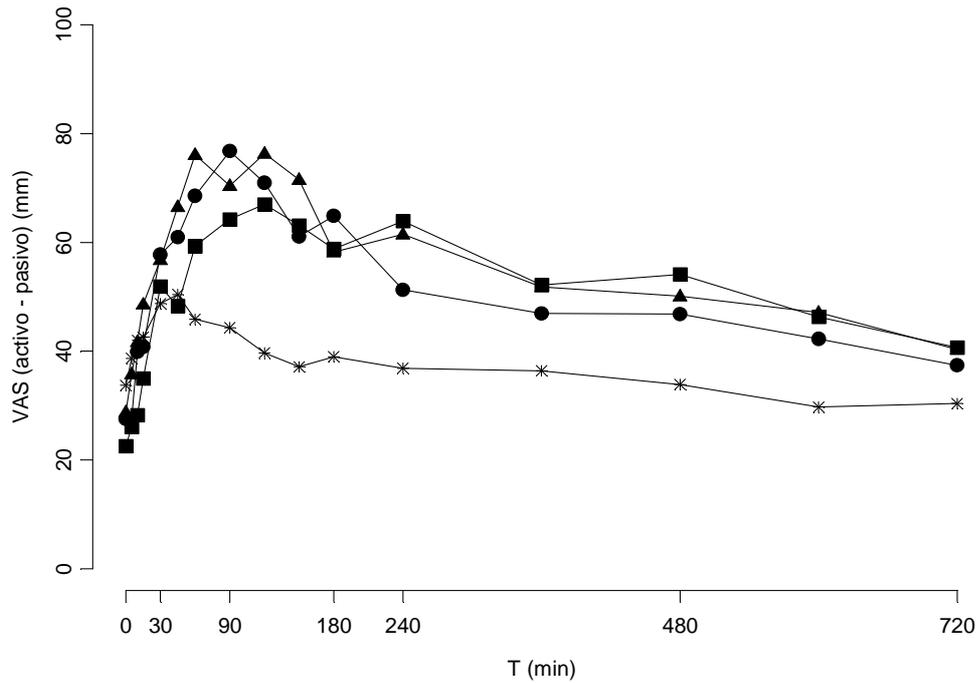
Tiempo	5'	10'	15'	30'	45'	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
CCI	0.17	0.26	-0.47	0.08	-0.52	0.65	0.11	0.27	0.31	-0.04	0.35	0.07	0.06	0.04	0.34
P	0.26	0.16	0.97	0.37	0.58	*	0.33	0.14	0.11	0.56	0.08	0.38	0.41	0.44	0.09

\*, p≤0.05

## 4.2.- Pruebas de valoración subjetiva

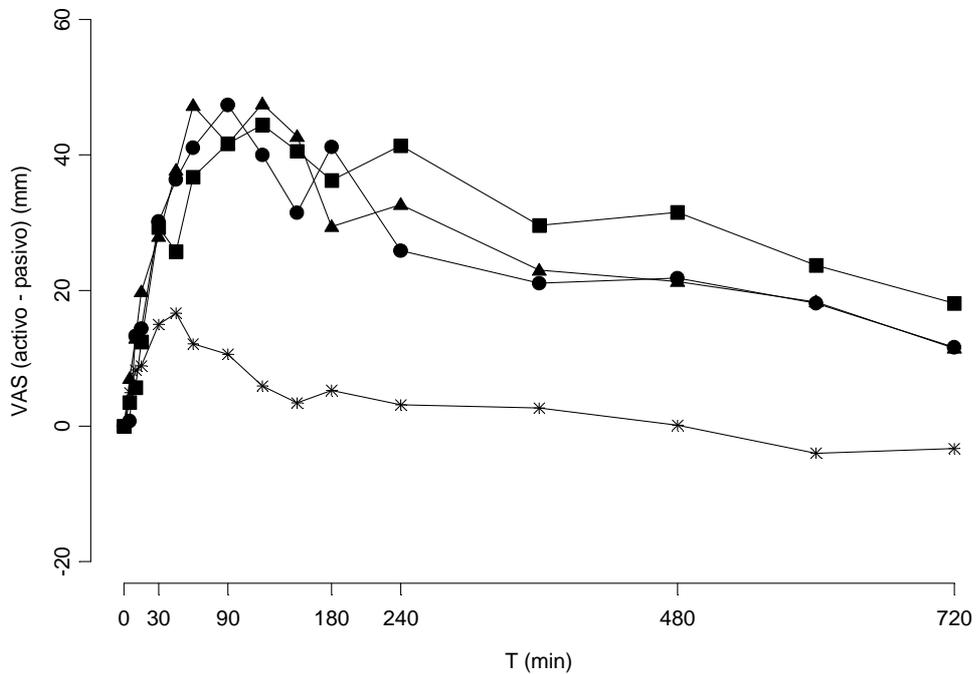
### 4.2.1.- VAS (Activo- Pasivo)

Las gráficas del curso temporal para los 4 tratamientos para la variable VAS (Activo- Pasivo) (Figura 73) mostraron que tras placebo hay un ligero incremento en la pasividad entre los 30 y los 150 min. Tras ambas administraciones de DZ y DMDZ se observó un mayor incremento en la pasividad y una mayor duración con respecto a placebo.



**Figura 73:** Curso temporal del efecto VAS (activo-pasivo) promedio tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

Al expresar los resultados como diferencia respecto del valor basal (Figura 74), las diferencias de los tratamientos con respecto a placebo se hicieron más evidentes.



**Figura 74:** Curso temporal del efecto VAS (activo-pasivo) promedio expresado respecto del valor basal, tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

#### 4.2.1.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0 no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.180$ ) entre los 4 tratamientos en condiciones basales.

#### 4.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos

Tras aplicar una estadística multivariante a los datos directos obtenidos tras DZ1, DZ2 y DMDZ en la que se compararon todos los tratamientos y todos los tiempos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el factor tiempo ( $p<0.001$ ), para el factor tratamiento ( $p=0.011$ ) y para la interacción tiempo x tratamiento ( $p<0.001$ ).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas al valor de AUC calculado a partir de los datos una vez restado el valor basal, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos ( $p=0.001$ ) para esta variable. La posterior comparación mediante un test de t de Student pareado mostró diferencias estadísticamente significativas entre placebo y las dos administraciones de DZ y DMDZ (Tabla 42). Tanto DZ como DMDZ produjeron un incremento en el AUC con respecto a placebo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las dos administraciones de DZ entre sí, pero DMDZ presentó un mayor incremento del AUC comparado con las dos administraciones de DZ (Tabla 42).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.001$ ) entre los 4 tratamientos para  $E_{max}$ . Todos los tratamientos activos produjeron un incremento en el  $E_{max}$  comparado con placebo. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar dos a dos los diferentes tratamientos activos (Tabla 42).

Al aplicar el test de Friedman de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.135$ ) entre los 4 tratamientos para el  $t_{max}$ . El posterior test de Wilcoxon para datos pareados, mostró diferencias estadísticamente significativas en los valores de  $t_{max}$  respecto a placebo y DZ1 y DZ2 pero no entre tratamientos activos (Tabla 42).

**Tabla 42:** Media y desviación estándar del parámetro de tolerabilidad VAS obtenido tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos para la variable VAS (activo-pasivo).

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Media AUC (mm*min) ± DE</b>	745.59 ± 13945.5	16695.15 ± 12721.2	18778.30 ± 18612.7	22258.75 ± 21806.0
Placebo	-	<b>p=0.001</b>	<b>p=0.005</b>	<b>p=0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.572	p=0.183
DZ2	-	-	-	p=0.284
<b>Media E<sub>max</sub> (mm) ± DE</b>	20.43 ± 22.6	24.33 ± 6.1	23.91 ± 5.9	29.98 ± 7.5
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.964	p=0.775
DZ2	-	-	-	p=0.834
<b>Mediana t<sub>max</sub> (min)* [min-máx.]</b>	30.0 [0-600]	90 [45-480]	75 [45-150]	105 [30-600]
Placebo	-	<b>p=0.069</b>	p=0.140	<b>p=0.016</b>
DZ1	-	-	p=0.207	p=0.776
DZ2	-	-	-	p=0.056

Los valores son el promedio ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetro expresado como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon (t<sub>max</sub>). t<sub>max</sub>, tiempo al cual aparece el efecto máximo (E<sub>max</sub>); AUC, área bajo la curva del efecto.

#### 4.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para evaluar si existían diferencias entre los 16 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas para los 4 tratamientos (p<0.001).

Aplicando un test de t de Student de datos pareados a los valores directos, hallamos diferencias estadísticamente significativas (p≤0.05) en los 3 tratamientos activos con respecto a su valor basal para prácticamente la totalidad de los tiempos estudiados, mientras que con placebo estas diferencias solo se mantienen hasta 1 hora post-administración (Tabla 43).

**Tabla 43:** Valores medios de VAS (activo-pasivo) de basal y cada uno de los puntos temporales y comparación del valor basal vs cada tiempo consecutivo tras la administración de placebo, 30 mg de DZ en dos ocasiones y 30 mg de DMDZ.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 5 min	33.7 vs 38.7	<b>0.032</b>	27.5 vs 27.6	0.974	28.8 vs 35.8	<b>0.035</b>	22.6 vs 26.1	0.098
0 vs 10 min	33.7 vs 42.0	<b>0.006</b>	27.5 vs 39.9	<b>0.019</b>	28.8 vs 41.7	<b>0.013</b>	22.6 vs 28.2	0.073
0 vs 15 min	33.7 vs 42.6	<b>0.013</b>	27.5 vs 40.7	<b>0.031</b>	28.8 vs 48.6	<b>0.002</b>	22.6 vs 35.0	<b>0.031</b>
0 vs 30 min	33.7 vs 48.7	<b>0.010</b>	27.5 vs 57.7	<b>&lt;0.001</b>	28.8 vs 56.8	<b>0.001</b>	22.6 vs 51.9	<b>0.001</b>
0 vs 45 min	33.7 vs 50.4	<b>0.010</b>	27.5 vs 60.9	<b>&lt;0.001</b>	28.8 vs 66.6	<b>0.0001</b>	22.6 vs 48.3	<b>0.003</b>

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 1 h	33.7 vs 45.9	<b>0.038</b>	27.5 vs 68.6	<b>0.0001</b>	28.8 vs 76.1	<b>0.0001</b>	22.6 vs 59.3	<b>0.0001</b>
0 vs 1.5 h	33.7 vs 44.3	0.084	27.5 vs 76.8	<b>0.0001</b>	28.8 vs 70.4	<b>0.0001</b>	22.6 vs 64.2	<b>0.0001</b>
0 vs 2 h	33.7 vs 39.7	0.292	27.5 vs 70.9	<b>0.0001</b>	28.8 vs 76.4	<b>0.0001</b>	22.6 vs 67.0	<b>0.0001</b>
0 vs 2.5 h	33.7 vs 37.1	0.572	27.5 vs 61.1	<b>0.0001</b>	28.8 vs 71.6	<b>0.0001</b>	22.6 vs 63.1	<b>0.0001</b>
0 vs 3 h	33.7 vs 39.0	0.433	27.5 vs 64.9	<b>0.0001</b>	28.8 vs 58.2	<b>0.002</b>	22.6 vs 58.8	<b>0.0001</b>
0 vs 4 h	33.7 vs 36.9	0.651	27.5 vs 51.2	<b>0.008</b>	28.8 vs 61.5	<b>0.001</b>	22.6 vs 63.9	<b>0.0001</b>
0 vs 6 h	33.7 vs 36.4	0.683	27.5 vs 46.9	<b>0.001</b>	28.8 vs 51.8	<b>0.013</b>	22.6 vs 52.2	<b>0.006</b>
0 vs 8 h	33.7 vs 33.9	0.977	27.5 vs 46.8	<b>0.002</b>	28.8 vs 50.1	<b>0.018</b>	22.6 vs 54.1	<b>0.004</b>
0 vs 10 h	33.7 vs 29.7	0.436	27.5 vs 42.2	<b>0.019</b>	28.8 vs 47.1	<b>0.038</b>	22.6 vs 46.3	<b>0.011</b>
0 vs 12 h	33.7 vs 30.4	0.519	27.5 vs 37.4	0.196	28.8 vs 40.3	0.082	22.6 vs 40.7	<b>0.030</b>

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo a los valores corregidos por su valor basal y se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los 45 min y las 12 h post-tratamiento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas o tendencias entre el efecto producido por ambas administraciones de diazepam y placebo desde los 15 minutos hasta las 10 horas. Las diferencias entre el efecto producido por DMDZ y placebo comenzaron posteriormente, a 1 hora post-administración y se mantuvieron durante todo el día experimental. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los 3 tratamientos activos entre sí, a excepción de 2 puntos temporales, como se observa en la Tabla 44.

**Tabla 44:** Comparación de los valores medios de VAS (activo-pasivo) para cada uno de los tratamientos en los diferentes puntos temporales una vez sustraído el valor basal correspondiente tras la administración de placebo, 30 mg de DZ en dos ocasiones y 30 mg de DMDZ.

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	P Placebo-DMDZ	P DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
5 min	4.93	2.06	6.66	3.40	0.366	0.591	0.514	0.156	0.413	0.357
10 min	8.30	14.50	13.53	5.93	0.280	0.210	0.54	0.85	0.1	0.128
15 min	8.90	17.40	19.20	12.90	0.221	<b>0.014</b>	0.563	0.776	0.416	0.344
30 min	15.00	31.70	28.46	30.73	0.063	0.061	0.072	0.609	0.889	0.774
45 min	16.66	35.73	39.80	26.93	0.054	<b>0.003</b>	0.299	0.474	0.275	0.090
1 h	12.13	41.53	45.60	38.70	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.008</b>	0.599	0.674	0.494
1.5 h	10.60	48.50	42.13	43.50	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.009</b>	<b>0.006</b>	0.416	0.520	0.898
2 h	5.93	44.93	45.73	46.73	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.868	0.822	0.896
2.5 h	3.40	38.90	38.46	42.20	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.953	0.606	0.603
3 h	5.26	37.90	26.46	37.66	<b>0.001</b>	<b>0.029</b>	<b>0.002</b>	0.105	0.980	0.155
4 h	3.13	30.20	27.10	43.40	<b>0.005</b>	0.10	<b>&lt;0.001</b>	0.587	0.061	<b>0.038</b>
6 h	2.66	22.10	17.60	31.10	<b>0.023</b>	0.087	<b>0.010</b>	0.594	0.285	0.076
8 h	0.13	23.33	24.66	32.80	<b>0.004</b>	0.079	<b>0.004</b>	0.308	0.206	<b>0.021</b>

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	P Placebo-DMDZ	P DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
10 h	-4.00	18.90	12.66	24.26	<b>0.006</b>	0.060	<b>0.007</b>	0.413	0.344	0.131
12 h	-3.33	13.13	9.10	19.00	0.083	0.102	<b>0.014</b>	0.433	0.325	0.116

#### 4.2.1.4.- Reproducibilidad del efecto observado

El efecto de DZ sobre VAS (activo-pasivo) fue reproducible, ya que en la comparación de los valores de esta variable corregidos por el valor basal mediante coeficiente de correlación intraclase (CCI) para todos los voluntarios y tiempos conjuntamente, se obtuvo un CCI de 0.64 con un valor de  $p < 0.001$ .

Posteriormente se realizaron 16 CCI, uno por voluntario y como se muestra en la Tabla 45, el efecto fue reproducible para 14 de los 16 voluntarios.

**Tabla 45:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 16 voluntarios.

VOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCI	0.78	0.27	0.76	0.75	0.75	0.85	0.55	0.73	0.40	0.68	0.39	0.52	0.78	0.73	0.32	0.54
P	*	0.131	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.448	*

\*,  $p \leq 0.05$

El efecto también fue reproducible en la mayoría de puntos temporales, con CCI entre 0.40 y 0.75 y  $p \leq 0.05$  (Tabla 46).

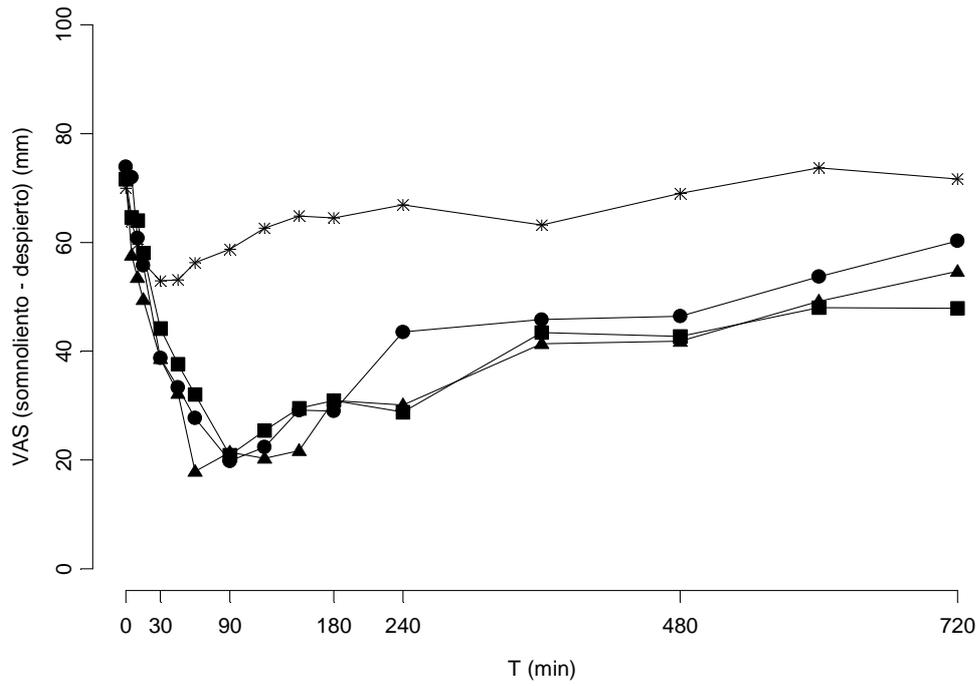
**Tabla 46:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los tiempos.

Tiempo	5'	10'	15'	30'	45'	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
CCI	0.45	0.52	0.47	0.49	0.64	0.23	0.41	0.73	0.46	0.63	0.48	0.48	0.26	0.40	0.75
P	*	*	*	*	*	0.18	0.052	*	*	*	*	*	0.15	*	*

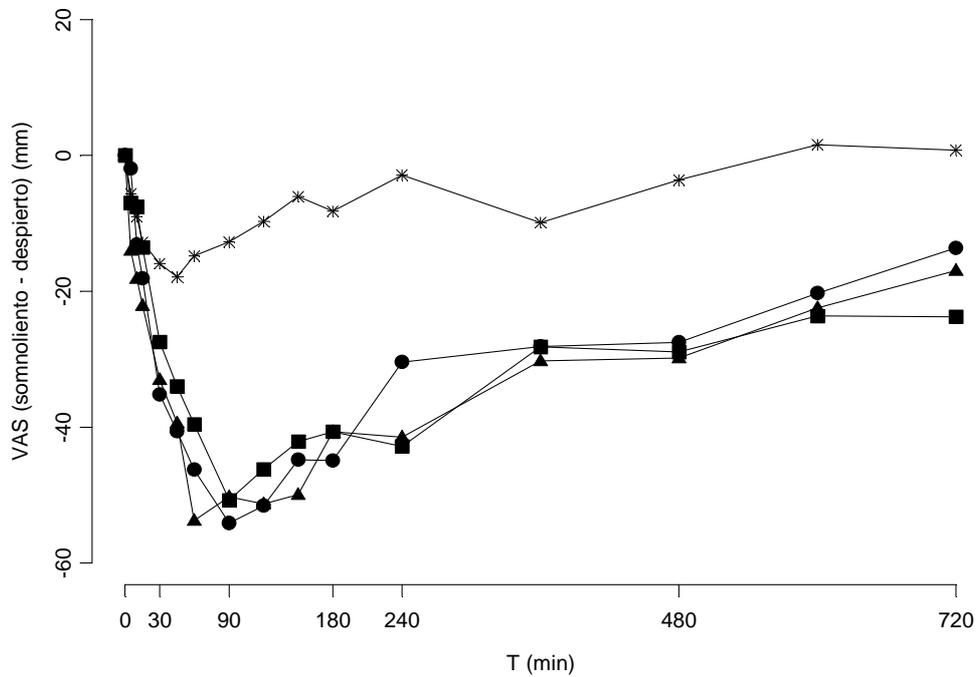
\*,  $p \leq 0.05$

#### 4.2.2.- VAS (Somnoliento-Despierto)

Las gráficas del curso temporal para los 4 tratamientos para la variable VAS (Somnoliento-Despierto) (Figuras 74 y 75) mostraron un ligero efecto tras placebo entre los 15 y los 120 min. Tras la administración de DZ1, DZ2 y DMDZ se observó un efecto de disminución de la variable VAS (Somnoliento-Despierto) entre aproximadamente el minuto 15 y las 8 h de mayor magnitud que el observado tras placebo.



**Figura 74:** Curso temporal del efecto VAS (Somnoliento-Despierto) promedio tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).



**Figura 75:** Curso temporal del efecto VAS (Somnoliento-Despierto) promedio expresado respecto del valor basal, tras la administración de placebo (cruces), DZ1 (círculos), DZ2 (triángulos) y DMDZ (cuadrados).

#### 4.2.2.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró que en condiciones basales, no había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.847$ ) entre los 4 tratamientos.

#### 4.2.2.2.- Efecto global de los tratamientos

Tras aplicar la estadística multivariante a los valores directos obtenidos tras placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ, se hallaron diferencias estadísticamente significativas para el factor tiempo ( $p<0.001$ ), para el factor tratamiento ( $p=0.001$ ) y para los factores tiempo y tratamiento conjuntamente ( $p<0.001$ ).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas al AUC calculado a partir del valor resultante de restar el valor basala los datos directos, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos ( $p=0.002$ ). La posterior comparación entre pares de tratamientos mostró diferencias estadísticamente significativas entre placebo y el resto de tratamientos activos (Tabla 47).

Aplicando un ANOVA de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.001$ ) entre los 4 tratamientos para el  $E_{max}$ . Al aplicar un test de t de Student pareado, hallamos que los diferentes tratamientos activos produjeron un incremento del grado de somnolencia (mostrado como un descenso del valor del VAS) estadísticamente significativo con respecto a placebo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones entre tratamientos activos entre sí (Tabla 47).

Al aplicar el test de Friedman de un factor (tratamiento) de medidas repetidas, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.602$ ) entre los 4 tratamientos para el  $t_{max}$  (Tabla 47). El posterior test de Wilcoxon para datos pareados, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos activos y placebo para la variable  $t_{max}$  (Tabla 47).

**Tabla 47:** Media y desviación estándar de los parámetros de tolerabilidad obtenidos tras administrar placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ y comparación entre ellos para la variable VAS (somnoliento-despierto).

	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ
<b>Media AUC (mm*min) ± DE</b>	-3342.54 ± 15923.0	-21633.44 ± 16148.3	-23704.06 ± 20737.1	-22991.09 ± 17289.5
Placebo	-	<b>p=0.002</b>	<b>p=0.008</b>	<b>p=0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.608	p=0.668
DZ2	-	-	-	p=0.844
<b>Media E<sub>max</sub> (mm) ± DE</b>	-29.07 ± 23.1	-59.37 ± 26.3	-58.87 ± 22.9	-54.62 ± 21.9
Placebo	-	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>
DZ1	-	-	p=0.923	p=0.386
DZ2	-	-	-	p=0.439
<b>Mediana t<sub>max</sub> (min) [min-máx.]</b>	90 [5-480]	120 [60-240]	90 [60-240]	105 [60-720]
Placebo	-	p=0.600	p=0.442	p=0.826
DZ1	-	-	p=0.473	p=0.664
DZ2	-	-	-	p=0.361

Los valores son el promedio ± DE excepto cuando se indica. (\*) parámetro expresado como la mediana [mínimo-máximo]. p, representa el grado de significación resultante de la comparación de parámetros mediante un test de t de Student para datos pareados o un test de Wilcoxon (t<sub>max</sub>)-t<sub>max</sub>, tiempo al cual aparece el efecto máximo (E<sub>max</sub>); AUC, área bajo la curva del efecto.

#### 4.2.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para evaluar si existían diferencias entre los 16 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas para los 4 tratamientos (p<0.001).

Aplicando un test de t de Student de datos pareados a los valores directos, observamos que tras la administración de placebo se produjo un aumento de la somnolencia de manera estadísticamente significativa con respecto a la situación basal hasta las 1.5 h La administración de los 3 tratamientos activos supuso un mayor aumento de la somnolencia de manera estadísticamente significativa durante todo el estudio (Tabla 48).

**Tabla 48:** Comparación de los valores medios de VAS (somnoliento-despierto), antes (basal) y tras la administración de los diferentes tratamientos a cada uno de los puntos temporales tras la administración de placebo, 30 mg de DZ en dos ocasiones y 30 mg de DMDZ.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	P	Valor	P	Valor	p	Valor	p
0 vs 5 min	70.0 vs 63.8	<b>0.007</b>	73.9 vs 72.0	0.40	71.6 vs 57.6	<b>0.045</b>	71.6 vs 64.6	0.069
0 vs 10 min	70.0 vs 60.5	<b>0.001</b>	73.9 vs 60.8	<b>0.013</b>	71.6 vs 53.5	<b>0.006</b>	71.6 vs 64.1	0.087
0 vs 15 min	70.0 vs 57.6	<b>&lt;0.001</b>	73.9 vs 55.8	<b>0.008</b>	71.6 vs 49.5	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 58.1	<b>0.014</b>
0 vs 30 min	70.0 vs 53.3	<b>0.002</b>	73.9 vs 38.7	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 38.6	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 44.2	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 45 min	70.0 vs 52.0	<b>0.003</b>	73.9 vs 33.3	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 32.2	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 37.6	<b>&lt;0.001</b>

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	P	Valor	P	Valor	p	Valor	p
0 vs 1 h	70.0 vs 54.9	<b>0.010</b>	73.9 vs 27.7	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 17.8	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 32.1	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 1.5 h	70.0 vs 57.7	<b>0.037</b>	73.9 vs 19.8	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 21.4	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 20.9	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 2 h	70.0 vs 61.4	0.105	73.9 vs 22.4	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 20.3	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 25.4	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 2.5 h	70.0 vs 63.6	0.295	73.9 vs 29.1	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 21.7	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 29.5	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 3 h	70.0 vs 62.9	0.249	73.9 vs 29.0	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 30.9	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 30.9	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 4 h	70.0 vs 66.5	0.615	73.9 vs 43.5	<b>0.003</b>	71.6 vs 30.1	<b>&lt;0.001</b>	71.6 vs 28.8	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 6 h	70.0 vs 62.1	0.360	73.9 vs 45.8	<b>0.001</b>	71.6 vs 41.4	<b>0.004</b>	71.6 vs 43.4	<b>0.002</b>
0 vs 8 h	70.0 vs 68.2	0.73	73.9 vs 46.4	<b>0.001</b>	71.6 vs 41.8	<b>0.004</b>	71.6 vs 42.7	<b>0.003</b>
0 vs 10 h	70.0 vs 73.4	0.57	73.9 vs 53.7	<b>0.011</b>	71.6 vs 49.2	<b>0.035</b>	71.6 vs 48.0	<b>0.006</b>
0 vs 12 h	70.0 vs 71.5	0.78	73.9 vs 60.3	0.079	71.6 vs 54.7	<b>0.039</b>	71.6 vs 47.9	<b>0.003</b>

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo a los valores corregidos por su valor basal y se hallaron diferencias estadísticamente significativas desde 30 min hasta +4 h y desde las 8 h hasta las 12 h post-tratamiento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas o tendencias entre los diferentes tratamientos y placebo entre los 15-30 minutos post-administración y las 10 horas. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los 3 tratamientos activos entre sí, como se recoge en la Tabla 48.

**Tabla 49:** Comparación de los valores medios de VAS (somnoliento-despierto), para cada uno de los tratamientos en los diferentes puntos temporales una vez sustraído el valor basal correspondiente tras la administración de placebo, 30 mg de DZ en dos ocasiones y 30 mg de DMDZ.

Tiempo	Media Placebo	Media DZ1	Media DZ2	Media DMDZ	p Placebo-DZ1	p Placebo-DZ2	p Placebo-DMDZ	p DZ1-DZ2	p DZ1-DMDZ	p DZ2-DMDZ
5 min	-5.66	-2.60	-15.06	-7.00	0.259	0.233	0.671	0.103	0.295	0.327
10 min	-9.00	-14.20	-19.53	-8.06	0.329	0.129	0.836	0.390	0.296	0.076
15 min	-12.80	-19.86	-23.80	-14.33	0.230	<b>0.042</b>	0.80	0.5	0.38	0.146
30 min	-15.93	-36.40	-35.46	-28.20	<b>0.038</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	0.88	0.267	0.295
45 min	-17.86	-40.80	-42.20	-35.13	<b>0.017</b>	<b>0.005</b>	<b>0.006</b>	0.825	0.435	0.295
1 h	-14.80	-47.86	-52.46	-40.86	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.558	0.312	0.211
1.5 h	-12.73	-54.53	-49.00	-51.73	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.417	0.657	0.686
2 h	-9.73	-53.93	-49.93	-47.73	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.459	0.415	0.713
2.5 h	-6.06	-44.60	-48.66	-43.26	<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.453	0.814	0.380
3 h	-8.20	-44.53	-38.60	-41.53	<b>0.002</b>	<b>0.009</b>	<b>0.001</b>	0.473	0.652	0.678
4 h	-2.86	-32.46	-39.33	-44.33	<b>0.004</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.368	0.143	0.480
6 h	-9.86	-27.53	-28.60	-29.26	0.122	0.189	<b>0.009</b>	0.901	0.834	0.899
8 h	-3.60	-27.53	-28.60	-29.53	<b>0.008</b>	<b>0.047</b>	<b>0.014</b>	0.879	0.686	0.892
10 h	1.60	-18.80	-20.13	-24.06	<b>0.037</b>	0.082	<b>0.029</b>	0.893	0.463	0.595
12 h	0.80	-13.46	-17.66	-24.80	0.138	0.053	0.546	0.611	0.139	0.357

#### 4.2.2.4.- Reproducibilidad del efecto observado

El efecto de DZ sobre VAS (somnoliento-despierto) fue reproducible, ya que en la comparación de los valores de esta variables corregidos por el valor basal mediante coeficiente de correlación intraclass (CCI) para todos los voluntarios y tiempos conjuntamente, se obtuvo un CCI de 0.64 con un valor de  $p < 0.001$ .

Posteriormente se realizaron 16 CCI, uno por voluntario y como se muestra en la Tabla 49, el efecto fue reproducible para 14 de los 16 voluntarios, ya que se obtuvieron CCI entre 0.41 y 0.93 con valores de  $p \leq 0.05$ . como se muestra en la tabla 50.

**Tabla 50:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 16 voluntarios.

VOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CCI	0.82	0.24	0.69	0.82	0.88	0.93	0.55	0.82	0.6	0.67	0.54	0.41	0.60	0.68	0.26	0.67
P	*	0.162	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.14	*

\*,  $p \leq 0.05$

Cuando se evaluó la reproducibilidad del efecto de los tratamientos en cada punto temporal, este fue reproducible a todos los tiempos exceptuando los 5 min y +1 h post-administración (Tabla 51).

**Tabla 51:** Resultado estadístico de la comparación de CCI para cada uno de los 12 tiempos.

Tiempo	5'	10'	15'	30'	45'	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
CCI	0.03	0.41	0.5	0.59	0.48	0.32	0.51	0.6	0.73	0.59	0.53	0.52	0.65	0.41	0.47
p	0.46	*	*	*	*	0.1	*	*	*	*	*	*	*	*	*

\*,  $p \leq 0.05$

## 5.- EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD

Todos los sujetos acudieron a las visitas establecidas en el protocolo y completaron la fase experimental del ensayo.

### 5.1.- ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Se reportaron un total de 163 acontecimientos adversos (AA), correspondientes a 15 LLT (término de nivel menor) diferentes según la codificación MedDRA. De estos 163 AA, 12 fueron tras placebo, 56 tras 30 mg de DZ1, 52 tras 30 mg de DZ2 y 43 tras 30 mg de DMDZ. No se observó ningún acontecimiento adverso grave ni ninguno no esperado tras dosis únicas de 30 mg de DZ y DMDZ por vía oral.

En la Tabla 52 se recoge el número de voluntarios que describieron algún acontecimiento adverso registrado durante el estudio. En las tablas 53 a 56 se recogen los acontecimientos adversos por sistema de clasificación de órganos (MedDRA v.15.1).

El acontecimiento adverso más prevalente fue la somnolencia, registrada en 9 voluntarios tras la administración de placebo y en 15 de los 16 voluntarios tras ambas administraciones de DZ y tras DMDZ respectivamente. Este acontecimiento adverso fue persistente en la mayoría de voluntarios que lo presentaron. La mediana (rango) de la duración de los episodios de somnolencia fue de 2 h (0.5 - 10 h) tras placebo, incrementándose hasta las 9.5 h (1.5 – 16 h) tras DZ1 y 9.5 h (1.5 – 16 h) tras DZ2 y de 8.5 h (2 – 13 h) tras DMDZ.

Los siguientes acontecimientos adversos observados con mayor frecuencia después de la somnolencia tras los 3 tratamientos activos fueron el hipo, el mareo y la relajación. Ningún voluntario presentó estos acontecimientos adversos en la situación placebo, ya que además de somnolencia, tras la administración de placebo únicamente se refirieron cefaleas y gastralgia, ambos de intensidad leve.

De los 163 acontecimientos adversos ocurridos durante el estudio, un 84.6% afectaron el SNC, un 9.8% se clasificaron como trastornos gastrointestinales, un 4.3% como trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración, un 0.6% se clasificó como trastorno psiquiátrico y otro 0.6% se clasificó como trastorno ocular (SOC trastornos oculares) .

**Tabla 52:** Número de voluntarios (N) que refieren AA para cada tratamiento.

Tratamiento	Placebo	DZ1	DZ2	DMDZ	Total
Acontecimiento adverso	N	N	N	N	N
Somnolencia	9	15	15	15	53
Hipo	0	4	3	2	9
Inestabilidad	0	3	0	2	5
Relajación muscular	0	1	2	2	5
Cefalea	2	0	2	0	4
Cansancio	0	1	0	1	2
Mareo	0	1	1	0	2
Sedación	0	0	1	1	2
Angustia	0	0	1	0	1
Aturdimiento	0	1	0	1	2
Colocado	0	1	0	0	1
Desorientación	0	0	1	0	1
Diplopía	0	0	1	0	1
Frío	0	0	1	0	1
Gastralgia	1	0	0	1	2

**Tabla 53:** Resumen de los acontecimientos adversos por Sistema de clasificación de órganos tras la administración de placebo (SOC: System organ class), término preferente (PT: Preferred term) y su nivel menor (LLT: Lowest level term) (MedDRA versión 15.1).

PLACEBO N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (9)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia (9)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia (9)</i></li> </ul> </li> </ul>		7 (58.3%)		2 (16.6%)				9 (75%)	9 (75%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> <li>● Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cefalea (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cefalea temporal (2)</i></li> </ul> </li> </ul>		2 (16.6%)						2 (16.6%)	2 (16.6%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos Gastrointestinales (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Dolor en la zona superior del abdomen(1)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Gastralgia (1)</i></li> </ul> </li> </ul>		1 (8.3%)						1 (8.3%)	1 (8.3%)

n= número de acontecimientos adversos; %= número de acontecimientos adversos / nº total de acontecimientos adversos tras placebo. R:Relacionado;NR:No Relacionado

**Tabla 54:** Resumen de los acontecimientos adversos por Sistema de clasificación de órganos tras la administración de DZ en la primera ocasión (SOC: System organ class), término preferente (PT: Preferred term) y su nivel menor (LLT: Lowest level term) (MedDRA versión 15.1)

DIAZEPAM 1 N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso</i> (36)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia</i> (36)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia</i> (36)</li> </ul> </li> </ul>	12 (21.4%)		14 (25%)		10 (17.8%)		36 (64.2%)		36 (64.2%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos Gastrointestinales</i> (7)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipo</i> (7)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipo</i> (7)</li> </ul> </li> </ul>	2 (5.5%)		3 (5.3%)		2 (5.5%)		7 (12.5%)		7 (12.5%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso</i> (3)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Alteración del equilibrio</i> (3)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Inestabilidad</i> (3)</li> </ul> </li> </ul>	1 (1.78%)		1 (1.78%)		1 (1.78%)		3 (5.3%)		3 (5.3%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso</i> (2)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipotonía</i> (2)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Relajación muscular</i> (2)</li> </ul> </li> </ul>	1 (1.78%)		1 (1.78%)				2 (3.57%)		2 (3.57%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso</i> (3)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mareo</i> (3)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mareo</i> (3)</li> </ul> </li> </ul>	1 (1.78%)		1 (1.78%)		1 (1.78%)		3 (5.3%)		3 (5.3%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso</i> (1)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mareo</i> (1)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aturdimiento</i> (1)</li> </ul> </li> </ul>	1 (1.78%)						1 (1.78%)		1 (1.78%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración</i> (3)</li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Fatiga</i> (3)</li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cansancio</i> (3)</li> </ul> </li> </ul>	1 (1.78%)		1 (1.78%)		1 (1.78%)		3 (5.3%)		3 (5.3%)

DIAZEPAM 1 N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Sensación anormal(1)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Sentirse colocado(1)</i></li> </ul> </li> </ul>			1 (1.78%)				1 (1.78%)		1 (1.78%)

**n= número de acontecimientos adversos; %= número de acontecimientos adversos / nº total de acontecimientos adversos tras DZ1.R:Relacionado;NR:No Relacionado**

**Tabla 55:** Resumen de los acontecimientos adversos por Sistema de clasificación de órganos tras la administración de DZ en la segunda ocasión (SOC: System organ class), término preferente (PT: Preferred term) y su nivel menor (LLT:Lowest level term) (MedDRA versión 15.1)

DIAZEPAM 2 N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (33)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia (33)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia (33)</i></li> </ul> </li> </ul>	10 (20%)		12 (24%)		11 (22%)		33 (66%)		33 (66%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos Gastrointestinales (4)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipo (4)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipo (4)</i></li> </ul> </li> </ul>	3 (6%)		1 (2%)				4 (8%)		4 (8%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipotonía (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Relajación muscular (2)</i></li> </ul> </li> </ul>	2 (4%)		1 (2%)		1 (2%)		4 (8%)		4 (8%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cefalea (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cefalea temporal (2)</i></li> </ul> </li> </ul>	2 (4%)						2 (4%)		2 (4%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mareo (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mareo (2)</i></li> </ul> </li> </ul>			1 (2%)		1 (2%)		2 (4%)		2 (4%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Sedación (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Sedación (2)</i></li> </ul> </li> </ul>			1 (2%)		1 (2%)		2 (4%)		2 (4%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos psiquiátricos (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Ansiedad (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Angustia (1)</i></li> </ul> </li> </ul>			1 (2%)				1 (2%)		1 (2%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):</li> </ul>									

DIAZEPAM 2 N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> <li>• Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Desorientación (2)</i></li> </ul> </li> <li>• Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Desorientación (2)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2%)		1 (2%)				2 (4%)		2 (4%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de clasificación de órganos (SOC):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos oculares (1)</i></li> </ul> </li> <li>• Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Diplopía (1)</i></li> </ul> </li> <li>• Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Diplopía (1)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2%)						1 (2%)		1 (2%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de clasificación de órganos (SOC):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración (1)</i></li> </ul> </li> <li>• Término preferente PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastorno de la regulación de la temperatura (1)</i></li> </ul> </li> <li>• Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastorno de la regulación de la temperatura (1)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2%)						1 (2%)		1 (2%)

n= número de acontecimientos adversos; %= número de acontecimientos adversos / nº total de acontecimientos adversos tras DZ2. R:Relacionado;NR:No Relacionado

**Tabla 56:** Resumen de los acontecimientos adversos por Sistema de clasificación de órganos tras la administración de DMDZ (SOC: System organ class), término preferente (Preferred term) y su nivel menor (Lowest level term) (MedDRA versión 15.1)

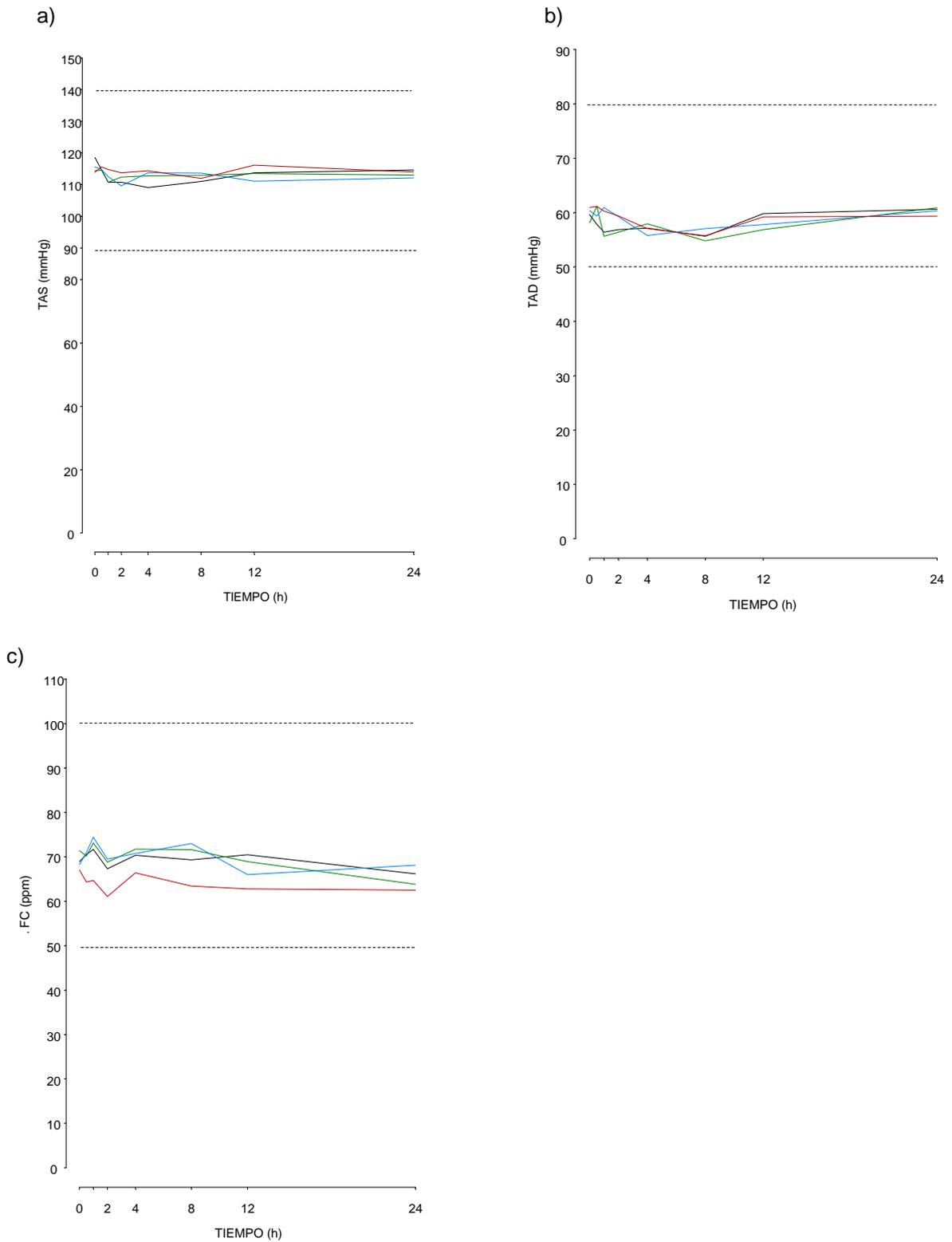
DESMETILDIAZEPAM N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (32)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia (32)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Somnolencia (32)</i></li> </ul> </li> </ul>	11 (25%)		12 (27.9%)		9 (20.9%)		32 (74%)		32 (74%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos Gastrointestinales (3)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipo (3)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipo (3)</i></li> </ul> </li> </ul>	2 (4.6%)		1 (2.3%)				3 (6.97%)		3 (6.97%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Alteración del equilibrio (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Inestabilidad (1)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2.3%)						1 (2.3%)		1 (2.3%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Hipotonía (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Relajación muscular (2)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2.3%)		1 (2.3%)				2 (4.6%)		2 (4.6%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Fatiga (2)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cansancio (2)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2.3%)		1 (2.3%)				2 (4.6%)		2 (4.6%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Sedación (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Sedación (1)</i></li> </ul> </li> </ul>			1 (2.3%)				1 (2.3%)		1 (2.3%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sistema de clasificación de órganos (SOC):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos del Sistema Nervioso (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Término preferente (PT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Mareo (1)</i></li> </ul> </li> <li>● Nivel menor (LLT):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aturdimiento (1)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2.3%)						1 (2.3%)		1 (2.3%)

DESMETILDIAZEPAM N= 16	Leve		Moderado		Intenso		Total		Total
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R + NR
	n (%total AAs)								
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de clasificación de órganos (SOC):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trastornos Gastrointestinales (1)</i></li> </ul> </li> <li>• Término preferente (PT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Dolor en la zona superior del abdomen(1)</i></li> </ul> </li> <li>• Nivel menor (LLT):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Gastralgia (1)</i></li> </ul> </li> </ul>	1 (2.3%)						1 (2.3%)		1 (2.3%)

n= número de acontecimientos adversos; %= número de acontecimientos adversos / nº total de acontecimientos adversos tras DMDZ. R:Relacionado; NR:No Relacionado

### 5.2.- CONSTANTES VITALES

En la Figura 76, se aprecia cómo la media de las constantes vitales evaluadas (tensión arterial sistólica: TAS, tensión arterial diastólica: TAD y frecuencia cardíaca: FC) se mantuvieron entre los rangos de normalidad establecidos. Para la FC, todos los individuos mantuvieron unos valores dentro de los rangos establecidos a lo largo de todas las evaluaciones experimentales. Lo mismo ocurrió para la TAS. En el caso de la TAD, entre un 30 y un 50 % de voluntarios en cada uno de los 4 tratamientos presentaron algún valor inferior al rango de normalidad establecido (50 mmHg), aunque en ningún momento ese valor de tensión tuvo relevancia clínica.



**Figura 76:** En los paneles a) y b) se representa el curso temporal de la tensión arterial sistólica y diastólica promedio respectivamente y en el panel c) el curso temporal de la frecuencia cardíaca promedio para los 4 tratamientos hasta 24 h (+1440 min). La línea roja se corresponde con el tratamiento placebo, la línea negra, con DMDZ, la línea verde con DZ1 y la línea azul con DZ2.

## 5.2.1.- Tensión arterial sistólica

### 5.2.1.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró que en condiciones basales no había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.297$ ) entre los 4 tratamientos.

### 5.2.1.2.- Efecto global de los tratamientos

Tras aplicar estadística multivariante a los valores directos obtenidos tras placebo, DZ, DZ2 y DMDZ no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni para el factor tiempo ( $p=0.059$ ) ni para el factor tratamiento ( $p=0.466$ ) ni para la interacción de los factores tiempo y tratamiento ( $p=0.377$ ).

### 5.2.1.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo, a los valores directos, y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos en ningún tiempo.

Para evaluar si existían diferencias entre los 7 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en placebo ( $p=0.568$ ), DZ1 ( $p=0.832$ ) y DZ2 ( $p=0.276$ ), pero si en DMDZ ( $p=0.006$ ).

Al aplicar un test de t de Student de datos pareados a los valores directos tras la administración de DMDZ se observó una disminución estadísticamente significativa de la TAS entre los 60 y los 720 minutos. En la tabla 57 se recogen los resultados de la comparación tanto para el DMDZ como para el resto de tratamientos.

**Tabla 57:** Comparación de los valores medios de TAS, antes (basal) y tras la administración de placebo, 30 mg de DZ en dos ocasiones y 30 mg de DMDZ a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 30 min	113.8 vs 115.6	0.441	114.3 vs 114.5	0.948	115.6 vs 114.7	0.678	118.5 vs 114.7	0.087
0 vs 1 h	113.8 vs 114.7	0.789	114.3 vs 110.7	0.108	115.6 vs 112.5	0.208	118.5 vs 110.7	<b>0.001</b>
0 vs 2 h	113.8 vs 113.6	0.923	114.3 vs 112.3	0.530	115.6 vs 109.6	<b>0.024</b>	118.5 vs 110.7	<b>&lt;0.001</b>
0 vs 4 h	113.8 vs 114.3	0.857	114.3 vs 112.7	0.658	115.6 vs 113.7	0.538	118.5 vs 109.1	<b>0.003</b>
0 vs 8 h	113.8 vs 111.9	0.405	114.3 vs 112.9	0.657	115.6 vs 113.6	0.501	118.5 vs 111.0	<b>0.029</b>
0 vs 12 h	113.8 vs 116.1	0.321	114.3 vs 113.5	0.766	115.6 vs 111.1	0.096	118.5 vs 113.7	<b>0.028</b>
0 vs 24 h	113.8 vs 114.0	0.949	114.3 vs 113.0	0.573	115.6 vs 112.1	0.077	118.5 vs 114.6	0.097

## 5.2.2.- Tensión arterial diastólica

### 5.2.2.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró que en condiciones basales no había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.584$ ) entre los 4 tratamientos.

### 5.2.2.2.- Efecto global de los tratamientos

Tras aplicar estadística multivariante a los valores directos obtenidos tras placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni para el factor tratamiento ( $p=0.491$ ) ni para la interacción tiempo \* tratamiento ( $p=0.465$ ), pero si para el factor tiempo ( $p=0.001$ ).

### 5.2.2.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo, a los valores directos, y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos en ningún tiempo.

Para evaluar si existían diferencias entre los 7 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en placebo ( $p=0.085$ ), DZ2 ( $p=0.169$ ) ni DMDZ ( $p=0.261$ ), pero si tras DZ1 ( $p=0.036$ ).

El posterior test de t de Student aplicado a DZ1 no detectó diferencias estadísticamente significativas respecto del valor basal a ninguno de los tiempos en los que se evaluó la TAD como se recoge en la tabla 58.

**Tabla 58:** Comparación de los valores medios de TAD, antes (tiempo=0) y tras la administración de placebo, 30 mg de DZ en dos ocasiones y 30 mg de DMDZ a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 30 min	60.9 vs 61.1	0.899	58.1 vs 61.2	0.124	60.4 vs 59.3	0.581	59.6 vs 57.9	0.558
0 vs 1 h	60.9 vs 60.3	0.724	58.1 vs 55.7	0.309	60.4 vs 60.9	0.772	59.6 vs 56.4	0.098
0 vs 2 h	60.9 vs 59.4	0.475	58.1 vs 56.4	0.496	60.4 vs 59.3	0.576	59.6 vs 56.9	0.284
0 vs 4 h	60.9 vs 57.1	<b>0.018</b>	58.1 vs 57.9	0.910	60.4 vs 55.8	<b>0.017</b>	59.6 vs 57.1	0.319
0 vs 8 h	60.9 vs 55.7	<b>0.002</b>	58.1 vs 54.8	0.159	60.4 vs 57.1	0.058	59.6 vs 55.7	0.076
0 vs 12 h	60.9 vs 59.2	0.318	58.1 vs 56.9	0.560	60.4 vs 57.8	0.156	59.6 vs 59.8	0.927
0 vs 24 h	60.9 vs 59.3	0.256	58.1 vs 60.9	0.145	60.4 vs 60.3	0.974	59.6 vs 60.6	0.559

### 5.2.3.- Frecuencia cardíaca

Los valores de FC estuvieron entre los 61.1 y los 74.4 ppm para todos los voluntarios y todos los tratamientos como se observa en la tabla 59.

#### 5.2.3.1.- Evaluación de la situación basal

El ANOVA de un factor (tratamiento) aplicado a los datos directos a tiempo 0, mostró que en condiciones basales no había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.412$ ) entre los 4 tratamientos.

#### 5.2.3.2.- Efecto global de los tratamientos

Tras aplicar estadística multivariante a los valores directos obtenidos tras placebo, DZ1, DZ2 y DMDZ se hallaron diferencias estadísticamente significativas para el factor tratamiento ( $p=0.0001$ ) y para el factor tiempo ( $p=0.015$ ) pero no para la interacción tiempo \* tratamiento ( $p=0.134$ ).

### 5.2.3.3.- Efecto de los tratamientos en el curso temporal del efecto

Para comprobar si existían diferencias entre los 4 tratamientos a cada tiempo, se aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tratamiento a cada tiempo, a los valores directos y se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos a tiempo 30 min ( $p = 0.042$ ), 60 min ( $p = 0.0001$ ), 120 min ( $p = 0.001$ ), 480 min ( $p = 0.0001$ ) y 720 min ( $p = 0.002$ ). El posterior test de t de Student reveló que dichas diferencias eran estadísticamente significativas entre placebo y cada uno de los tratamientos activos, pero no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos activos.

Para evaluar si existían diferencias entre los 7 tiempos para cada tratamiento, a los valores directos se les aplicó un ANOVA de medidas repetidas para el factor tiempo para cada tratamiento y se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos placebo ( $p=0.042$ ), DZ1 ( $p=0.044$ ), DZ2 ( $p=0.046$ ) pero no para DMDZ ( $p=0.141$ ). En la tabla 59 se recogen los resultados de la aplicación del test de t de Student para cada punto temporal y tratamiento.

**Tabla 59:** Comparación de los valores medios de FC, antes (tiempo=0) y tras la administración de los diferentes tratamientos a cada uno de los puntos temporales.

Tiempo	Placebo		DZ1		DZ2		DMDZ	
	Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
0 vs 30 min	67.0 vs 64.3	0.102	71.4 vs 70.2	0.648	68.2 vs 71.0	<b>0.008</b>	68.9 vs 70.5	0.477
0 vs 1 h	67.0 vs 64.7	0.340	71.4 vs 73.1	0.543	68.2 vs 74.4	<b>0.006</b>	68.9 vs 71.7	<b>0.023</b>
0 vs 2 h	67.0 vs 61.1	<b>0.018</b>	71.4 vs 68.8	0.471	68.2 vs 69.5	0.508	68.9 vs 67.3	0.440
0 vs 4 h	67.0 vs 66.4	0.788	71.4 vs 71.7	0.927	68.2 vs 70.7	0.334	68.9 vs 70.3	0.489
0 vs 8 h	67.0 vs 63.4	0.112	71.4 vs 71.6	0.958	68.2 vs 73.0	0.065	68.9 vs 69.3	0.850
0 vs 12 h	67.0 vs 62.8	0.067	71.4 vs 68.9	0.530	68.2 vs 66.0	0.398	68.9 vs 70.5	0.390
0 vs 24 h	67.0 vs 62.5	0.062	71.4 vs 63.8	<b>0.021</b>	68.2 vs 68.1	0.982	68.9 vs 66.2	<b>0.037</b>



---

---

**VI.**

## **Discusión**

---

---



El presente trabajo proporciona información novedosa respecto a la relación entre las concentraciones plasmáticas de desmetildiazepam (metabolito activo de DZ) y el efecto que éstas provocan sobre el EEG (poder relativo beta), así como la contribución de las concentraciones de DMDZ que se forman tras la administración de una dosis única alta de DZ en el efecto observado sobre el EEG (poder relativo beta), mediante la aplicación del modelado farmacocinético/farmacodinámico poblacional. El modelo FD/FD desarrollado ha permitido describir adecuadamente la farmacocinética y los cambios en el poder relativo beta del EEG producidos tras administrar dosis únicas orales de 30 mg de DZ, y de 30 mg de DMDZ. Además, ha permitido cuantificar la contribución de DMDZ formado tras la administración de DZ en el efecto observado en el EEG mostrando que, a la dosis administrada es de un 29.7% del efecto total observado hasta las 12 h, pero que, a las dosis administradas en la práctica clínica (5 mg de DZ cada 12 horas) su contribución sería de un 66.6% en el estado de equilibrio estacionario. Además ha permitido mostrar que 30 mg de DMDZ cada 12 horas tendrían el mismo efecto promedio sobre el EEG que 5 mg de DZ cada 12 horas.

Para la mayoría de fármacos, tras el proceso de biotransformación se genera un metabolito más polar que es farmacológicamente inactivo y se elimina más rápidamente que el compuesto del cual proviene (Shargel et al., 2012). Sin embargo, para algunos fármacos, el metabolito puede ser farmacológicamente activo, como es el caso de diazepam que se metaboliza en gran medida a desmetildiazepam, que, a tenor de los datos de potencia relativa (Greenblatt, 1987; Nakatsuka et al., 1985), hipotetizábamos antes de realizar este estudio que contribuiría de manera significativa en la respuesta farmacológica. Cuando esto ocurre, el trabajo de modelar el efecto observado se vuelve más complejo ya que normalmente no se puede predecir la intensidad de la respuesta farmacológica simplemente sumando los efectos de los dos compuestos por separado. Consecuentemente, los modelos empleados ganan rápidamente en complejidad y pueden presentar problemas de identificación o dificultades de estimación de los parámetros (Bertrand et al., 2011). La complejidad viene dada por el hecho de que tras la administración del fármaco, el efecto que se observa depende tanto de la exposición al fármaco como de la exposición al metabolito (Cosson et al., 2007), dependiendo la contribución del metabolito de su potencia relativa, de sus concentraciones relativas y del mecanismo de interacción (Holford and Sheiner, 1982). Para modelar esta situación, se han abordado diferentes estrategias. En general, todas ellas tienen en común que se administra un tratamiento placebo y que cambia la relación de concentraciones fármaco/metabolito en diferentes administraciones del fármaco ya sea administrando el fármaco por diferentes vías (Friberg et al., 2009; Lehr et al., 2008; Mandema et al., 1992c; Ragueneau et al., 1998), o inhibiendo (Moghadamnia et al., 2003) o induciendo (Olofsen et al., 2012) la vía metabólica responsable de la formación del metabolito. También se ha aprovechado el hecho de que en algunas especies animales no se forme el metabolito (Knoester et al., 2002; Mandema et al., 1992b; Tuk et al., 1999) o incluso existen estudios en los que se ha administrado únicamente una dosis de un fármaco y se ha establecido la contribución del

metabolito en el efecto observado (Webb et al., 2001), aunque esta aproximación parece que puede llevar a resultados erróneos (Lotsch and Geisslinger, 2006). Idealmente también habría que administrar el metabolito solo pero en ocasiones, en humanos, esta opción no es posible por no tener la sustancia disponible para poder administrarse en humanos. En el momento del diseño del presente estudio se pensó en alternativas a estos diseños como sería el posible empleo de diferencias genéticas en la vía de metabolización de DZ a DMDZ o un diseño simple en el que ambas sustancias (fármaco y metabolito) se administraran por vía oral a dosis que aseguraran que las concentraciones de DMDZ generadas tras administrar DZ fueran suficientemente altas como para producir efecto per se. No empleamos la primera de las estrategias ya que el porcentaje de personas de raza caucásica que se considera metabolizador lento para el CYP2D6 oscila entre un 5-10% (Barter et al., 2013; Yang et al., 2012), lo que haría impracticable el reclutamiento de voluntarios. En nuestro caso se optó por emplear un diseño en el que solo se administra una dosis del fármaco y una dosis del metabolito activo por vía oral, opción que había sido utilizada previamente por Tuk y colaboradores (Tuk et al., 1999) que administraron midazolam e hidroximidazolam en humanos. En el diseño propuesto, utilizamos un control con placebo y era importante que la dosis de fármaco seleccionada generara suficiente cantidad de metabolito como para asegurar que, al menos parte del efecto observado tras la administración del fármaco era debido al metabolito, y una dosis de metabolito capaz de producir efecto por si sola. Las dosis máximas de DMDZ aprobadas en Bélgica (AFMPS, 2015) y Francia (ANSM, 2013a, b) oscilan entre los 5 y 15 mg. Con dosis de 5 mg de DMDZ y de 10 mg de DMDZ, se obtienen  $C_{max}$  de 117 ng/mL y 213-227 ng/mL respectivamente (Greenblatt et al., 1988; Yeates et al., 1986), por lo tanto el objetivo era administrar una dosis de DZ que generara  $C_p$  de DMDZ similares a estos 117 ng/mL y que hubiera sido administrada en seres humanos (sanos o pacientes) de una manera segura. Tras revisar la literatura, se vió que 10 mg de DZ administrados por vía oral generan 39 ng/mL de DMDZ (Locniskar et al., 1989), por lo tanto asumiendo una cinética lineal para DZ (Eatman et al., 1977) y para DMDZ, la dosis apropiada de DZ para generar una  $C_{max}$  de DMDZ de aproximadamente 120 ng/mL fue de 30 mg de DZ. La elección de la dosis de DMDZ fue empírica. Se pensó en una dosis que produjera una modificación cuantificable sobre el EEG (relativo alfa y/o beta). Seleccionamos la dosis de 30 mg, considerando que estructuralmente DZ y DMDZ son similares, asumiendo que ambos compuestos tenían capacidad para modificar el EEG sobre ambas bandas, y teniendo en cuenta los datos de potencia *in vitro* de ambos compuestos. Las dosis de 30 mg seleccionadas, pueden parecer elevadas desde el punto de visto clínico, pero no se ha visto que produzcan acontecimientos adversos importantes en otros ensayos clínicos (Humbert et al., 1998; Kintz et al., 1996; Tognoni et al., 1975).

## **Farmacocinética**

Tradicionalmente el análisis de datos farmacocinéticos cuando se tienen datos del perfil de concentración vs tiempo completo para todos los participantes en un ensayo clínico se ha realizado aplicando técnicas de análisis no compartimental individual. Estas técnicas presentan las ventajas de ser sencillas y rápidas de implementar y los inconvenientes de requerir un elevado número de muestras sanguíneas en cada individuo para disponer de datos en las fases de absorción y disposición y de no poder predecir lo que ocurriría en diferentes escenarios ya que no utilizan funciones matemáticas que lo permitan (Gabrielsson and Weiner, 1997). El análisis compartimental solventa algunos de estos inconvenientes como poder predecir un escenario hipotético (diferentes posologías, diferentes dosis, diferentes tiempos, etc.) mediante la aplicación de modelos basados en ecuaciones matemáticas, aunque tampoco está exento de problemas cuando se emplea a nivel individual, ya que puede ser difícil poder promediar los valores de los parámetros, puesto que puede haber individuos cuya farmacocinética se describa con modelos farmacocinéticos diferentes (Bellissant et al., 1998). La aproximación poblacional solventa estos problemas porque permite desarrollar modelos que se ajustan a los datos tanto a nivel individual como poblacional, estudiar la influencia de las covariables en los parámetros y modelar la variabilidad inter e intraindividual (Bellissant et al., 1998). No obstante, requiere un ejercicio de modelización intenso y por lo tanto, consume más tiempo que los anteriores. En nuestro estudio optamos por aplicar de manera inicial un análisis individual no compartimental que nos proporcionó de manera rápida los parámetros farmacocinéticos representativos y nos permitió poder comparar con resultados de los análisis más frecuentemente realizados y argumentar así que las diferencias en la farmacocinética, en caso de haberlas, no serían debidas a la metodología. Este análisis además nos sirvió como punto de partida para el análisis poblacional con el que hemos podido desarrollar un modelo FC necesario para poder realizar la correlación entre C-E y así poder determinar la contribución de DMDZ en el efecto total observado tras administrar DZ. La aplicación de la aproximación poblacional también nos ha permitido estimar la variabilidad interindividual de los parámetros FC y FD, así como la variabilidad residual y evaluar, si determinados factores demográficos que se han recogido como covariables, han influenciado en los procesos de absorción o disposición del fármaco. Por último, nos resultaba imprescindible realizar un análisis FC/FD poblacional que nos permitiera realizar simulaciones de nuevas dosis y nuevos regímenes posológicos.

### **Farmacocinética: aproximación modelo independiente (no compartimental)**

Aunque la farmacocinética de DMDZ no ha sido muy estudiada hasta el momento, los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras su administración a dosis de 30 mg por vía oral, calculados mediante aproximación no compartimental ( $t_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC, CI/F y V/F) son comparables a los previamente publicados a dosis inferiores (Bertilsson et al., 1989; Greenblatt et al., 1988). Destaca la elevada variabilidad interindividual en su  $t_{1/2}$ , observada también tras la administración de dosis

múltiples de entre 20 y 30 mg de DMDZ (Tognoni et al., 1975). A pesar de que Tognoni y colaboradores administraron DMDZ por vía oral durante diez días en dosis que oscilaban entre 20 y 30 mg según el peso de los pacientes, lo realizaron en tan solo 9 pacientes, que además estaban siendo tratados con nortriptilina, por lo que, el presente trabajo representa el primer estudio llevado a cabo en una muestra amplia de voluntarios sanos a los que se ha administrado dosis altas de DMDZ sin la presencia de cualquier otro medicamento. Asumiendo que la cinética de DMDZ es lineal tras dosis únicas de hasta 30 mg, puesto que a dosis inferiores la biodisponibilidad de DMDZ es del 99% (Greenblatt et al., 1988), podemos hipotetizar que a dosis únicas de 30 mg la biodisponibilidad de DMDZ es también cercana al 100% considerando que los parámetros de nuestro estudio son similares ( $t_{max}$ , CL/F o Vd/F) o proporcionales a los observados tras otras dosis ( $C_{max}$ , AUC).

Los parámetros obtenidos mediante aproximación no compartimental en el presente estudio tras la administración de una dosis única elevada de DZ (30 mg) son similares a los previamente publicados en la literatura tras la administración de dosis únicas de DZ que oscilan entre 2 y 20 mg cuando se aplica esta misma aproximación para el cálculo de parámetros (Bertilsson et al., 1989; Divoll et al., 1983; Ellinwood et al., 1985; Friedman et al., 1992; Herman and Wilkinson, 1996; Locniskar et al., 1989; Sohn et al., 1992; Zhang et al., 1990), lo que nos indicaría que la cinética de DZ es lineal cuando se administra en dosis únicas orales de hasta 30 mg y que, al igual que ocurre con dosis inferiores, la biodisponibilidad de DZ es elevada, aunque no podemos dar un valor absoluto ya que existe una gran variabilidad según los estudios y oscila entre un 75 y un 100% (Divoll et al., 1983; Herman and Wilkinson, 1996; Kaplan et al., 1973; Klotz et al., 1975; Ochs et al., 1982b).

Puesto que en el presente trabajo se han determinado las concentraciones tanto de DZ como DMDZ tras la administración del primero, se ha mostrado que la cinética de ambos compuestos es lineal, se puede asumir que todos los procesos farmacocinéticos son de orden uno, y no tenemos información acerca de que el DMDZ se transforme en DZ, comparando las pendientes de la parte final de las rectas de concentración (expresada como logaritmo) vs tiempo ( $k_e$ ), podemos concluir que la cinética de eliminación de DMDZ no depende de su velocidad de formación, sino de su propia eliminación. Si además consideramos que la  $C_{max}$  obtenida en el presente estudio y el  $t_{max}$  son similares a los descritos por otros autores tras la administración de 10 mg de DZ (Locniskar et al., 1989), también podemos concluir que la cinética de DMDZ es lineal tras la administración de dosis altas de DZ.

Asumiendo que la biodisponibilidad tanto de DZ como de DMDZ cuando se administran por vía oral es cercana al 100% incluso a la dosis administradas en nuestro estudio, la fracción de fármaco transformada en metabolito calculada a partir del valor de AUC de DMDZ obtenido tras la administración de DZ y de DMDZ sería de un 62.6 %, lo que corroboraría que la desmetilación es la principal vía de metabolización de DZ (Yasumori et al., 1994). Este resultado está dentro del

rango de lo observado en estudios "in vivo" que indican que la formación de DMDZ a partir de DZ representa de un 50 a un 72% (Bertilsson et al., 1989; Bond et al., 1977; Dasberg, 1975; Greenblatt et al., 1988; Jack and Colburn, 1983) .

La  $C_{max}$  obtenida tras administrar DMDZ es 5 veces mayor y se alcanza casi 20 veces antes ( $t_{max}$ ) que la  $C_{max}$  de DMDZ formado tras la administración de DZ. No hemos podido comparar este resultado con la literatura, ya que no hemos encontrado ningún artículo donde se realizara un diseño similar. La comparación de los valores de  $t_{max}$  y  $C_{max}$  de nuestro estudio con los datos de formación de DMDZ a partir de sus denominados precursores o profármacos (clorazepato, oxazolam y prazepam) (Greenblatt et al., 1988; Jacqmin and Ansseau, 1988; Ochs et al., 1984; Smith et al., 1979), muestran que el DMDZ que se forma tras DZ lo hace mucho más lentamente ( $t_{max}$ ) y en menor cantidad ( $C_{max}$ ) respecto al DMDZ que se forma a partir de sus precursores. Nuestro estudio muestra que tras administrar 30 mg de DMDZ por vía oral, la  $C_{max}$  y el CI/F de este son menores que los de DZ tras administrar DZ por la misma vía. Por el contrario, el AUC y  $t_{1/2}$  de DMDZ son mayores que tras administrar la misma dosis de DZ por la misma vía. El hecho de tener una menor  $C_{max}$ , en nuestro caso, no se podría atribuir a una menor biodisponibilidad de DMDZ y tampoco a diferencias en el volumen de distribución (que son pequeñas y no alcanzan la significación estadística), por tanto, puesto que el aclaramiento de DMDZ es menor que el de DZ, la razón más plausible sería una menor velocidad de absorción. No tenemos datos de bibliografía que nos permitan corroborar esta afirmación, sin embargo los resultados obtenidos con el modelo farmacocinético poblacional donde el valor de  $k_a$  de DMDZ estimado para la población ha sido inferior al valor de  $k_a$  para DZ, apoyan esta hipótesis. La  $t_{1/2}$  de DMDZ es más larga que la de DZ como consecuencia de que su CI/F es menor, ya que no hemos detectado cambios en el volumen de distribución. Si asumimos una biodisponibilidad del 100% para ambos compuestos, el cambio en el CI/F describiría este cambio en la semivida de eliminación. A partir de esta conclusión, podríamos explicar que la mayor AUC observada (33% superior) en nuestro estudio tras DMDZ respecto de DZ, es debida a que DMDZ tiene un CI/F menor que DZ.

#### **Farmacocinética: aproximación compartimental**

Hasta la fecha este es el primer estudio que evalúa la farmacocinética de DMDZ tras ser administrado por vía oral en humanos aplicando aproximación poblacional. En el presente estudio el modelo que mejor describió las concentraciones plasmáticas observadas de DMDZ es un modelo bicompartimental con absorción y eliminación de primer orden desde el compartimento central. En el único estudio en el que han evaluado la farmacocinética de DMDZ aplicando compartimentos, los autores tuvieron que emplear modelos de uno y de dos compartimentos para describir la farmacocinética de DMDZ dependiendo de los individuos (Yeates et al., 1986). Nosotros no tuvimos este problema ya que aplicamos una aproximación poblacional, que, como se ha comentado anteriormente en este trabajo, presenta la ventaja de permitir analizar los datos de

todos los individuos de manera simultánea, preservando la individualidad de los mismos, utilizando modelos que describen las tendencias típicas de la media poblacional y los perfiles individuales donde un mismo modelo permite describir a todos los individuos (Sheiner and Beal, 1980). Los parámetros fijos obtenidos por nuestro modelo se pueden comparar con los parámetros obtenidos por Yeates y colaboradores (Yeates et al., 1986). La velocidad de absorción estimada en nuestro modelo podría estar indicando una semivida de absorción más rápida de la descrita por estos autores (media de aproximadamente 14 min en nuestro estudio vs 30 min en Yeates y colaboradores). Sin embargo, considerando la variabilidad interindividual asociada a la  $k_a$  estimada por nuestro modelo (57 %) y la gran variabilidad en la  $t_{1/2}$  de absorción en los resultados de Yeates, nos hacen pensar que no existen diferencias reales en los resultados de ambos estudios. La disposición de DMDZ es muy similar en ambos estudios, con valores promedio de volumen de distribución y semividas de eliminación muy similares. La única diferencia respecto al comportamiento farmacocinético de DMDZ entre ambos estudios radica en el hecho de que los autores encontraron diferencias estadísticamente significativas en el CL/F entre hombres y mujeres. El estudio de inclusión de covariables en nuestro análisis no reveló esta relación, posiblemente porque el tamaño de muestra de nuestro estudio no era lo suficientemente grande como para detectarla. Tampoco la edad, el peso o la altura explicaron parte de la variabilidad interindividual observada en el CL/F o el V/F. Con respecto a la edad, estos resultados están en la línea con lo publicado hasta ahora, ya que hasta la fecha no hemos encontrado artículos que describan correlación entre la edad y ninguno de los parámetros FC determinados por aproximación modelo independiente. En un trabajo con población obesa se ha observado que existe una correlación entre el peso y la  $t_{1/2}$  de DMDZ en esta población (Abernethy et al., 1983), hecho que se explicaría debido a la distinta distribución de lípidos en estos sujetos respecto de un voluntario sano. Es muy posible que en nuestro estudio no pudiéramos detectar esta correlación debido a que el índice de masa corporal de todos los voluntarios incluidos estuvo entre 20 y 25 kg/m<sup>2</sup>, lo que hace suponer que el componente lipídico en nuestra población no varió lo suficiente.

El modelo FC poblacional que mejor describió el curso temporal de las concentraciones de DZ y DMDZ tras la administración de DZ fue un modelo de disposición de 2 compartimentos para ambos compuestos, con absorción de DZ de primer orden y en el que todo el fármaco se elimina por formación de DMDZ. A pesar de que no hay publicados modelos compartimentales que apliquen la aproximación poblacional para describir la cinética de DZ tras su administración por vía oral, en aquellos en los que se analizan los datos aplicando aproximación individual, también se han empleado funciones de primer orden para describir el proceso de absorción y modelos de 2 compartimentos para describir la disposición de DZ (Abernethy and Greenblatt, 1981; Eatman et al., 1977; Ghoneim et al., 1981; Klotz et al., 1976a). Incluso tras la administración de dosis intravenosas menores, se emplearon modelos de disposición bicompartimental (Klotz et al., 1976b; Klotz et al., 1975; Klotz and Reimann, 1981). El valor estimado de CL/F para DZ de 0.015 L/min concuerda con el descrito en estudios previos que oscila entre 0.010 y 0.035 L/min (Abernethy and Greenblatt, 1981; Eatman et al., 1977; Ghoneim et al., 1981; Greenblatt et al., 1989a; Klotz et al., 1976a; Klotz et al., 1975; Klotz and Reimann, 1981). Hay resultados controvertidos acerca de si

concentraciones elevadas de DMDZ inhiben o no el metabolismo de DZ. Mientras que hay autores que han encontrado que DMDZ a concentraciones superiores a 450 ng/mL disminuyen el Cl/F de DZ (Klotz and Reimann, 1981), otros (Abernethy and Greenblatt, 1981), han descrito que tras administrar dosis iv de 10 mg de DZ, con un precursor de DMDZ durante una semana la cinética de DZ no se ve afectada. En nuestro estudio no llegamos a obtener concentraciones tan elevadas de DMDZ como en el de Klotz y Reimann por lo que no podemos corroborar la hipótesis de que la cinética de DZ se vea modificada por la presencia de concentraciones elevadas de DMDZ.

Considerando el valor típico de aclaramiento de DZ estimado por el modelo, que es muy inferior al flujo sanguíneo hepático (1.5 L/min), podríamos decir que el aclaramiento de diazepam es de tipo restrictivo. Este resultado concuerda con la información que hay en la bibliografía que indica que la tasa de extracción hepática de diazepam es baja (<0.3) (Rowland and Tozer, 1995a). Puesto que su eliminación se asume que ocurre solo a través del hígado (Gueorguieva et al., 2004b), ya que su metabolismo extrahepático y renal es bajo (Igari et al., 1983; Klotz et al., 1976b), el aclaramiento de DZ podría verse modificado en situaciones en las que se modificara la actividad de los hepatocitos y/o la unión a proteínas plasmáticas, ya que se trata de un fármaco con una elevada unión a proteínas plasmáticas (Obach, 2013).

Comparado con DMDZ, el Cl/F de DZ es mayor (0.015 vs 0.0095 L/min, respectivamente), lo que indicaría que DMDZ podría acumularse tras dosis repetidas de DZ. La correlación intrasujetos encontrada ( $r=0.76$ ;  $p=0.04$ ) entre el Cl/F de DZ y DMDZ obtenidos con el modelo simultáneo seleccionado es consistente con trabajos de otros autores que describieron valores de correlación entre 0.83 (Bertilsson et al., 1989) y 0.86 (Greenblatt et al., 1988). Esta correlación se puede explicar, posiblemente por el hecho de que ambas benzodiazepinas se metabolizan en el CYP3A4 (Andersson et al., 1994; Inaba et al., 1988).

Tanto el volumen de distribución central (18.5 L) como periférico (31.3 L) de DZ en nuestro estudio son similares a los descritos en la literatura que oscilan entre 9.8 L y 32 L para el volumen central (Ghoneim et al., 1981; Klotz et al., 1976a, b; Klotz and Reimann, 1981) y entre 24.2 L y 62 L para el volumen periférico (Ghoneim et al., 1981; Klotz et al., 1976a, b; Klotz and Reimann, 1981). El volumen de distribución total de diazepam es superior al volumen total de líquido en el organismo para una persona de 70 kg, lo que indica que al menos en parte accede a tejido, posiblemente graso, debido a su elevada liposolubilidad. El hecho de no haber podido estimar variabilidad interindividual para  $V_c/F$  y  $V_p/F$ , así como el contar con un número relativamente bajo de voluntarios que tienen características muy similares entre ellos, puede haber contribuido a no encontrar una relación entre las covariables recogidas (edad, peso, sexo [hombres  $n=8$ , mujeres  $n=8$ ], raza [caucásicos  $n=12$ , orientales  $n=4$ ]) y parámetros farmacocinéticos ( $V/F$ ,  $Cl/F$ ), como han descrito algunos autores para la edad (Herman and Wilkinson, 1996; Klotz et al., 1975) y la raza (Bertilsson et al., 1989).

Por primera vez hemos podido cuantificar la variabilidad intrerocasión en el proceso de absorción de diazepam. Concretamente, en la cantidad de fármaco que se absorbe. En nuestro estudio estimamos un valor de variabilidad interocasiones relativamente bajo (18%) en la biodisponibilidad de DZ, basándonos en el método descrito por Karlsson y Sheiner en 1993 (Karlsson and Sheiner, 1993). Teniendo en cuenta que DZ no es un fármaco con un índice terapéutico estrecho, es plausible pensar que una modificación de esta magnitud no tenga repercusión alguna en el efecto que DZ ejerce a nivel de SNC. Sólo hemos podido detectar esta variabilidad interocasiones al desarrollar el modelo farmacocinético y no cuando hemos aplicado metodología no compartimental ya que es una diferencia que sucede al azar, y por lo tanto no es imputable a una administración respecto de la otra y no provoca que observemos diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros en la segunda administración respecto de la primera. Este hecho sugiere que las administraciones de DZ serían reproducibles desde un punto de vista poblacional pero no a nivel de individuo. Este resultado aunque esperable es novedoso, ya que, no existe ningún otro estudio donde se haya valorado esta situación para diazepam.

El valor de  $k_a$  estimado por nuestro modelo ( $0.05 \text{ min}^{-1}$ ) es superior al descrito por (Eatman et al., 1977; Kaplan et al., 1973). Sin embargo, nuestro modelo predice una semivida de absorción media de 13.9 min, valor cercano al descrito por Ochs y colaboradores (Ochs et al., 1982b) de 19 min. Este hecho sugiere que la diferencia en el valor de  $k_a$  entre nuestro estudio y los dos primeros mencionados podría ser debida a que los autores no estiman tiempo de latencia, y al no hacerlo, las  $C_p$  suben más lentamente adoptando un perfil de absorción que no es el real. También hay que tener en cuenta que Eatman y colaboradores tienen mucha variabilidad en este parámetro, y justamente los dos valores menores estimados tienen un error de estimación del 250 y el 300%.

Durante el desarrollo del modelo para describir de manera simultánea las concentraciones de DZ y de DMDZ asumimos que todo el fármaco se eliminaba por una única vía, y que durante su eliminación se transformada en su totalidad a DMDZ. Optamos por esta aproximación, porque, si bien es cierto que a nivel poblacional (medio) hemos podido llegar a tener valores que indican que la biodisponibilidad media tanto de DZ como de DMDZ puede ser del 100%, no teníamos datos que nos permitieran corroborar este valor a nivel individual. Esta estrategia conlleva que los parámetros estimados para DMDZ no sólo lleven implícito la fracción de fármaco que se transforma en metabolito, sino también la  $F$  de DZ. Todos los estimados poblacionales de los parámetros de DMDZ obtenidos de esta forma son similares a los estimados tras la administración de DMDZ asumiendo una absorción total.

## **Farmacodinamia**

### **Efecto sobre el EEG: Análisis modelo independiente**

El análisis cuantitativo del EEG mediante análisis aperiódico empleado en nuestro estudio representa una aproximación objetiva para seguir el curso temporal y la intensidad de los efectos en el SNC de diazepam (Greenblatt et al., 1994; Laurijssens and Greenblatt, 1996; Mandema and Danhof, 1992; Stanski, 1992). Se ha utilizado para diferenciar las propiedades farmacodinámicas de benzodiazepinas (Greenblatt et al., 1994), para cuantificar el efecto producido por diferentes dosis del mismo compuesto (Friedman et al., 1992), para documentar efectos de reversión en el SNC tras la administración del antagonista flumazenilo (Mandema et al., 1992a) y para distinguir depresión del SNC atribuible al ligando benzodiazepínico de los efectos asociados a otros fármacos que actúan por diferentes mecanismos (Mandema and Danhof, 1990; Schuttler et al., 1987). Para evitar que los resultados observados en las diferentes medidas del presente estudio, (EEG, test de cancelación d2 y VAS) tras la administración de DZ y DMDZ, fueran debidos a variaciones diurnas en las mismas, cambios en la ansiedad del voluntario durante el curso del día relacionados con la experimentación o la extracción de muestras sanguíneas, cambios en la actividad física a lo largo del día de estudio o cambios motivados por la ingesta de comida, el estudio se controló con la incorporación de placebo como se ha realizado en otros estudios (Barbanoj et al., 1994; Ciraulo et al., 1997; Dingemanse et al., 1997b; Friedman et al., 1992; Greenblatt et al., 2005; Greenblatt et al., 1994; Lindhardt et al., 2001; Mandema et al., 1992a). La falta de efecto sobre ninguna de las dos variables de EEG medidas (poder relativo alfa y poder relativo beta) tras la administración de placebo, es indicador de que ninguno de estos factores afectan al EEG, y que por tanto no es necesario referenciar las medidas del EEG al placebo. Este punto cobra especial relevancia cuando se desarrolla un modelo farmacocinético/farmacodinámico ya que si no existe efecto placebo se pueden correlacionar las concentraciones plasmáticas con las medidas de las variables, pero, en caso de existir efecto placebo es necesaria la incorporación de dicho efecto en el modelo para poder diferenciar claramente el efecto debido a la administración del fármaco (Pilla Reddy et al., 2011; Sun et al., 2013; Wang et al., 2012) .

En el EEG cortical registrado, representativo de la vigilia (12h), tanto DZ como DMDZ a las dosis empleadas en el presente estudio disminuyen la actividad alfa (8-12 Hz) y aumentan la actividad beta (15-30 Hz) cuando estas se expresan como poder relativo de la banda con respecto al poder espectral total, diferenciándose claramente del placebo. Este patrón de efecto se corresponde con el esperado tras la administración de BDZs en humanos (Barbanoj et al., 1994; Barbanoj et al., 2007; Ciraulo et al., 1997; Coppola and Herrmann, 1987; Koopmans et al., 1988; Mucci et al., 2006; Saletu et al., 2006) y similar a los cambios observados en el EEG en la transición del estado de vigilia al de sueño (Mandema and Danhof, 1992). Se postula que este patrón es específico de las benzodiazepinas y diferencial de otros fármacos con acción sobre el SNC (Herrmann, 1982; Saletu et al., 1987), aunque algunos autores han cuestionado la clasificación de fármacos

atendiendo al efecto que producen sobre el EEG cuando se emplea información referente a pocas bandas (Barbanoj et al., 1994).

El incremento de señal sobre la banda beta del EEG cuando no hay fármacos presentes se asocia a un incremento del grado de activación (Brown et al., 2012; Whittington et al., 2000). Es por ello, que los cambios que producen las benzodiazepinas sobre el EEG presentarían una aparente paradoja, ya que producen un incremento de la banda beta a la vez que un aumento del grado de sedación o disminución de la atención. Durante años se ha postulado que los cambios observados en la banda beta tras la administración de benzodiazepinas se debían a lo que se denominaba "efecto de disociación". Este fenómeno describe una situación en la que un fármaco produce un efecto en el EEG opuesto al que produce sobre el estado de vigilia (Coenen and van Luijckelaar, 1991; Jongsma et al., 2000). Esta hipótesis de la no relación entre los incrementos de la banda beta del EEG observados tras la administración de DZ con la sedación, se explicaría debido a que se ha observado que la acción sedante de DZ está mediada por la interacción con la subunidad  $\alpha 1$  del receptor  $GABA_A$  (McKernan et al., 2000; Rudolph et al., 1999; Tobler et al., 2001), mientras que la acción ansiolítica de DZ estaría mediada por la interacción con las subunidades  $\alpha 2$  y/o  $\alpha 3$  (Atack et al., 2005; Low et al., 2000; Rudolph and Mohler, 2006; Vinkers et al., 2009). Estudios recientes (Christian et al., 2015) han mostrado que, a dosis ansiolíticas, diferentes compuestos benzodiazepínicos  $GABA_{A\alpha 2/3}$  selectivos, elevan la banda  $\beta/\gamma$  del EEG sin producir sedación. Este hecho nos permitiría hipotetizar que el incremento que observamos en la banda beta en nuestro estudio no estaría reflejando una sedación si no un efecto mediado por los receptores  $GABA_{A\alpha 2/3}$ . De hecho cuando se intentó correlacionar el  $E_{max}$  observado en el efecto sobre la banda beta en nuestro estudio con los resultados de las escalas analógicas visuales de sedación, no se observó correlación alguna (datos no mostrados).

Por otro lado, es conocido que las ondas alfa se generan principalmente en el lóbulo occipital durante la vigilia (en estados de relajación con ojos cerrados), y pueden verse disminuidas al abrir los ojos, durante situaciones de somnolencia o bien durante el sueño propiamente dicho (Cantero et al., 2002). Sin embargo el descenso en las ondas alfa observado tras la administración de benzodiazepinas no se ha empleado como una medida para describir la somnolencia, posiblemente debido a que la modificación en la actividad alfa es específica de una zona; así por ejemplo, el descenso de actividad alfa que se produce cuando una persona muestra somnolencia se caracteriza por descensos en la amplitud en áreas occipitales, mientras que el descenso durante la vigilia, al abrir los ojos, se localiza en el cíngulo anterior (Cantero et al., 2002). Además, está descrito en numerosos estudios que los fármacos anestésicos, disminuyen esta frecuencia en el EEG (Hering et al., 1994; Kishimoto et al., 1995; Schuttler et al., 1987). Posiblemente, es por este motivo que, a pesar de que en nuestro estudio hemos observado una disminución del poder relativo alfa del EEG respecto a placebo en los 2 fármacos estudiados, así como un aumento en la somnolencia en el VAS relacionado con la sedación (VAS (somnoliento-despierto)) y una disminución de la actividad (VAS (activo-pasivo)), no hemos encontrado

correlación con los resultados de las escalas analógicas visuales de sedación (datos no mostrado) y por tanto no podemos concluir que este cambio en la banda alfa del EEG esté relacionado con la sedación.

A pesar de que tanto DZ como DMDZ en nuestro estudio producen los mismos cambios cualitativos a nivel de banda alfa y beta, siguen un curso temporal diferente y cuantitativamente son diferentes. En el análisis modelo independiente de los datos, el efecto máximo observado tras la administración de DZ aparece antes ( $t_{\max}=1.5$  h vs  $t_{\max}=3$  h) y es de mayor magnitud ( $E_{\max}=25\%$  vs  $E_{\max}=19\%$ ) en el poder relativo beta respecto a DMDZ. Algo similar ocurre con el efecto alfa, el  $E_{\max}$  aparece antes tras la administración de DZ ( $t_{\max}=2$  h vs  $t_{\max}=3$  h) y el efecto máximo observado de esta señal es de mayor magnitud para DZ que para DMDZ ( $E_{\max}=26\%$  vs  $E_{\max}=23\%$ ). El hecho de llegar al efecto máximo antes tras la administración de DZ que tras la administración de DMDZ podría deberse a motivos farmacocinéticos, ya que DZ es más liposoluble que su metabolito DMDZ (Arendt et al., 1983). Así, DZ llegaría antes a SNC ya que atravesaría más rápidamente la barrera hematoencefálica, como ocurre para la mayoría de fármacos cuyos metabolitos son más hidrófilos (Obach, 2013). Posiblemente esta llegada más rápida a SNC provocaría que las concentraciones en el lugar de acción de DZ fueran mayores que las de DMDZ cuando ambos se administran por separado. Esta situación, junto al hecho de que tras administrar DZ se generan también concentraciones de DMDZ, que tiene una potencia similar, (Dorow et al., 1982; Kemp, 1987; Nakatsuka et al., 1985; Richelson et al., 1991) podrían ser los responsables del mayor  $E_{\max}$  observado tras la administración de DZ que tras la administración de DMDZ. Todo ello a pesar de haber empleado la misma dosis, y de que la fracción libre de DZ sea inferior a la de DMDZ (0.023 vs 0.03) (Obach, 2013).

Inicialmente podría sorprender el hecho de que el efecto máximo observado para el poder relativo beta en nuestro estudio (25% tras administrar 30 mg de DZ y 19% tras administrar 30 mg de DMDZ), esté dentro del rango observado por otros autores a dosis de 10 mg de DZ administradas tanto por vía oral como endovenosa (Ciraulo et al., 1997; Friedman et al., 1992; Greenblatt et al., 1989a). Sin embargo, considerando que estos últimos autores desarrollaron un modelo FC/FD para diazepam y estimaron un valor de  $E_{\max}$  intrínseco del 20%, el efecto máximo observado en nuestro estudio es perfectamente plausible, y simplemente indicaría que el incremento de dosis de DZ más allá de 10 mg supondría un cambio muy pequeño en el efecto máximo a observar en el poder relativo beta.

#### **Efecto sobre el EEG: Modelado farmacocinético-farmacodinámico**

A pesar de que con el análisis modelo independiente hemos podido obtener información sobre los cambios que se producen en el EEG tras la administración de DZ y DMDZ, que son similares tanto a nivel del poder relativo alfa como del poder relativo beta, no nos ha permitido cuantificar el grado de contribución de DMDZ en el efecto observado tras la administración de DZ, ni tampoco poder

predecir cuál sería el efecto a observar tras la administración de dosis múltiples o de diferentes dosis tras la administración de cualquiera de los dos compuestos. Estos objetivos, se podrían conseguir aplicando modelado FC/FD (Duffull et al., 2000; Webb et al., 2001; Yoo et al., 2012).

Como se ha comentado anteriormente, múltiples investigaciones tanto en modelos animales (Coenen and van Lujtelaar, 1991; Jongsma et al., 2000; van Lier et al., 2004) como en humanos, (Barbanoj et al., 2007; Gilles and Luthringer, 2007; Saletu et al., 2006) han demostrado que los fármacos benzodiazepínicos con potentes propiedades ansiolíticas/sedantes producen un fuerte incremento en la actividad beta del EEG. Además, el curso temporal del aumento de la actividad beta se relaciona con las concentraciones plasmáticas de las benzodiazepinas (Barbanoj et al., 2007; Ciraulo et al., 1997; Friedman et al., 1992; Greenblatt et al., 1989a). De manera que la mayor parte de artículos publicados con benzodiazepinas, en los que se ha modelado la relación entre la dosis administrada y el efecto medido en el EEG teniendo en cuenta las concentraciones plasmáticas, emplean esta variable (Breimer et al., 1990; Friedman et al., 1992; Greenblatt et al., 1989a; Lindhardt et al., 2001; Mandema and Danhof, 1992; Mandema et al., 1992a; Mandema et al., 1991a; Mandema et al., 1991b). Incluso se ha llegado a mostrar que las amplitudes de la banda de frecuencia beta son una medida relevante de la intensidad de las benzodiazepinas, que refleja su afinidad y eficacia intrínseca por el complejo del receptor GABA, ya que existe correlación entre parámetros derivados de la relación concentración-efecto en el EEG con otras medidas in vivo y con medidas in vitro (Mandema et al., 1992a). Por ello, para el análisis FC/FD empleamos la variable poder relativo beta.

Generalmente, puesto que el efecto de un fármaco ocurre fuera del sistema vascular, existen retrasos entre la concentración plasmática y el efecto que producen (Rowland and Tozer, 1995b). En nuestro estudio, a pesar de que tanto DZ como DMDZ producen su efecto en el SNC no hemos observado este retraso en la variable del EEG poder relativo beta. Esta situación podría deberse a que ambos fármacos son lipófilos y por tanto, se produce un equilibrio rápido entre sangre y SNC. De hecho, en un estudio llevado a cabo por Arendt y colaboradores en el que se determinan concentraciones de DZ y DMDZ tanto en plasma como en LCR se muestra que el retraso existente en la  $C_{max}$  entre ambos lugares es de 3.7 y 11 min para el fármaco y su metabolito respectivamente (Arendt et al., 1983). En un diseño como el nuestro, es casi imposible detectar un retraso de tan poco minutos, ya que las mediciones del efecto que se hicieron después de empezar a tener concentraciones plasmáticas por encima del límite de cuantificación no tuvieron una frecuencia inferior a los quince minutos (Sheiner et al., 1979). Por lo tanto todos los modelos evaluados asumieron una relación directa entre la concentración de DZ y/o DMDZ y el efecto observado.

Aunque la farmacología *in vitro* a menudo permite la caracterización de efectos máximos intrínsecos del fármaco, esta situación puede no observarse *in vivo*. En estos casos, como en nuestro estudio, en el que pese a haber administrado una dosis alta de DMDZ no se alcanza a ver

el  $E_{max}$  atribuible al fármaco, en general no se pueden estimar adecuadamente los parámetros de un modelo de  $E_{max}$ , ya que  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  están muy correlacionados y hay un enorme rango de valores que podrían emplearse para describir la relación efecto-concentración. Además el modelo daría indicaciones de estar sobreparametrizado. En estas situaciones, se puede emplear un modelo lineal (Friedman et al., 1992), aunque solo si no tenemos indicación de desviación de la linealidad, ya que si se fuerza una línea recta en esos casos, la pendiente de la línea dependería de la curvatura presente. O bien podríamos emplear un modelo de  $E_{max}$  reparametrizado (Ratkowsky, 1986; Schoemaker et al., 1998). En estos modelos se estima un parámetro que representa el ratio  $E_{max}/EC_{50}$  que Schoemaker y colaboradores denominan  $S_0$  y que Ratkowsky y colaboradores llaman  $\theta_2$ . Este nuevo parámetro es más estable que  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  y se puede interpretar como la sensibilidad inicial del fármaco a concentraciones bajas. Durante el desarrollo del modelo farmacodinámico de DMDZ, la aplicación de un modelo de  $E_{max}$  reveló resultados que mostraban, como se esperaba, que  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  estaban altamente correlacionados y además los errores de estimación de los parámetros fueron elevados lo que indicaba que el modelo estaba sobreparametrizado. La simplificación a un modelo lineal, también presentaba elevados valores de errores de estimación. Sin embargo, la aplicación del modelo reparametrizado en los mismos términos descritos por Schoemaker y colaboradores permitió la estimación de parámetros con errores de estimación menores, especialmente en el parámetro  $S_0$  comparado con el que tenía  $EC_{50}$  en el modelo de efecto máximo.

Con el presente trabajo hemos podido por primera vez obtener datos que nos permiten obtener información sobre la potencia *in vivo* en humanos para DMDZ utilizando un modelo FC/FD poblacional. El valor de  $EC_{50}$  que se obtendría a partir del modelo seleccionado, considerando que  $EC_{50} = E_{max} / S_0$  (197 ng/mL), es similar al observado por otros autores para otras benzodiazepinas (Breimer et al., 1990; Fiset et al., 1995). Sin embargo, no podemos comparar la potencia de DMDZ con la de DZ, ya que, como se comentará más adelante, para este último sólo hemos podido emplear un modelo lineal para relacionar las concentraciones con el efecto observado. Algunos autores han sugerido que es poco probable que las concentraciones de DMDZ que se forman tras la administración de DZ contribuyan de manera sustancial al efecto de DZ, teniendo en cuenta la diferencia de afinidades por el receptor benzodiazepínico y la fracción libre de ambos compuestos (Obach, 2013). En nuestro estudio, previo al desarrollo del modelo FC/FD tras la administración de DZ, se llevaron a cabo simulaciones que revelaron que las concentraciones plasmáticas de DMDZ generadas, eran lo suficientemente elevadas como para producir efecto (Figura 58, resultados), por ello en el desarrollo del modelo del efecto observado tras administrar DZ siempre tuvimos en cuenta las 2 especies activas.

Puesto que DZ y DMDZ tienen estructuras similares, se podría pensar que cuando ambos se encuentran en el organismo compitan por el mismo receptor. En estas situaciones generalmente se emplean modelos de interacción competitiva para caracterizar el efecto combinado de un fármaco y su metabolito (Mandema et al., 1992b; Romero et al., 2012; Tuk et al., 1999). La

evaluación de modelos de interacción competitiva (Holford and Sheiner, 1982) durante el desarrollo del modelo FC/FD en el presente estudio nos permitió concluir que a las dosis estudiadas, DMDZ no actuaría como un agonista parcial. Este resultado no es sorprendente ya que existe controversia sobre la afinidad relativa de DMDZ con respecto a DZ por el receptor gabaérgico. Así mientras que unos autores citan valores de  $k_i$  que reflejan que la afinidad de DMDZ por el receptor GABA es casi el doble que la de DZ (Greenblatt, 1987), otros autores muestran lo contrario, que la afinidad ( $k_i$ ) de DMDZ es menor que la de DZ (Dorow et al., 1982). El modelo seleccionado para describir la interacción entre DZ y DMDZ fue un modelo aditivo, que refleja el efecto combinado de 2 agonistas (Tallarida 2007). Puesto que es difícil sostener que DZ y DMDZ actúan mediante mecanismos de acción diferentes o que interaccionan sobre receptores diferentes, el uso de un modelo aditivo nos hace pensar en que la afinidad *in vivo* de estos dos compuestos es similar como se ha mostrado en algunos estudios *in vitro* o bien que cada molécula provoque el efecto sobre el EEG mediante interacción con diferentes subtipos de receptores GABA. Hasta la fecha no hay bibliografía que documente que DZ y DMDZ se una a diferentes subtipos de receptores GABA y teniendo en cuenta que los efectos que provocan ambos compuestos son similares, (Sweetman, 2009) la justificación más probable de nuestro modelo sea que la potencia *in vivo* de ambos compuestos es similar.

Posiblemente el hallazgo más novedoso y destacable del presente estudio ha sido el desarrollo del modelo de interacción entre DZ y DMDZ que nos ha permitido no sólo cuantificar por primera vez la contribución de DMDZ al efecto total observado en el poder relativo beta del EEG, tras la administración de DZ, que a dosis de 30 mg se corresponde con un 29.7%, si no también poder predecir y cuantificar el efecto del DMDZ tras la administración de dosis de DZ empleadas para el tratamiento de la ansiedad. Las simulaciones realizadas, tanto de las concentraciones de DZ y DMDZ, como del efecto sobre el EEG tras administrar dosis múltiples empleadas como ansiolíticas en la práctica clínica (5 mg cada 12 h de DZ) hasta alcanzar el estado de equilibrio estacionario del efecto mostraron que las concentraciones plasmáticas de DMDZ que se forman tras la administración de dosis clínicas de DZ tienen un papel en el efecto observado tras la administración de diazepam en el estado de equilibrio estacionado. Considerando la relación que se ha establecido entre la ansiolisis y los cambios en la actividad beta del EEG, este resultado, apoyaría la hipótesis de que DMDZ contribuye al efecto clínico durante la terapia crónica con DZ (Greenblatt, 1987). Además estas simulaciones indican que tras aproximadamente 15 días de tratamiento se ha alcanzado el estado de equilibrio estacionario en el efecto sobre el EEG, y que el efecto máximo que se observaría es de 36.43 %. A pesar de que las diferentes simulaciones realizadas con diferentes dosis de DMDZ cada 12 h revelan que el estado de equilibrio estacionario se alcanzaría antes (aproximadamente 5 días), el efecto máximo observable solo sería similar tras la administración de 30 mg de DMDZ cada 12 horas. Por tanto, aunque inicialmente se podría pensar en DMDZ como una buena alternativa de tratamiento a DZ debido a su larga semivida de eliminación, estas simulaciones muestran que no existe ventaja alguna, más allá de alcanzar antes el efecto máximo, y presentar una menor fluctuación en el EEG.

No es la primera vez que se emplea un modelo lineal para describir la relación entre el efecto observado tras DZ y las concentraciones de este fármaco. Friedman y colaboradores (Friedman et al., 1992) modelaron el efecto producido por DZ sobre la misma variable mediante una relación lineal también. Estos autores, que emplearon dosis DZ menores que en nuestro estudio (administraron dosis únicas de 2, 5 y 10 mg de diazepam), no tuvieron en cuenta el efecto del DMDZ al desarrollar su modelo y asumieron que la contribución de DMDZ al efecto era nula. Las simulaciones realizadas con nuestro modelo confirman que, efectivamente, tras dosis únicas de 10 mg de DZ la contribución del DMDZ es nula (datos no mostrados). El valor de la pendiente que relaciona la concentración de DZ y el efecto estimado por nuestro modelo (0.084) es muy similar al indicado por estos autores (Friedman et al., 1992) (0.064) lo que da validez a nuestro modelo. Únicamente Bühler y colaboradores (Bühler et al., 1990a) han empleado un modelo de  $E_{max}$  sigmoide para describir la relación entre el efecto observado en el EEG tras la administración de DZ (en términos de  $\mu V$ ) y las concentraciones de éste en el lugar del efecto, si bien es cierto que los autores administraron el fármaco en forma de bolus endovenoso a dosis de 15, 30 y 50 mg que llegaban a provocar que los pacientes estuvieran inconscientes. Estos autores encontraron que el efecto máximo aparecía a concentraciones plasmáticas de DZ mayores de 2000 ng/mL. En nuestro estudio las concentraciones máximas de DZ no alcanzan este valor ( $C_{max}$  inferiores a 1650 ng/mL en todos los voluntarios) lo que explicaría por qué nosotros no hemos podido emplear un modelo de Efecto máximo. Aunque Greenblatt y colaboradores también describieron la relación entre el efecto (en términos de  $\sigma+\beta$ ) observado tras dosis iv de 0.15 mg/kg de DZ, y las concentraciones de este fármaco mediante un modelo de  $E_{max}$  sigmoide no pudieron aplicarlo de forma individual a todos los participantes del estudio si no que lo aplicaron a la media de los datos o al total de los datos asumiendo que todos los datos provenían del mismo participante, lo que podría estar mostrando las dificultades de poder aplicar un modelo de  $E_{max}$  a dosis tan bajas (Greenblatt 1989a).

Posiblemente la mayor limitación del presente estudio esté relacionada con el diseño empleado y la aplicación de modelado y simulación farmacocinético/farmacodinámico poblacional. Si bien es cierto, que los parámetros poblacionales estimados son comparables a los que existen en la literatura con respecto a los dos fármacos, hay que mencionar que esta estimación solo ha sido posible fijando los estimados bayesianos individuales de una de las dos especies activas (DMDZ). El intento por analizar de forma simultánea ambos compuestos originó estimados de los parámetros poco plausibles. No es de extrañar, ya que esta situación había sido descrita anteriormente por Tuk y colaboradores (Tuk et al., 1999) que concluyeron que las interacciones farmacodinámicas entre 2 agonistas (fármaco y metabolito activo) solo se pueden caracterizar adecuadamente *in vivo* utilizando un modelo de interacción mecanístico y no empírico como el empleado en nuestro estudio. Sin embargo, esta limitación no invalida nuestros resultados, ya que nuestro objetivo era cuantificar el efecto de DMDZ en el efecto de DZ, y no cuantificar de manera simultánea el efecto provocado por dos especies activas. Los resultados de nuestro estudio por

tanto apoyan la hipótesis de Tuk y colaboradores, y en un futuro permitirán emplear diseños específicos en función del objetivo planteado.

### **Test de cancelación d2 y VAS**

Existe una batería de medidas para evaluar diferentes tipos de atención (escaneo visual, seguimiento y atención sostenida) (Bates and Lemay, 2004). En nuestro estudio pretendíamos evaluar si DZ o DMDZ producían déficits en la atención, por lo que seleccionamos el denominado test d2, desarrollado por Brickenkamp (Brickenkamp, 1962). Este test es una medida concisa de atención selectiva y concentración mental y que en comparación con otros tests, presenta la ventaja de que es fácil de realizar, no requiere demasiadas instrucciones, es corto y presenta buenas propiedades psicométricas (Brickenkamp and Zillmer, 1998a; Seisdedos, 2004). Permite controlar tanto la velocidad como la calidad de la atención, para lo cuál es necesario evaluar tanto las respuestas totales (d2t) como las respuestas correctas (d2c). Se sabe que tras la administración de test que evalúan el rendimiento psicomotor, a pesar de haber entrenado previamente a los voluntarios, sigue existiendo un fenómeno de aprendizaje; motivo por el cuál es recomendable incluir la administración de placebo en estos estudios para evaluar el efecto de fármacos, ya que el efecto que produzcan será mayor que si no se tuviera en cuenta este fenómeno (Barbanoj et al., 2006; Mattila et al., 1986; Mattila et al., 1993; Mattila et al., 1987). En nuestro trabajo se ha observado un ligero incremento en el número de respuestas tanto totales como correctas a lo largo de las 12 horas de duración del mismo tras la administración de placebo, lo que podría indicar que efectivamente ha habido un cierto aprendizaje a lo largo del tiempo en la realización de este test (Barbanoj, 1991; Barbanoj et al., 2006; Bates and Lemay, 2004).

La administración de DZ y DMDZ disminuyó el número de d2t y de d2c con respecto a la administración de placebo, indicando que ambos compuestos producen un descenso del rendimiento psicomotor. Este efecto había sido previamente descrito para DZ aplicando otras medidas como el flicker fusion (Mattila et al., 1993), pruebas de lápiz y papel como el test de sustitución de dígitos (Jensen et al., 1997; Mattila et al., 1993), el Trieger dot test, el test de velocidad perceptual (Jensen et al., 1997), el test de Maddox o el de velocidad de tapping (Mattila et al., 1986). Si bien, nuestro estudio aporta información sobre el hecho de que ambos fármacos tras su ingesta, disminuyen la velocidad de procesamiento y la cantidad de trabajo que puede desarrollar un sujeto, por disminuir el número de d2t, así como la precisión con la que se realizan las tareas como muestra el hecho de que el número de d2c también disminuye. Este tipo de patrón sobre la medida d2 se ha descrito para otras benzodiazepinas como alprazolam (Barbanoj et al., 2007) o lorazepam (García-Gea et al., 2010).

Está estudiado que el ritmo circadiano está presente en casi todas las variables que describen la somnolencia y el rendimiento neuroconductual (Van Dongen and Dinges, 2005) y por lo tanto resulta plausible pensar en que la somnolencia puede aparecer tras el tratamiento con placebo

independientemente del tipo de fármaco que se esté estudiando. La somnolencia subjetiva observada en el VAS (somnoliento-despierto) en nuestro estudio, creemos que puede haber sido provocada por varios motivos: aburrimiento durante las sesiones experimentales, la falta de ingesta habitual de café, xantinas u otros estimulantes, e incluso al hecho de que los voluntarios conocen que en 3 de las 4 sesiones de estudio van a recibir una benzodiazepina a dosis altas, y por lo tanto, hay una cierta expectativa a notar los síntomas de las benzodiazepinas, y el más frecuente es la somnolencia. Los 2 tratamientos activos producen un efecto rápido de aumento de somnolencia y disminución de la actividad con respecto a la situación placebo. Este efecto es esperable ya que se conoce que las benzodiazepinas producen somnolencia (Hillestad et al., 1974; Lu and Greco, 2006), y se han descrito estudios similares con el propio diazepam (Friedman et al., 1992; Mattila et al., 1987), alprazolam (Barbanoj et al., 2007; Fleishaker et al., 1995), triazolam (Kroboth et al., 1993) o lorazepam (Garcia-Gea et al., 2010). Sin embargo, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el efecto producido por DZ y DMDZ.

### **Reproducibilidad, falta de tolerancia y sensibilización**

A pesar de que la tolerancia se ha descrito de forma aguda, en periodos de minutos a horas, tras dosis únicas de algunas benzodiazepinas, su mecanismo de desarrollo no está claro (Barbanoj et al., 2007; Wong et al., 1986). En humanos, se ha descrito tolerancia aguda a los efectos psicomotores tras administraciones orales de DZ (Ellinwood et al., 1985; Ellinwood et al., 1983; Ellinwood et al., 1987), sin embargo, en nuestro estudio no observamos indicadores de posible desarrollo de tolerancia tras una administración de DZ o DMDZ en ninguno de los efectos medidos (EEG: poder relativo alfa, poder relativo beta; rendimiento psicomotor: d2c, d2t o VAS: somnoliento-despierto, activo-pasivo).

Además se ha descrito que tras administraciones agudas separadas a intervalos concretos de tiempo entre ellas, algunas benzodiazepinas pueden provocar aparición del fenómeno opuesto, es decir sensibilización a los efectos medidos. Así por ejemplo Kroboth y colaboradores (Kroboth et al., 1995) mostraron que el efecto de triazolam cuando se administra en dosis separadas una semana, aumenta. Para ello realizaron un análisis en el que se incluyeron datos provenientes de tres estudios realizados con triazolam en los que se determinó el efecto sobre el rendimiento psicomotor usando como medidas el test de sustitución de dígitos y el test de conducta continuo. También se ha descrito este efecto tras la administración de DZ en ratas, pero empleando el EEG como medida y tras la administración de dosis únicas separadas 15 días (Antelman et al., 1989). En nuestro caso, tampoco observamos indicios de sensibilización a los efectos de capacidad de atención y concentración mental (evaluados mediante d2c y d2t), a la somnolencia y actividad (evaluados de manera subjetiva mediante VAS) o a los efectos sobre las variables del EEG, ya que estos efectos han sido reproducibles en la mayoría de voluntarios, tras la administración de DZ en dosis únicas separadas entre 5 y 15 semanas entre ellas. Este último resultado es de gran interés ya que para usar una variable como biomarcador hay que mostrar que los resultados

obtenidos sobre esta variable son reproducibles (Kuhlmann and Wensing, 2006). Los resultados del presente trabajo (tanto los obtenidos tras el análisis modelo independiente como tras el análisis modelístico) revelan, por primera vez en humanos sanos, que los efectos de dosis orales únicas de DZ sobre el EEG tanto sobre el poder relativo beta como sobre el poder relativo alfa son reproducibles a nivel de individuo.

### **Seguridad**

Tanto tras ambas administraciones de DZ como tras la administración de DMDZ los 2 acontecimientos adversos que se comunicaron con mayor frecuencia fueron somnolencia e hipo y en menor frecuencia cefalea, gastralgia, inestabilidad, relajación muscular, mareo, sedación, desorientación, angustia, diplopía, trastorno en la regulación de la temperatura y aturdimiento y sensación de sentirse colocado. La mayoría de acontecimientos adversos comunicados tras la administración de 30 mg de DZ y DMDZ han sido descritos en la ficha técnica del producto para DZ (AEMPS, 2013) y DMDZ (ANSM, 2013b) y son similares a los descritos para otras benzodiazepinas (Sweetman, 2009) especialmente los 2 observados con mayor frecuencia en nuestro estudio, la somnolencia (Barbanoj et al., 2007) y el hipo (Thompson and Landry, 1997), no observándose diferencias entre DZ y DMDZ, sin que ninguno de ellos se tuviera que notificar como acontecimiento adverso grave.

Ni DZ ni DMDZ a dosis de 30mg producen efectos cardiovasculares como hipotensión o bradicardia. Aunque hay autores que indican que las benzodiazepinas pueden provocar efectos hipotensores por mecanismos que no están claros (Kitajima et al., 2004; Marty et al., 1986), respecto a DZ los estudios realizados no son concluyentes en ese sentido. Así tras la administración de 5 mg por vía iv de DZ (Kitajima et al., 2004) se observaron disminuciones en los valores de TAS y TAD con respecto al valor basal aunque en otro estudio (Marty et al., 1986) en el que administran dosis iv de 0.4 mg/kg (una dosis cercana a la nuestra de 30 mg), solo observan una disminución en la TAS pero no de la TAD ni el la FC. A pesar de que en ninguno de los dos estudios determinan las concentraciones de DZ o DMDZ, considerando la vía de administración y el hecho de que DZ no sufre apenas efecto de primer paso, las concentraciones de ambos compuestos en nuestro estudio deberían ser inferiores a las del estudio de Marty y colaboradores, por tanto quedaría justificado por qué no hay efecto sobre la presión arterial en nuestro estudio. No obstante, tras DMDZ, se observó una ligera disminución de la TAS durante la mayor parte del estudio, aunque no fue inferior a 90 mm Hg en ningún caso y por tanto no podemos considerarlo hipotensión. Este hecho es otro de los motivos por los cuales no recomendaríamos la administración de 30 mg de DMDZ cada 12 horas como sustituto de 5 mg de DZ cada 12 h, ya que administrando DMDZ cada 12 h el efecto sobre la presión arterial podría ser mayor. De forma global ni DZ ni DMDZ provocaron efectos sobre la FC, y las pequeñas modificaciones observadas a nivel individual siempre estuvieron dentro del rango de normalidad. Estos resultados están en la línea de lo indicado en ficha técnica (AEMPS, 2013) en el sentido que DZ puede producir aumento

de la frecuencia cardíaca pero sus efectos son mínimos, y son similares a los descritos por otros autores a dosis similares a nuestros 30 mg, de 0.4 mg/kg iv de DZ en humanos (Marty et al., 1986). Puesto que como se ha comentado anteriormente, los cambios en la TAS observados tras la administración de DMDZ no tuvieron relevancia clínica, y los cambios en la FC fueron puntuales y sin significación clínica, podemos concluir que DZ y DMDZ administrados a dosis altas son seguros a nivel cardiovascular.



---

---

**VII.**

## **Conclusiones**

---

---



1. Los procesos de absorción y disposición de DMDZ se han podido describir mediante un modelo bicompartimental con absorción y eliminación de primer orden. Presenta una absorción rápida con  $k_a$  de  $0.0734 \text{ min}^{-1}$ , volumen de distribución superior al volumen acuoso del organismo de 58 L y un aclaramiento plasmático de  $0.0095 \text{ L/min}$ . La eliminación es el proceso con menor variabilidad interindividual estimada (46%).
2. El modelo farmacocinético desarrollado para describir de manera simultánea las concentraciones de DZ y DMDZ fue un modelo un modelo bicompartimental con absorción y eliminación de primer orden para ambos compuestos. La constante de absorción de DZ ( $k_a=0.046 \text{ min}^{-1}$ ) es más lenta que la de DMDZ, su  $V_d$  (49.8 L) es similar, y su aclaramiento ( $0.015 \text{ L/min}$ ) es mayor. El proceso con menor variabilidad interindividual asociada es la eliminación (33%), además la absorción de DZ presenta un 18% de variabilidad interocasiones.
3. La modificación observada en el EEG durante la vigilia tras la administración de una dosis única alta (30 mg) de DMDZ se caracteriza por un descenso en el poder relativo alfa y un aumento en el poder relativo beta sin que llegue a recuperarse el valor basal tras 12h.
4. La administración de 30 mg de DZ por vía oral provocan también un descenso del poder relativo alfa y un aumento del poder relativo beta del EEG durante la vigilia, sin que llegue a recuperarse el valor basal después de 12h.
5. El efecto sobre el poder relativo alfa producido por DZ es de mayor magnitud y aparece antes que tras la administración de DMDZ (efecto máximo observado 26 % vs 22.9 %, y  $t_{max}$  135 min vs 180 min). El mismo patrón se observa en el poder relativo beta, DZ produce un mayor efecto máximo (25.54% vs 19.30%) y aparece antes (105 min vs 180 min).
6. La relación entre las concentraciones plasmáticas de DMDZ y el efecto observado sobre el poder relativo beta del EEG tras la administración de 30 mg de DMDZ se ha descrito adecuadamente empleando un modelo de efecto máximo reparametrizado, con valores de  $E_0=18.9 \%$  y  $S_0=0.084$ .  $S_0$  tiene asociada una variabilidad interindividual del 59.3%.
7. El modelo FC/FD que describe el efecto que provocan 30 mg de DZ por vía oral en la variable del EEG poder relativo beta, asume una interacción aditiva con un modelo de relación lineal entre las concentraciones de DZ y el efecto y un modelo de efecto máximo reparametrizado entre las concentraciones de DMDZ y el efecto. El efecto debido a la formación de DMDZ en esta situación es de un 29.7%, aunque para una correcta caracterización del modelo ha sido necesario fijar los estimados individuales bayesianos del DMDZ.
8. La administración de 30 mg de DMDZ por vía oral provoca un descenso en la velocidad de procesamiento y en la cantidad y precisión de trabajo que puede desarrollar un sujeto, asociado a un incremento de la somnolencia y de la pasividad. A pesar de ello, esta dosis de

DMDZ no ha ocasionado ningún acontecimiento adverso no esperado ni grave, ni efectos clínicamente significativos en las constantes vitales evaluadas (TAS, TAD y FC) por lo que se ha demostrado segura.

9. La administración de 30 mg de DZ por vía oral provoca un descenso en la velocidad de procesamiento y en la cantidad y precisión de trabajo que puede desarrollar un sujeto, asociado a un incremento de la somnolencia y de la pasividad. A pesar de ello, esta dosis de DZ no ha ocasionado ningún acontecimiento adverso no esperado ni grave, ni efectos clínicamente significativos en las constantes vitales evaluadas (TAS, TAD y FC) por lo que también se ha demostrado segura.
10. La administración de 30 mg de DZ y DMDZ no se diferencian cuantitativamente en los efectos que producen a nivel de rendimiento psicomotor, ni en la percepción que tienen los voluntarios (variables subjetivas), ni en el perfil de seguridad.
11. Los efectos tras dosis orales únicas de 30 mg DZ sobre el EEG, tanto sobre el poder relativo alfa como sobre el poder relativo beta, así como sobre el rendimiento psicomotor, las variables subjetivas evaluadas y los efectos cardiovasculares son reproducibles a nivel de individuo. Este resultado es especialmente importante respecto al EEG ya que es una de las características necesarias para que una variable pueda considerarse como biomarcador.
12. Además de poder cuantificar el efecto debido a la formación de DMDZ tras administrar 30mg de DZ, el modelo desarrollado predice que el efecto debido al DMDZ tras la administración de dosis de DZ utilizadas en la práctica clínica (5 mg/12 h) cuando se emplea la variable poder relativo beta como medida es de un 66.6%.

---

---

**VIII.**

## **Bibliografía**

---

---



- Abernethy, D. R., Greenblatt, D. J., 1981. Effects of desmethyldiazepam on diazepam kinetics: a study of effects of a metabolite on parent drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 29, 757-761.
- Abernethy, D. R., Greenblatt, D. J., Divoll, M., Shader, R. I., 1983. Prolonged accumulation of diazepam in obesity. *J Clin Pharmacol* 23, 369-376.
- Abruzzo, C. W., Macasieb, T., Weinfeld, R., Rider, J. A., Kaplan, S. A., 1977. Changes in the oral absorption characteristics in man of dipotassium clorazepate at normal and elevated gastric pH. *J Pharmacokinet Biopharm* 5, 377-390.
- AEMPS, 2013. Ficha técnica de Valium. Roche Pharma.
- AEMPS, 2014. Utilización de medicamentos ansiolíticos en hipnóticos en España durante el periodo 2000-2012.
- AFMPS, 2015. Calmday 5 et 10 mg comprimés enrobés. Agencia Federal de medicamentos y productos de la salud de Bélgica.
- Agarwal, S. K., Kriel, R. L., Brundage, R. C., Ivaturi, V. D., Cloyd, J. C., 2013. A pilot study assessing the bioavailability and pharmacokinetics of diazepam after intranasal and intravenous administration in healthy volunteers. *Epilepsy Res* 105, 362-367.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19, 716-723.
- Allison, C., Pratt, J. A., 2003. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol Ther* 98, 171-195.
- Altamura, A. C., Moliterno, D., Paletta, S., Maffini, M., Mauri, M. C., Bareggi, S., 2013. Understanding the pharmacokinetics of anxiolytic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9, 423-440.
- Amin, J., Weiss, D. S., 1994. Homomeric rho 1 GABA channels: activation properties and domains. *Receptors Channels* 2, 227-236.
- Anderer, P., Semlitsch, H. V., Saletu, B., Barbanoj, M. J., 1992. Artifact processing in topographic mapping of electroencephalographic activity in neuropsychopharmacology. *Psychiatry Res* 45, 79-93.
- Andersson, T., Cederberg, C., Edvardsson, G., Heggelund, A., Lundborg, P., 1990. Effect of omeprazole treatment on diazepam plasma levels in slow versus normal rapid metabolizers of omeprazole. *Clin Pharmacol Ther* 47, 79-85.
- Andersson, T., Miners, J. O., Veronese, M. E., Birkett, D. J., 1994. Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms. *Br J Clin Pharmacol* 38, 131-137.
- ANSM, 2013a. Nordaz 15mg comprimé quadrisécable. Agencia Francesa de la Seguridad Sanitaria de los Productos para la Salud.
- ANSM, 2013b. Praxadium 15mg comprimé quadrisécable. Agencia Francesa de la Seguridad Sanitaria de los Productos para la Salud.
- Antelman, S. M., Kocan, D., Edwards, D. J., Knopf, S., 1989. Anticonvulsant and other effects of diazepam grow with time after a single treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 33, 31-39.

- Arendt, R. M., Greenblatt, D. J., deJong, R. H., Bonin, J. D., Abernethy, D. R., Ehrenberg, B. L., Giles, H. G., Sellers, E. M., Shader, R. I., 1983. In vitro correlates of benzodiazepine cerebrospinal fluid uptake, pharmacodynamic action and peripheral distribution. *J Pharmacol Exp Ther* 227, 98-106.
- Arendt, R. M., Greenblatt, D. J., Liebisch, D. C., Luu, M. D., Paul, S. M., 1987. Determinants of benzodiazepine brain uptake: lipophilicity versus binding affinity. *Psychopharmacology (Berl)* 93, 72-76.
- Arnaud, C., Gauthier, P., Gottesmann, C., 2001. Study of a GABAC receptor antagonist on sleep-waking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 154, 415-419.
- Ashton, H., 1994. The treatment of benzodiazepine dependence. *Addiction* 89, 1535-1541.
- Atack, J. R., Hutson, P. H., Collinson, N., Marshall, G., Bentley, G., Moyes, C., Cook, S. M., Collins, I., Wafford, K., McKernan, R. M., Dawson, G. R., 2005. Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha3 subunit-containing GABA A receptors. *Br J Pharmacol* 144, 357-366.
- Atkinson, A. J., Colburn, W., DeGruttola, V., DeMets, D., Downing, G., Hoth, D., 2001. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95.
- Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R., Seale, B., 1950. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* 187, 35-39.
- Barbanoj, M., 1991. Efectos sobre el S.N.C de los ansiolíticos en el hombre. Estudios con buspirona y diazepam utilizando pruebas de rendimiento psicomotor, medidas electrofisiológicas (potenciales evocados, cartografía topográfica de la F-EEG-C) y escalas de evaluación autosubjetiva Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Barbanoj, M., Anderer, P., Antonijoan, R., Torrent, J., Saletu, B., Jane, F., 1994. Topographic pharmaco-EEG mapping of increasing doses of buspirone and its comparison with diazepam. *Hum Psychopharmacol* 9, 101-109.
- Barbanoj, M. J., Garcia-Gea, C., Antonijoan, R., Izquierdo, I., Donado, E., Perez, I., Solans, A., Jane, F., 2006. Evaluation of the cognitive, psychomotor and pharmacokinetic profiles of rupaadine, hydroxyzine and cetirizine, in combination with alcohol, in healthy volunteers. *Hum Psychopharmacol* 21, 13-26.
- Barbanoj, M. J., Urbano, G., Antonijoan, R., Ballester, M. R., Valle, M., 2007. Different acute tolerance development to EEG, psychomotor performance and subjective assessment effects after two intermittent oral doses of alprazolam in healthy volunteers. *Neuropsychobiology* 55, 203-212.
- Barter, Z. E., Tucker, G. T., Rowland-Yeo, K., 2013. Differences in cytochrome p450-mediated pharmacokinetics between chinese and caucasian populations predicted by mechanistic physiologically based pharmacokinetic modelling. *Clin Pharmacokinet* 52, 1085-1100.
- Baskaran, A., Milev, R., McIntyre, R. S., 2012. The neurobiology of the EEG biomarker as a predictor of treatment response in depression. *Neuropharmacology* 63, 507-513.
- Bates, M. E., Lemay, E. P., Jr., 2004. The d2 Test of attention: construct validity and extensions in scoring techniques. *J Int Neuropsychol Soc* 10, 392-400.
- Bateson, A. N., 2002. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des* 8, 5-21.
- Bauer, R. J., Guzy, S., Ng, C., 2007. A survey of population analysis methods and software for complex pharmacokinetic and pharmacodynamic models with examples. *AAPS J* 9, E60-83.

- Beal, S. L., 1992. NONMEM users guides.
- Bellissant, E., Sebillé, V., Paintaud, G., 1998. Methodological issues in pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling. *Clin Pharmacokinet* 35, 151-166.
- Bente, D., Iltl, T., 1954. [The EEG effect of megaphen.]. *Arzneimittelforschung* 4, 418-423.
- Berger, H., 1938. Das Elektroencephalogramm des Menschen. *Naturforscher*.
- Bertilsson, L., Henthorn, T. K., Sanz, E., Tybring, G., Sawe, J., Villen, T., 1989. Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquin, hydroxylation phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 45, 348-355.
- Bertrand, J., Laffont, C. M., Mentre, F., Chenel, M., Comets, E., 2011. Development of a complex parent-metabolite joint population pharmacokinetic model. *AAPS J* 13, 390-404.
- Biomarkers Definitions, W. G., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95.
- BOE, 1990. Ley del Medicamento.
- Boeckman, A., Sheiner, LB, Beal, SL, 1994. NONMEM: Users Guide. Part V, San Francisco, CA.
- Boeckman AJ, S. L., Beal SL, 1994. NONMEM: Users Guide. Part V, San Francisco, CA.
- Bond A, M, L., 1974. The use of analogue scales in rating subjective feelings. *Br J Psychol* 47, 211-218.
- Bond, A. J., Hailey, D. M., Lader, M. H., 1977. Plasma concentrations of benzodiazepines. *Br J Clin Pharmacol* 4, 51-56.
- Borea, P. A., Bonora, A., 1983. Brain receptor binding and lipophilic character of benzodiazepines. *Biochem Pharmacol* 32, 603-607.
- Bormann, J., 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21, 16-19.
- Bornemann, L. D., Crews, T., Chen, S. S., Twardak, S., Patel, I. H., 1986. Influence of food on midazolam absorption. *J Clin Pharmacol* 26, 55-59.
- Bowery, N. G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J. P., Marshall, F., Raiteri, M., Bonner, T. I., Enna, S. J., 2002. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev* 54, 247-264.
- Bowery, N. G., Hill, D. R., Hudson, A. L., Doble, A., Middlemiss, D. N., Shaw, J., Turnbull, M., 1980. (-)-Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283, 92-94.
- Breimer, D. D., Jochemsen, R., von Albert, H. H., 1980. Pharmacokinetics of benzodiazepines. Short-acting versus long-acting. *Arzneimittelforschung* 30, 875-881.
- Breimer, L. T., Hennis, P. J., Burm, A. G., Danhof, M., Bovill, J. G., Spierdijk, J., Vletter, A. A., 1990. Quantification of the EEG effect of midazolam by aperiodic analysis in volunteers. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Clin Pharmacokinet* 18, 245-253.
- Brickenkamp, R., 1962. Aufmerksamkeits-Belastungs-Test (test d2). Hogrefe & Huber, Göttingen.
- Brickenkamp, R., Zillmer, E., 1998a. The d2 test of attention, Göttingen.

- Brickenkamp, R., Zillmer, E. A., (Eds), 1998b. The d2 Test of Attention. Hogrefe & Huber, Seattle, Whashington.
- Brown, R. E., Basheer, R., McKenna, J. T., Strecker, R. E., McCarley, R. W., 2012. Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev* 92, 1087-1187.
- Bührer, M., Maitre, P. O., Crevoisier, C., Stanski, D. R., 1990a. Electroencephalographic effects of benzodiazepines. II. Pharmacodynamic modeling of the electroencephalographic effects of midazolam and diazepam. *Clin Pharmacol Ther* 48, 555-567.
- Bührer, M., Maitre, P. O., Hung, O., Stanski, D. R., 1990b. Electroencephalographic effects of benzodiazepines. I. Choosing an electroencephalographic parameter to measure the effect of midazolam on the central nervous system. *Clin Pharmacol Ther* 48, 544-554.
- Calcaterra, N. E., Barrow, J. C., 2014. Classics in chemical neuroscience: diazepam (valium). *ACS Chem Neurosci* 5, 253-260.
- Cantero, J. L., Atienza, M., Salas, R. M., 2002. Human alpha oscillations in wakefulness, drowsiness period, and REM sleep: different electroencephalographic phenomena within the alpha band. *Neurophysiol Clin* 32, 54-71.
- CDER, 2001. Guidance for industry: bioanalytical method validation. FDA, Rockville, MD, pp. 1-22.
- CDER, U. S. D. o. H. a. H. S. F. a. D. A., 2003. Guidance for Industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products -General considerations.
- Chebib, M., Hinton, T., Schmid, K. L., Brinkworth, D., Qian, H., Matos, S., Kim, H. L., Abdel-Halim, H., Kumar, R. J., Johnston, G. A., Hanrahan, J. R., 2009. Novel, potent, and selective GABAC antagonists inhibit myopia development and facilitate learning and memory. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 448-457.
- Chebib, M., Johnston, G. A., 1999. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 937-940.
- Chen, Y., Zhou, D., Zhou, K., Ren, Y., Dai, W., Xu, M., Lu, L., Lu, Z., 2007. Study on olfactory function in GABAC receptor/channel rho1 subunit knockout mice. *Neurosci Lett* 427, 10-15.
- Christian, E. P., Snyder, D. H., Song, W., Gurley, D. A., Smolka, J., Maier, D. L., Ding, M., Gharahdaghi, F., Liu, X. F., Chopra, M., Ribadeneira, M., Chapdelaine, M. J., Dudley, A., Arriza, J. L., Maciag, C., Quirk, M. C., Doherty, J. J., 2015. EEG-beta/gamma spectral power elevation in rat: a translatable biomarker elicited by GABA(A $\alpha$ 2/3)-positive allosteric modulators at non-sedating anxiolytic doses. *J Neurophysiol* 113, 116-131.
- Ciraulo, D. A., Barnhill, J. G., Ciraulo, A. M., Sarid-Segal, O., Knapp, C., Greenblatt, D. J., Shader, R. I., 1997. Alterations in pharmacodynamics of anxiolytics in abstinent alcoholic men: subjective responses, abuse liability, and electroencephalographic effects of alprazolam, diazepam, and buspirone. *J Clin Pharmacol* 37, 64-73.
- Claria, F., Vallverdu, M., Riba, J., Romero, S., Barbanoj, M. J., Caminal, P., 2011. Characterization of the cerebral activity by time-frequency representation of evoked EEG potentials. *Physiol Meas* 32, 1327-1346.
- Coburn, K. L., Lauterbach, E. C., Boutros, N. N., Black, K. J., Arciniegas, D. B., Coffey, C. E., 2006. The value of quantitative electroencephalography in clinical psychiatry: a report by the Committee on Research of the American Neuropsychiatric Association. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 18, 460-500.
- Coenen, A. M., van Luitelaar, E. L., 1991. Pharmacological dissociation of EEG and behavior: a basic problem in sleep-wake classification. *Sleep* 14, 464-465.

- Collinson, N., Kuenzi, F. M., Jarolimek, W., Maubach, K. A., Cothliff, R., Sur, C., Smith, A., Otu, F. M., Howell, O., Atack, J. R., McKernan, R. M., Seabrook, G. R., Dawson, G. R., Whiting, P. J., Rosahl, T. W., 2002. Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci* 22, 5572-5580.
- Coppola, R., Herrmann, W. M., 1987. Psychotropic drug profiles: comparisons by topographic maps of absolute power. *Neuropsychobiology* 18, 97-104.
- Cosson, V., Jorga, K., Fuseau, E., 2007. Modeling of metabolite pharmacokinetics in a large pharmacokinetic data set: an application. In: Ette, E., William, P., (Eds), *Pharmacometrics: the science of quantitative pharmacology*. Jon Wiley & Sons, Inc, pp. 1007-1136.
- Court, M. H., Duan, S. X., Guillemette, C., Journault, K., Krishnaswamy, S., Von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., 2002. Stereoselective conjugation of oxazepam by human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): S-oxazepam is glucuronidated by UGT2B15, while R-oxazepam is glucuronidated by UGT2B7 and UGT1A9. *Drug Metab Dispos* 30, 1257-1265.
- Crestani, F., Assandri, R., Tauber, M., Martin, J. R., Rudolph, U., 2002a. Contribution of the alpha1-GABA(A) receptor subtype to the pharmacological actions of benzodiazepine site inverse agonists. *Neuropharmacology* 43, 679-684.
- Crestani, F., Keist, R., Fritschy, J. M., Benke, D., Vogt, K., Prut, L., Bluthmann, H., Mohler, H., Rudolph, U., 2002b. Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8980-8985.
- Crestani, F., Lorez, M., Baer, K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J. P., Belzung, C., Fritschy, J. M., Luscher, B., Mohler, H., 1999. Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci* 2, 833-839.
- Crestani, F., Low, K., Keist, R., Mandelli, M., Mohler, H., Rudolph, U., 2001. Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol* 59, 442-445.
- Crittenden, D. L., Kumar, R. J., Hanrahan, J. R., Chebib, M., Jordan, M. J., 2005. Stabilization of zwitterions in solution: phosphinic and phosphonic acid GABA analogues. *J Phys Chem A* 109, 8398-8409.
- Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B. F., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhl, G. R., et al., 1991. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2673-2677.
- Danhof, M., de Jongh, J., De Lange, E. C., Della Pasqua, O., Ploeger, B. A., Voskuyl, R. A., 2007. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling: biophase distribution, receptor theory, and dynamical systems analysis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 357-400.
- Dasberg, H. H., 1975. Effects and plasma levels of N-desmethyldiazepam after oral administration in normal volunteers. *Psychopharmacologia* 43, 191-198.
- de Visser, S. J., van der Post, J., Pieters, M. S., Cohen, A. F., van Gerven, J. M., 2001. Biomarkers for the effects of antipsychotic drugs in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 51, 119-132.
- Derendorf, H., Meibohm, B., 1999. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. *Pharm Res* 16, 176-185.

- Dias, R., Sheppard, W. F., Fradley, R. L., Garrett, E. M., Stanley, J. L., Tye, S. J., Goodacre, S., Lincoln, R. J., Cook, S. M., Conley, R., Hallett, D., Humphries, A. C., Thompson, S. A., Wafford, K. A., Street, L. J., Castro, J. L., Whiting, P. J., Rosahl, T. W., Atack, J. R., McKernan, R. M., Dawson, G. R., Reynolds, D. S., 2005. Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABAA receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J Neurosci* 25, 10682-10688.
- Dingemans, J., Haussler, J., Hering, W., Ihmsen, H., Albrecht, S., Zell, M., Schwilden, H., Schuttler, J., 1997a. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the EEG effects of Ro 48-6791, a new short-acting benzodiazepine, in young and elderly subjects. *Br J Anaesth* 79, 567-574.
- Dingemans, J., van Gerven, J. M., Schoemaker, R. C., Roncari, G., Obery, J. J., van Oostenbruggen, M. F., Massarella, J., Segala, P., Zell, M., Cohen, A. F., 1997b. Integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics of Ro 48-6791, a new benzodiazepine, in comparison with midazolam during first administration to healthy male subjects. *Br J Clin Pharmacol* 44, 477-486.
- Divoll, M., Greenblatt, D. J., Ciraulo, D. A., Puri, S. K., Ho, I., Shader, R. I., 1982. Clobazam kinetics: intrasubject variability and effect of food on adsorption. *J Clin Pharmacol* 22, 69-73.
- Divoll, M., Greenblatt, D. J., Ochs, H. R., Shader, R. I., 1983. Absolute bioavailability of oral and intramuscular diazepam: effects of age and sex. *Anesth Analg* 62, 1-8.
- Dorow, R. G., Seidler, J., Schneider, H. H., 1982. A radioreceptor assay to study the affinity of benzodiazepines and their receptor binding activity in human plasma including their active metabolites. *Br J Clin Pharmacol* 13, 561-565.
- Duffull, S. B., Chabaud, S., Nony, P., Laveille, C., Girard, P., Aarons, L., 2000. A pharmacokinetic simulation model for ivabradine in healthy volunteers. *Eur J Pharm Sci* 10, 285-294.
- Eatman, F. B., Colburn, W. A., Boxenbaum, H. G., Posmanter, H. N., Weinfeld, R. E., Ronfeld, R., Weissman, L., Moore, J. D., Gibaldi, M., Kaplan, S. A., 1977. Pharmacokinetics of diazepam following multiple-dose oral administration to healthy human subjects. *J Pharmacokinetics Biopharm* 5, 481-494.
- Ellinwood, E. H., Jr., Heatherly, D. G., Nikaido, A. M., Bjornsson, T. D., Kilts, C., 1985. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of lorazepam, alprazolam and diazepam. *Psychopharmacology (Berl)* 86, 392-399.
- Ellinwood, E. H., Jr., Linnoila, M., Easler, M. E., Molter, D. W., 1983. Profile of acute tolerance to three sedative anxiolytics. *Psychopharmacology (Berl)* 79, 137-141.
- Ellinwood, E. H., Jr., Nikaido, A. M., Heatherly, D. G., Bjornsson, T. D., 1987. Benzodiazepine pharmacodynamics: evidence for biophase rate limiting mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 91, 168-174.
- EMA, 1995. Note for Guidance on validation of analytical methods: definitions and terminology. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London, p. 5.
- Enz, R., Cutting, G. R., 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38, 1431-1441.
- Erdman, K., Stypinski, D., Combs, M., Witt, P., Stiles, M., Pollock, S., 2007. Absence of food effect on the extent of alprazolam absorption from an orally disintegrating tablet. *Pharmacotherapy* 27, 1120-1124.

- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Luscher, B., 1998. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1, 563-571.
- Fernandez-Real, J. M., Ricart-Engel, W., Camafort-Babkowski, M., 1994. Hyponatremia and benzodiazepines result in rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother* 28, 1200-1201.
- Fink, M., 1959. EEG and behavioral effects of psychopharmacology agents. In: Bradley PB, D. P., Radouoco-Thomas C, (Ed), *Neuropsychopharmacology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 441-446.
- Fiset, P., Lemmens, H. L., Egan, T. D., Shafer, S. L., Stanski, D. R., 1995. Pharmacodynamic modeling of the electroencephalographic effects of flumazenil in healthy volunteers sedated with midazolam. *Clin Pharmacol Ther* 58, 567-582.
- Fleishaker, J., Chambers, J., Peters, G., 1995. Evaluation of the development of acute tolerance to the psychomotor effects of midazolam following intravenous infusions in healthy volunteers. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 10, 97-104.
- Flórez, J., 2003. Fármacos ansiolíticos y sedantes. In: Masson, (Ed), *Farmacología humana*, Barcelona, pp. 481-492.
- Foreman, J. C., Johansen, T., (Eds), 2003. *Textbook of receptor pharmacology*. CRC Press, Florida.
- Friberg, L. E., Vermeulen, A. M., Petersson, K. J., Karlsson, M. O., 2009. An agonist-antagonist interaction model for prolactin release following risperidone and paliperidone treatment. *Clin Pharmacol Ther* 85, 409-417.
- Friedman, H., Greenblatt, D. J., Peters, G. R., Metzler, C. M., Charlton, M. D., Harmatz, J. S., Antal, E. J., Sanborn, E. C., Francom, S. F., 1992. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral diazepam: effect of dose, plasma concentration, and time. *Clin Pharmacol Ther* 52, 139-150.
- Froestl, W., 2011. An historical perspective on GABAergic drugs. *Future Med Chem* 3, 163-175.
- Fryer, R. I., Leimgruber, W., Trybulski, E. J., 1982. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. 90. Structure-activity relationship between substituted 2-amino-N-(2-benzoyl-4-chlorophenyl)acetamides and 1,4-benzodiazepinones. *J Med Chem* 25, 1050-1055.
- Gabrielsson, J., Weiner, D., 1997. Non-compartmental analysis. In: Apotekarsocieteten, (Ed), *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications*. Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical, Stockhlo, Sweden, pp. 139-149.
- Galetin, A., Brown, C., Hallifax, D., Ito, K., Houston, J. B., 2004. Utility of recombinant enzyme kinetics in prediction of human clearance: impact of variability, CYP3A5, and CYP2C19 on CYP3A4 probe substrates. *Drug Metab Dispos* 32, 1411-1420.
- Gamel-Didelon, K., Kunz, L., Fohr, K. J., Gratzl, M., Mayerhofer, A., 2003. Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J Biol Chem* 278, 20192-20195.
- Garcia-Gea, C., Ballester, M. R., Martinez, J., Antonijoan, R. M., Donado, E., Izquierdo, I., Barbanoj, M. J., 2010. Rupaadine does not potentiate the CNS depressant effects of lorazepam: randomized, double-blind, crossover, repeated dose, placebo-controlled study. *Br J Clin Pharmacol* 69, 663-674.
- Garret, M., Poland, B., Brennan, M., Hee, B., Pithavala, Y. K., Amantea, M., 2013. Population pharmacokinetic analysis of axitinib in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 77, 480-492.

- Gavande, N., Kim, H. L., Doddareddy, M. R., Johnston, G. A., Chebib, M., Hanrahan, J. R., 2013. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Fluorescent and Biotinylated Antagonists of rho1 GABAC Receptors. *ACS Med Chem Lett* 4, 402-407.
- Gerecke, M., 1983. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *Br J Clin Pharmacol* 16 Suppl 1, 11S-16S.
- Ghoneim, M. M., Korttila, K., Chiang, C. K., Jacobs, L., Schoenwald, R. D., Mewaldt, S. P., Kayaba, K. O., 1981. Diazepam effects and kinetics in Caucasians and Orientals. *Clin Pharmacol Ther* 29, 749-756.
- Gilles, C., Luthringer, R., 2007. Pharmacological models in healthy volunteers: their use in the clinical development of psychotropic drugs. *J Psychopharmacol* 21, 272-282.
- Giudicelli, J. F., Berdeaux, A., Idrissi, N., Richer, C., 1978. Clazepam: pharmacokinetics and effects on performance. *Br J Clin Pharmacol* 5, 65-69.
- Gobbi, M., Barone, D., Mennini, T., Garattini, S., 1987. Diazepam and desmethyldiazepam differ in their affinities and efficacies at 'central' and 'peripheral' benzodiazepine receptors. *J Pharm Pharmacol* 39, 388-391.
- Goldensohn, E., 1997. Historical perspectives and future directions. In: Wyllie, E., (Ed), *The treatment of epilepsy: principles and practice*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Goldstein, L., Murphree, H. B., Sugerman, A. A., Pfeiffer, C. C., Jenney, E. H., 1963. Quantitative electroencephalographic analysis of naturally occurring (schizophrenic) and drug-induced psychotic states in human males. *Clin Pharmacol Ther* 4, 10-21.
- Goodman, Gilman's, 2011a. Drug therapy of depression and anxiety disorders. In: McGraw-Hill, (Ed), *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*, pp. 392-439.
- Goodman, Gilman's, 2011b. Hipnotics and Sedatives. In: McGraw-Hill, (Ed), *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*, pp. 440-459.
- Goodman, Gilman's, 2011c. Pharmacotherapy of the Epilepsies. In: McGraw-Hill, (Ed), *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*, pp. 555-584.
- Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P., 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 633-648.
- Greenblatt, D. J., 1987. Pharmacokinetics of antianxiety agents. *Psychopharmacology: the third generation of progress*, pp. 1377-1384.
- Greenblatt, D. J., Allen, M. D., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1980a. Diazepam disposition determinants. *Clin Pharmacol Ther* 27, 301-312.
- Greenblatt, D. J., Allen, M. D., MacLaughlin, D. S., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1978. Diazepam absorption: effect of antacids and food. *Clin Pharmacol Ther* 24, 600-609.
- Greenblatt, D. J., Divoll, M., Abernethy, D. R., Ochs, H. R., Shader, R. I., 1983. Clinical pharmacokinetics of the newer benzodiazepines. *Clin Pharmacokinet* 8, 233-252.
- Greenblatt, D. J., Divoll, M. K., Soong, M. H., Boxenbaum, H. G., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1988. Desmethyldiazepam pharmacokinetics: studies following intravenous and oral desmethyldiazepam, oral clorazepate, and intravenous diazepam. *J Clin Pharmacol* 28, 853-859.

- Greenblatt, D. J., Ehrenberg, B. L., Gunderman, J., Locniskar, A., Scavone, J. M., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1989a. Pharmacokinetic and electroencephalographic study of intravenous diazepam, midazolam, and placebo. *Clin Pharmacol Ther* 45, 356-365.
- Greenblatt, D. J., Ehrenberg, B. L., Gunderman, J., Scavone, J. M., Tai, N. T., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1989b. Kinetic and dynamic study of intravenous lorazepam: comparison with intravenous diazepam. *J Pharmacol Exp Ther* 250, 134-140.
- Greenblatt, D. J., Gan, L., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-dose triazolam: electroencephalography compared with the Digit-Symbol Substitution Test. *Br J Clin Pharmacol* 60, 244-248.
- Greenblatt, D. J., Harmatz, J. S., Friedman, H., Locniskar, A., Shader, R. I., 1989c. A large-sample study of diazepam pharmacokinetics. *Ther Drug Monit* 11, 652-657.
- Greenblatt, D. J., Harmatz, J. S., Gouthro, T. A., Locke, J., Shader, R. I., 1994. Distinguishing a benzodiazepine agonist (triazolam) from a nonagonist anxiolytic (buspirone) by electroencephalography: kinetic-dynamic studies. *Clin Pharmacol Ther* 56, 100-111.
- Greenblatt, D. J., Ochs, H. R., Lloyd, B. L., 1980b. Entry of diazepam and its major metabolite into cerebrospinal fluid. *Psychopharmacology (Berl)* 70, 89-93.
- Greenblatt, D. J., Shader, R. I., Harmatz, J. S., Franke, K., Koch-Weser, J., 1976. Influence of magnesium and aluminum hydroxide mixture on chlordiazepoxide absorption. *Clin Pharmacol Ther* 19, 234-239.
- Gueorguieva, I., Nestorov, I. A., Rowland, M., 2004a. Fuzzy simulation of pharmacokinetic models: case study of whole body physiologically based model of diazepam. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn* 31, 185-213.
- Gueorguieva, I., Nestorov, I. A., Murby, S., Gisbert, S., Collins, B., Dickens, K., Duffy, J., Hussain, Z., Rowland, M., 2004b. Development of a whole body physiologically based model to characterise the pharmacokinetics of benzodiazepines. 1: Estimation of rat tissue-plasma partition ratios. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn* 31, 269-298.
- Gulinello, M., Gong, Q. H., Li, X., Smith, S. S., 2001. Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha4 GABA(A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res* 910, 55-66.
- Gupta, S. P., Saha, R. N., Mulchandani, V., 1992. Quantitative structure-activity relationship studies on benzodiazepine receptor binding: recognition of active sites in receptor and modelling of interaction. *J Mol Recognit* 5, 75-80.
- Hammerlein, A., Derendorf, H., Lowenthal, D. T., 1998. Pharmacokinetic and pharmacodynamic changes in the elderly. Clinical implications. *Clin Pharmacokinetic* 35, 49-64.
- Hardmeier, M., Zimmermann, R., Ruegg, S., Pfluger, M., Deuster, S., Suter, K., Donzelli, M., Drewe, J., Krahenbuhl, S., Fuhr, P., Haschke, M., 2012. Intranasal midazolam: pharmacokinetics and pharmacodynamics assessed by quantitative EEG in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 91, 856-862.
- Harvey, R., Champe, P., 2008. *Pharmacology*. Philadelphia
- Hering, W., Geisslinger, G., Kamp, H. D., Dinkel, M., Tschaikowsky, K., Rugheimer, E., Brune, K., 1994. Changes in the EEG power spectrum after midazolam anaesthesia combined with racemic or S- (+) ketamine. *Acta Anaesthesiol Scand* 38, 719-723.
- Herman, R. J., Wilkinson, G. R., 1996. Disposition of diazepam in young and elderly subjects after acute and chronic dosing. *Br J Clin Pharmacol* 42, 147-155.

- Herrmann, W. M., 1982. Development and critical evaluation of an objective procedure for the electroencephalographic classification of psychotropic drugs. In: Herrmann, W., (Ed), *Electroencephalography in Drug Research*. Gustav Fisher Stuttgart, New York, pp. 249-352.
- Herve, F., Urien, S., Albengres, E., Duche, J. C., Tillement, J. P., 1994. Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding. *Clin Pharmacokinet* 26, 44-58.
- Hill, D. R., Bowery, N. G., Hudson, A. L., 1984. Inhibition of GABAB receptor binding by guanyl nucleotides. *J Neurochem* 42, 652-657.
- Hillestad, L., Hansen, T., Melsom, H., Drivenes, A., 1974. Diazepam metabolism in normal man. I. Serum concentrations and clinical effects after intravenous, intramuscular, and oral administration. *Clin Pharmacol Ther* 16, 479-484.
- Hindmarch, I., Gudgeon, A. C., 1980. The effects of clobazam and lorazepam on aspects of psychomotor performance and car handling ability. *Br J Clin Pharmacol* 10, 145-150.
- Hoffman, R. S., Bresler, M. J., 1982. Screening for glaucoma in patients receiving psychotropics. *Psychosomatics* 23, 205-206.
- Holford, N. H., 1996. A size standard for pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 30, 329-332.
- Holford, N. H., Sheiner, L. B., 1981a. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling in vivo. *Crit Rev Bioeng* 5, 273-322.
- Holford, N. H., Sheiner, L. B., 1981b. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 6, 429-453.
- Holford, N. H., Sheiner, L. B., 1982. Kinetics of pharmacologic response. *Pharmacol Ther* 16, 143-166.
- Humbert, T., Pujalte, D., Bottai, T., Hue, B., Pouget, R., Petit, P., 1998. Pilot investigation of thyrotropin-releasing hormone-induced thyrotropin and prolactin release in anxious patients treated with diazepam. *Clin Neuropharmacol* 21, 80-85.
- Hutchinson, M. A., Smith, P. F., Darlington, C. L., 1996. The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. *Prog Neurobiol* 49, 73-97.
- Igari, Y., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., Hanano, M., 1983. Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. *J Pharmacokinet Biopharm* 11, 577-593.
- Inaba, T., Tait, A., Nakano, M., Mahon, W. A., Kalow, W., 1988. Metabolism of diazepam in vitro by human liver. Independent variability of N-demethylation and C3-hydroxylation. *Drug Metab Dispos* 16, 605-608.
- Insightful, C., 2002. Seattle, WA, pp. S-PLUS 6.1 for Windows Supplement.
- Iosifescu, D. V., 2011. Electroencephalography-derived biomarkers of antidepressant response. *Harv Rev Psychiatry* 19, 144-154.
- Itil, T. M., Itil, K. Z., 1986. The significance of pharmacodynamic measurements in the assessment of bioavailability and bioequivalence of psychotropic drugs using CEEG and dynamic brain mapping. *J Clin Psychiatry* 47 Suppl, 20-27.
- Ivaturi, V. D., Riss, J. R., Kriel, R. L., Siegel, R. A., Cloyd, J. C., 2009. Bioavailability and tolerability of intranasal diazepam in healthy adult volunteers. *Epilepsy Res* 84, 120-126.

- Jack, M. L., Colburn, W. A., 1983. Pharmacokinetic model for diazepam and its major metabolite desmethyldiazepam following diazepam administration. *J Pharm Sci* 72, 1318-1323.
- Jack, M. L., Colburn, W. A., Spirt N.M., Bautz G. , Zanko M., Horst W.D., R.A, O. B., 1983. A pharmacokinetic/pharmacodynamic/receptor binding model to predict the onset and duration of pharmacological activity of the benzodiazepines. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat* 7, 629-653.
- Jackson, C. E., Snyder, P. J., 2008. Electroencephalography and event-related potentials as biomarkers of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 4, S137-143.
- Jacobson, L. H., Kelly, P. H., Bettler, B., Kaupmann, K., Cryan, J. F., 2007. Specific roles of GABA(B(1)) receptor isoforms in cognition. *Behav Brain Res* 181, 158-162.
- Jacqmin, P., Ansseau, M., 1988. Comparison of sublingual and oral prazepam in normal subjects. II. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *Neuropsychobiology* 19, 186-191.
- Jasper, H., 1958. The 10-20 electrode system of the International Federation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10, 370-375.
- Javitt, D. C., Spencer, K. M., Thaker, G. K., Winterer, G., Hajos, M., 2008. Neurophysiological biomarkers for drug development in schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 7, 68-83.
- Jensen, H. H., Hansen, H. C., Drenck, N. E., 1997. Comparison of psychomotor performance after intravenous and rectal diazepam. *Anesth Prog* 44, 5-10.
- Jeong, J., 2004. EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease. *Clin Neurophysiol* 115, 1490-1505.
- Jones, A. W., Larsson, H., 2004. Distribution of diazepam and nordiazepam between plasma and whole blood and the influence of hematocrit. *Ther Drug Monit* 26, 380-385.
- Jongsma, M. L., van Rijn, C. M., van Egmond, J., van Schaijk, W. J., Sambeth, A., Coenen, A. M., 2000. The influence of diazepam on the electroencephalogram-evoked potential interrelation in rats. *Neurosci Lett* 293, 83-86.
- Jonsson, E. N., Karlsson, M. O., 1999. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 58, 51-64.
- Jonsson, S., Henningson, A., Edholm, M., Salmonson, T., 2012. Role of modelling and simulation: a European regulatory perspective. *Clin Pharmacokinet* 51, 69-76.
- Kanto, J., Iisalo, E., Lehtinen, V., Salminen, J., 1974. The concentrations of diazepam and its metabolites in the plasma after an acute and chronic administration. *Psychopharmacologia* 36, 123-131.
- Kaplan, S. A., Jack, M. L., Alexander, K., Weinfeld, R. E., 1973. Pharmacokinetic profile of diazepam in man following single intravenous and oral and chronic oral administrations. *J Pharm Sci* 62, 1789-1796.
- Karlsson, M. O., Sheiner, L. B., 1993. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm* 21, 735-750.
- Kemp, J. A., Marshall, G.R, Wong, E.H.F., Woodruff, G.N., 1987. The affinities, potencies and efficacies of some benzodiazepine-receptor agonist, antagonist and inverse-agonist at rat hippocampal GABA<sub>A</sub>-receptors. *Br J Pharmac* 1987, 601-608.

- Kerbusch, T., Huitema, A. D., Ouwkerk, J., Keizer, H. J., Mathot, R. A., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., 2000. Evaluation of the autoinduction of ifosfamide metabolism by a population pharmacokinetic approach using NONMEM. *Br J Clin Pharmacol* 49, 555-561.
- Kintz, P., Tracqui, A., Mangin, P., 1996. Sweat testing for benzodiazepines. *J Forensic Sci* 41, 851-854.
- Kishimoto, T., Kadoya, C., Sneyd, R., Samra, S. K., Domino, E. F., 1995. Topographic electroencephalogram of propofol-induced conscious sedation. *Clin Pharmacol Ther* 58, 666-674.
- Kitajima, T., Kanbayashi, T., Saito, Y., Takahashi, Y., Ogawa, Y., Sugiyama, T., Kaneko, Y., Aizawa, R., Shimizu, T., 2004. Diazepam reduces both arterial blood pressure and muscle sympathetic nerve activity in human. *Neurosci Lett* 355, 77-80.
- Klein, R., Brennan, T., 2002. Patent, TJ:WO2002079380.
- Klockowski, P. M., Levy, G., 1988. Kinetics of drug action in disease states. XXIV. Pharmacodynamics of diazepam and its active metabolites in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 912-918.
- Klotz, U., Antonin, K. H., Bieck, P. R., 1976a. Comparison of the pharmacokinetics of diazepam after single and subchronic doses. *Eur J Clin Pharmacol* 10, 121-126.
- Klotz, U., Antonin, K. H., Bieck, P. R., 1976b. Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 199, 67-73.
- Klotz, U., Antonin, K. H., Brugel, H., Bieck, P. R., 1977. Disposition of diazepam and its major metabolite desmethyldiazepam in patients with liver disease. *Clin Pharmacol Ther* 21, 430-436.
- Klotz, U., Avant, G. R., Hoyumpa, A., Schenker, S., Wilkinson, G. R., 1975. The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. *J Clin Invest* 55, 347-359.
- Klotz, U., Muller-Seydlitz, P., 1979. Altered elimination of desmethyldiazepam in the elderly. *Br J Clin Pharmacol* 7, 119-120.
- Klotz, U., Reimann, I., 1981. Clearance of diazepam can be impaired by its major metabolite desmethyldiazepam. *Eur J Clin Pharmacol* 21, 161-163.
- Knoester, P. D., Jonker, D. M., Van Der Hoeven, R. T., Vermeij, T. A., Edelbroek, P. M., Brekelmans, G. J., de Haan, G. J., 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam administered as a concentrated intranasal spray. A study in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 53, 501-507.
- Koopmans, R., Dingemans, J., Danhof, M., Horsten, G. P., van Boxtel, C. J., 1988. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of midazolam effects on the human central nervous system. *Clin Pharmacol Ther* 44, 14-22.
- Kopp, C., Rudolph, U., Low, K., Tobler, I., 2004. Modulation of rhythmic brain activity by diazepam: GABA(A) receptor subtype and state specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3674-3679.
- Korpi, E. R., Mattila, M. J., Wisden, W., Luddens, H., 1997. GABA(A)-receptor subtypes: clinical efficacy and selectivity of benzodiazepine site ligands. *Ann Med* 29, 275-282.
- Kosuge, K., Jun, Y., Watanabe, H., Kimura, M., Nishimoto, M., Ishizaki, T., Ohashi, K., 2001. Effects of CYP3A4 inhibition by diltiazem on pharmacokinetics and dynamics of diazepam in relation to CYP2C19 genotype status. *Drug Metab Dispos* 29, 1284-1289.

- Krnjevic, K., Schwartz, S., 1967. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp Brain Res* 3, 320-336.
- Kroboth, P. D., Bertz, R. J., Smith, R. B., 1993. Acute tolerance to triazolam during continuous and step infusions: estimation of the effect offset rate constant. *J Pharmacol Exp Ther* 264, 1047-1055.
- Kroboth, P. D., McAuley, J. W., Derry, C. L., 1995. Time-dependent sensitization to triazolam? An observation in three studies. *J Clin Psychopharmacol* 15, 192-196.
- Kroboth, P. D., Smith, R. B., Rault, R., Silver, M. R., Sorkin, M. I., Puschett, J. B., Juhl, R. P., 1985. Effects of end-stage renal disease and aluminum hydroxide on temazepam kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 37, 453-459.
- Kuhlmann, J., 2007. The applications of biomarkers in early clinical drug development to improve decision-making processes. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 29-45.
- Kuhlmann, J., Wensing, G., 2006. The applications of biomarkers in early clinical drug development to improve decision-making processes. *Curr Clin Pharmacol* 1, 185-191.
- Lacroix C, W. F., Danger P, 1993. Monitoring of benzodiazepines (clobazam, diazepam and their main metabolites) in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 617, 285-290.
- Lalonde, R. L., Kowalski, K. G., Hutmacher, M. M., Ewy, W., Nichols, D. J., Milligan, P. A., Corrigan, B. W., Lockwood, P. A., Marshall, S. A., Benincosa, L. J., Tensfeldt, T. G., Parivar, K., Amantea, M., Glue, P., Koide, H., Miller, R., 2007. Model-based drug development. *Clin Pharmacol Ther* 82, 21-32.
- Laurijssens, B. E., Greenblatt, D. J., 1996. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for benzodiazepines. *Clin Pharmacokinet* 30, 52-76.
- Lehr, T., Staab, A., Tillmann, C., Nielsen, E. O., Trommeshauser, D., Schaefer, H. G., Kloft, C., 2008. Contribution of the active metabolite M1 to the pharmacological activity of tesofensine in vivo: a pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling approach. *Br J Pharmacol* 153, 164-174.
- Leiser, S. C., Dunlop, J., Bowlby, M. R., Devilbiss, D. M., 2011. Aligning strategies for using EEG as a surrogate biomarker: a review of preclinical and clinical research. *Biochem Pharmacol* 81, 1408-1421.
- Lindhardt, K., Gizurarson, S., Stefansson, S. B., Olafsson, D. R., Bechgaard, E., 2001. Electroencephalographic effects and serum concentrations after intranasal and intravenous administration of diazepam to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 52, 521-527.
- Locniskar, A., Greenblatt, D. J., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1989. Bioequivalence of a generic brand of diazepam. *Biopharm Drug Dispos* 10, 597-605.
- Loew, G. H., Nienow, J. R., Poulsen, M., 1984. Theoretical structure-activity studies of benzodiazepine analogues. Requirements for receptor affinity and activity. *Mol Pharmacol* 26, 19-34.
- Lotsch, J., Geisslinger, G., 2006. Misestimating the role of an active metabolite when modeling the effects after administration of the parent compound only. *Clin Pharmacol Ther* 80, 95-97.
- Low, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Rulicke, T., Bluethmann, H., Mohler, H., Rudolph, U., 2000. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290, 131-134.
- Lu, J., Greco, M. A., 2006. Sleep circuitry and the hypnotic mechanism of GABAA drugs. *J Clin Sleep Med* 2, S19-26.

- Lukasiewicz, P. D., 1996. GABAC receptors in the vertebrate retina. *Mol Neurobiol* 12, 181-194.
- Luria, R. E., 1975. The validity and reliability of the visual analogue mood scale. *J Psychiatr Res* 12, 51-57.
- Luscher, B. P., Baur, R., Goeldner, M., Sigel, E., 2012. Influence of GABA(A) receptor alpha subunit isoforms on the benzodiazepine binding site. *PLoS One* 7, e42101.
- Macdonald, R. L., Olsen, R. W., 1994. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17, 569-602.
- Mahon, W. A., Inaba, T., Umeda, T., Tsutsumi, E., Stone, R., 1976. Biliary elimination of diazepam in man. *Clin Pharmacol Ther* 19, 443-450.
- Mandelli, M., Tognoni, G., Garattini, S., 1978. Clinical pharmacokinetics of diazepam. *Clin Pharmacokinet* 3, 72-91.
- Mandema, J. W., Danhof, M., 1990. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of heptabarbital using aperiodic EEG analysis. *J Pharmacokinet Biopharm* 18, 459-481.
- Mandema, J. W., Danhof, M., 1992. Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinet* 23, 191-215.
- Mandema, J. W., Kuck, M. T., Danhof, M., 1992a. Differences in intrinsic efficacy of benzodiazepines are reflected in their concentration-EEG effect relationship. *Br J Pharmacol* 105, 164-170.
- Mandema, J. W., Kuck, M. T., Danhof, M., 1992b. In vivo modeling of the pharmacodynamic interaction between benzodiazepines which differ in intrinsic efficacy. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 56-61.
- Mandema, J. W., Sansom, L. N., Dios-Vieitez, M. C., Hollander-Jansen, M., Danhof, M., 1991a. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the electroencephalographic effects of benzodiazepines. Correlation with receptor binding and anticonvulsant activity. *J Pharmacol Exp Ther* 257, 472-478.
- Mandema, J. W., Tuk, B., van Steveninck, A. L., Breimer, D. D., Cohen, A. F., Danhof, M., 1992c. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite alpha-hydroxymidazolam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 51, 715-728.
- Mandema, J. W., Tukker, E., Danhof, M., 1991b. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the EEG effects of midazolam in individual rats: influence of rate and route of administration. *Br J Pharmacol* 102, 663-668.
- Mandema, J. W., Tukker, E., Danhof, M., 1992d. In vivo characterization of the pharmacodynamic interaction of a benzodiazepine agonist and antagonist: midazolam and flumazenil. *J Pharmacol Exp Ther* 260, 36-44.
- Mandema, J. W., Verotta, D., Sheiner, L. B., 1992e. Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm* 20, 511-528.
- Mandrioli, R., Micolini, L., Raggi, M. A., 2008. Benzodiazepine metabolism: an analytical perspective. *Curr Drug Metab* 9, 827-844.
- Martinez-Delgado, G., Estrada-Mondragon, A., Miledi, R., Martinez-Torres, A., 2010. An Update on GABA $\rho$  Receptors. *Curr Neuropharmacol* 8, 422-433.

- Marty, J., Gauzit, R., Lefevre, P., Couderc, E., Farinotti, R., Henzel, C., Desmonts, J. M., 1986. Effects of diazepam and midazolam on baroreflex control of heart rate and on sympathetic activity in humans. *Anesth Analg* 65, 113-119.
- Mattila, M., Seppala, T., Mattila, M. J., 1986. Combined effects of buspirone and diazepam on objective and subjective tests of performance in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 40, 620-626.
- Mattila, M. J., Aranko, K., Kuitunen, T., 1993. Diazepam effects on the performance of healthy subjects are not enhanced by treatment with the antihistamine ebastine. *Br J Clin Pharmacol* 35, 272-277.
- Mattila, M. J., Koski, J., Stromberg, C., 1987. Acute and subchronic effects of Org 2305 and diazepam on psychomotor performance in man. *Br J Clin Pharmacol* 23, 219-227.
- McEvoy, G., (Ed), 2000. AHFS DRUG INFORMATION, Bethesda.
- McKernan, R. M., Rosahl, T. W., Reynolds, D. S., Sur, C., Wafford, K. A., Atack, J. R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K. W., Carling, R. W., Street, L. J., Castro, J. L., Ragan, C. I., Dawson, G. R., Whiting, P. J., 2000. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* 3, 587-592.
- Mehta, A. K., Ticku, M. K., 1999. An update on GABAA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 29, 196-217.
- Meibohm, B., Derendorf, H., 1997. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. *Int J Clin Pharmacol Ther* 35, 401-413.
- Micheloyannis, S., Pachou, E., Stam, C. J., Breakspear, M., Bitsios, P., Vourkas, M., Erimaki, S., Zervakis, M., 2006. Small-world networks and disturbed functional connectivity in schizophrenia. *Schizophr Res* 87, 60-66.
- Mirza, N. R., Munro, G., 2010. The role of GABA(A) receptor subtypes as analgesic targets. *Drug News Perspect* 23, 351-360.
- Moghadamnia, A. A., Rostami-Hodjegan, A., Abdul-Manap, R., Wright, C. E., Morice, A. H., Tucker, G. T., 2003. Physiologically based modelling of inhibition of metabolism and assessment of the relative potency of drug and metabolite: dextromethorphan vs. dextrorphan using quinidine inhibition. *Br J Clin Pharmacol* 56, 57-67.
- Mohler, H., 2007. Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABAA receptors. *J Neurochem* 102, 1-12.
- Mohler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62, 42-53.
- Mohler, H., Fritschy, J. M., Rudolph, U., 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 2-8.
- Mohler, H., Fritschy, J. M., Vogt, K., Crestani, F., Rudolph, U., 2005. Pathophysiology and pharmacology of GABA(A) receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 225-247.
- Mohler, H., Okada, T., 1977. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 198, 849-851.
- Moschitto, L. J., Greenblatt, D. J., 1983. Concentration-independent plasma protein binding of benzodiazepines. *J Pharm Pharmacol* 35, 179-180.

- Mould, D. R., DeFeo, T. M., Reece, S., Milla, G., Limjuco, R., Crews, T., Choma, N., Patel, I. H., 1995. Simultaneous modeling of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam and diazepam. *Clin Pharmacol Ther* 58, 35-43.
- Mucci, A., Volpe, U., Merlotti, E., Bucci, P., Galderisi, S., 2006. Pharmaco-EEG in psychiatry. *Clin EEG Neurosci* 37, 81-98.
- Murias, M., Webb, S. J., Greenson, J., Dawson, G., 2007. Resting state cortical connectivity reflected in EEG coherence in individuals with autism. *Biol Psychiatry* 62, 270-273.
- Nair, S. G., Gamble, J. A., Dundee, J. W., Howard, P. J., 1976. The influence of three antacids on the absorption and clinical action of oral diazepam. *Br J Anaesth* 48, 1175-1180.
- Nakatsuka, I., Shimizu, H., Asami, Y., Katoh, T., Hirose, A., Yoshitake, A., 1985. Benzodiazepines and their metabolites: relationship between binding affinity to the benzodiazepine receptor and pharmacological activity. *Life Sci* 36, 113-119.
- Naritomi, Y., Terashita, S., Kimura, S., Suzuki, A., Kagayama, A., Sugiyama, Y., 2001. Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab Dispos* 29, 1316-1324.
- Nau, H., Luck, W., Kuhn, W., 1984. Decreased serum protein binding of diazepam and its major metabolite in the neonate during the first postnatal week relate to increased free fatty acid levels. *Br J Clin Pharmacol* 17, 92-98.
- Nayeem, N., Green, T. P., Martin, I. L., Barnard, E. A., 1994. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* 62, 815-818.
- Nikanjam, M., Stewart, C. F., Takimoto, C. H., Synold, T. W., Beaty, O., Fouladi, M., Capparelli, E. V., 2015. Population pharmacokinetic analysis of oxaliplatin in adults and children identifies important covariates for dosing. *Cancer Chemother Pharmacol* 75, 495-503.
- Obach, R. S., 2013. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 65, 578-640.
- Ochs, H. R., Greenblatt, D. J., Eckardt, B., Harmatz, J. S., Shader, R. I., 1983. Repeated diazepam dosing in cirrhotic patients: cumulation and sedation. *Clin Pharmacol Ther* 33, 471-476.
- Ochs, H. R., Greenblatt, D. J., Kaschell, H. J., Klehr, U., Divoll, M., Abernethy, D. R., 1981. Diazepam kinetics in patients with renal insufficiency or hyperthyroidism. *Br J Clin Pharmacol* 12, 829-832.
- Ochs, H. R., Greenblatt, D. J., Lauven, P. M., Stoeckel, H., Rommelsheim, K., 1982a. Kinetics of high-dose i.v. diazepam. *Br J Anaesth* 54, 849-852.
- Ochs, H. R., Greenblatt, D. J., Verburg-Ochs, B., Locniskar, A., 1984. Comparative single-dose kinetics of oxazolam, prazepam, and clorazepate: three precursors of desmethyldiazepam. *J Clin Pharmacol* 24, 446-451.
- Ochs, H. R., Otten, H., Greenblatt, D. J., Dengler, H. J., 1982b. Diazepam absorption: effects of age, sex, and Billroth gastrectomy. *Dig Dis Sci* 27, 225-230.
- Olkola, K. T., Ahonen, J., 2008. Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol*, 335-360.
- Olofson, E., Noppers, I., Niesters, M., Kharasch, E., Aarts, L., Sarton, E., Dahan, A., 2012. Estimation of the contribution of norketamine to ketamine-induced acute pain relief and neurocognitive impairment in healthy volunteers. *Anesthesiology* 117, 353-364.

- Olsen, R., Peters, G. R., Hales, T., Sieghart, W., Rudolph, U., Lambert, J., Belelli, D., Luscher, B. P., 2012. GABA<sub>A</sub> RECEPTORS.
- Olsen, R. W., Sieghart, W., 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60, 243-260.
- Olsen, R. W., Sieghart, W., 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141-148.
- Ono, S., Hatanaka, T., Miyazawa, S., Tsutsui, M., Aoyama, T., Gonzalez, F. J., Satoh, T., 1996. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily. *Xenobiotica* 26, 1155-1166.
- Pacifici, G. M., Placidi, G. F., Fornaro, P., Gomeni, R., 1982. Pinazepam: a precursor of N-desmethyldiazepam. *Eur J Clin Pharmacol* 22, 225-228.
- Pharmacists, A. S. o. H.-S., 2000. American Hospital Formulary Service.
- Pharsight, C., 1994-1998. Professional WinNonlin-Pro, 2.0 Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA.
- Piccolino, M., 1997. Luigi Galvani and animal electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology. *Trends Neurosci* 20, 443-448.
- Pilla Reddy, V., Kozielska, M., Johnson, M., Vermeulen, A., de Greef, R., Liu, J., Groothuis, G. M., Danhof, M., Proost, J. H., 2011. Structural models describing placebo treatment effects in schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. *Clin Pharmacokinet* 50, 429-450.
- Polenzani, L., Woodward, R. M., Miledi, R., 1991. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4318-4322.
- Porchet, H. C., Benowitz, N. L., Sheiner, L. B., 1988. Pharmacodynamic model of tolerance: application to nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 231-236.
- Qin, X. P., Xie, H. G., Wang, W., He, N., Huang, S. L., Xu, Z. H., Ou-Yang, D. S., Wang, Y. J., Zhou, H. H., 1999. Effect of the gene dosage of CYP2C19 on diazepam metabolism in Chinese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 66, 642-646.
- Ragueneau, I., Laveille, C., Jochemsen, R., Resplandy, G., Funck-Brentano, C., Jaillon, P., 1998. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 64, 192-203.
- Rang, H., Dale, M., (Eds), 2008. *Pharmacology*. Elsevier, London.
- Ratkowsky, D. A., 1986. A suitable parameterization of the Michaelis-Menten enzyme reaction. *Biochem J* 240, 357-360.
- Richelson, E., Nelson, A., Neeper, R., 1991. Binding of benzodiazepines and some major metabolites at their sites in normal human frontal cortex in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 256, 897-901.
- Riss, J., Cloyd, J., Gates, J., Collins, S., 2008. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol Scand* 118, 69-86.
- Roberts, E., Frankel, S., 1950. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187, 55-63.

- Romero, E., Velez de Mendizabal, N., Cendros, J. M., Peraire, C., Bascompta, E., Obach, R., Troconiz, I. F., 2012. Pharmacokinetic/pharmacodynamic model of the testosterone effects of triptorelin administered in sustained release formulations in patients with prostate cancer. *J Pharmacol Exp Ther* 342, 788-798.
- Romero, S., Mañanas, M. A., Barbanoj, M. J., 2006. Quantitative evaluation of automatic ocular removal from simulated EEG signals: regression vs. second order statistics methods. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1, 5495-5498.
- Romero, S., Mañanas, M. A., Barbanoj, M. J., 2008. A comparative study of automatic techniques for ocular artifact reduction in spontaneous EEG signals based on clinical target variables: a simulation case. *Comput Biol Med* 38, 348-360.
- Romero, S., Mañanas, M. A., Riba, J., Morte, A., Gimenez, S., Clos, S., Barbanoj, M. J., 2004. Evaluation of an automatic ocular filtering method for awake spontaneous EEG signals based on independent component analysis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2, 925-928.
- Rowland, M., Tozer, T., 1995a. Elimination. In: Balado, D., (Ed), *Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications*. Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, pp. 158-165.
- Rowland, M., Tozer, T., 1995b. Pharmacologic Response. In: Balado, D., (Ed), *Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications*. Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA, p. 340.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H., Mohler, H., 1999. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401, 796-800.
- Rudolph, U., Crestani, F., Mohler, H., 2001. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 22, 188-194.
- Rudolph, U., Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10, 685-697.
- Rudolph, U., Mohler, H., 2006. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6, 18-23.
- Rutherford, D. M., Okoko, A., Tyrer, P. J., 1978. Plasma concentrations of diazepam and desmethyldiazepam during chronic diazepam therapy. *Br J Clin Pharmacol* 6, 69-73.
- Saletu, B., Anderer, P., Kinsperger, K., Grunberger, J., 1987. Topographic brain mapping of EEG in neuropsychopharmacology--Part II. Clinical applications (pharmacologic EEG imaging). *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 9, 385-408.
- Saletu, B., Anderer, P., Saletu-Zyhlarz, G. M., 2006. EEG topography and tomography (LORETA) in the classification and evaluation of the pharmacodynamics of psychotropic drugs. *Clin EEG Neurosci* 37, 66-80.
- Schoemaker, R. C., van Gerven, J. M., Cohen, A. F., 1998. Estimating potency for the Emax-model without attaining maximal effects. *J Pharmacokinetic Biopharm* 26, 581-593.
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., et al., 1987. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328, 221-227.
- Schuttler, J., Stanski, D. R., White, P. F., Trevor, A. J., Horai, Y., Verotta, D., Sheiner, L. B., 1987. Pharmacodynamic modeling of the EEG effects of ketamine and its enantiomers in man. *J Pharmacokinetic Biopharm* 15, 241-253.
- Seisdedos, N., 2004. d2, Test de atención, Madrid.

- Sellman, R., Kanto, J., Pekkarinen, J., 1975. Biliary excretion of diazepam and its metabolites in man. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 37, 242-249.
- Shader, R. I., Georgotas, A., Greenblatt, D. J., Harmatz, J. S., Allen, M. D., 1978. Impaired absorption of desmethyldiazepam from clorazepate by magnesium aluminum hydroxide. *Clin Pharmacol Ther* 24, 308-315.
- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A., 2012. Drug Elimination and Hepatic Clearance. In: Weitz, M., Naglieri, C., (Eds), *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical, USA, p. 290.
- Sheiner, L. B., Beal, S. L., 1980. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinetic Biopharm* 8, 553-571.
- Sheiner, L. B., Stanski, D. R., Vozeh, S., Miller, R. D., Ham, J., 1979. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 25, 358-371.
- Shin, M. C., Wakita, M., Xie, D. J., Iwata, S., Akaike, N., 2011. Synergic effect of diazepam and muscimol via presynaptic GABA(A) receptors on glutamatergic evoked EPSCs. *Brain Res* 1416, 1-9.
- Sieghart, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., Ernst, M., 2012. A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the alpha(+) beta(-) interface. *Br J Pharmacol* 166, 476-485.
- Sieghart, W., Sperk, G., 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2, 795-816.
- Smith, K. S., Engin, E., Meloni, E. G., Rudolph, U., 2012. Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABAA receptor subtypes in mice. *Neuropharmacology* 63, 250-258.
- Smith, M. T., Evans, L. E., Eadie, M. J., Tyrer, J. H., 1979. Pharmacokinetics of prazepam in man. *Eur J Clin Pharmacol* 16, 141-147.
- Snyder, S. M., Hall, J. R., 2006. A meta-analysis of quantitative EEG power associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Clin Neurophysiol* 23, 440-455.
- Sohn, D. R., Kusaka, M., Ishizaki, T., Shin, S. G., Jang, I. J., Shin, J. G., Chiba, K., 1992. Incidence of S-mephenytoin hydroxylation deficiency in a Korean population and the interphenotypic differences in diazepam pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 52, 160-169.
- SPSS, 2008. *Statistical Package for the Social Sciences.*, Chicago, IL, USA.
- Squires, R. F., Brastrup, C., 1977. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266, 732-734.
- St-Pierre, M. V., Pang, K. S., 1993a. Kinetics of sequential metabolism. I. Formation and metabolism of oxazepam from nordiazepam and temazepam in the perfused murine liver. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 1429-1436.
- St-Pierre, M. V., Pang, K. S., 1993b. Kinetics of sequential metabolism. II. Formation and metabolism of nordiazepam and oxazepam from diazepam in the perfused murine liver. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 1437-1445.
- Stanski, D. R., 1992. Pharmacodynamic modeling of anesthetic EEG drug effects. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32, 423-447.

- Steiger, A., Kimura, M., 2010. Wake and sleep EEG provide biomarkers in depression. *J Psychiatr Res* 44, 242-252.
- Stell, B. M., Brickley, S. G., Tang, C. Y., Farrant, M., Mody, I., 2003. Neuroactive steroids reduce neuronal excitability by selectively enhancing tonic inhibition mediated by delta subunit-containing GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14439-14444.
- Sternbach, L. H., 1979. The benzodiazepine story. *J Med Chem* 22, 1-7.
- Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N., 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 12, 1052-1061.
- Sun, W., Laughren, T. P., Zhu, H., Hochhaus, G., Wang, Y., 2013. Development of a placebo effect model combined with a dropout model for bipolar disorder. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 40, 359-368.
- Sweetman, S. C., (Ed), 2009. *Martindale. The complete drug reference*. Pharmaceutical Press, Grayslake, USA.
- Tan, K. R., Brown, M., Labouebe, G., Yvon, C., Creton, C., Fritschy, J. M., Rudolph, U., Luscher, C., 2010. Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature* 463, 769-774.
- Thompson, D. F., Landry, J. P., 1997. Drug-induced hiccups. *Ann Pharmacother* 31, 367-369.
- Tobler, I., Kopp, C., Deboer, T., Rudolph, U., 2001. Diazepam-induced changes in sleep: role of the alpha 1 GABA(A) receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6464-6469.
- Tognoni, G., Gomeni, R., De Maio, D., Alberti, G. G., Franciosi, P., Sciegghi, G., 1975. Pharmacokinetics of N-demethyl diazepam in patients suffering from insomnia and treated with nortriptyline. *Br J Clin Pharmacol* 2, 227-232.
- Troy, S. M., Lucki, I., Peirgias, A. A., Parker, V. D., Klockowski, P. M., Chiang, S. T., 1995. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the potential drug interaction between venlafaxine and diazepam. *J Clin Pharmacol* 35, 410-419.
- Tuk, B., van Oostenbruggen, M. F., Herben, V. M., Mandema, J. W., Danhof, M., 1999. Characterization of the pharmacodynamic interaction between parent drug and active metabolite in vivo: midazolam and alpha-OH-midazolam. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 1067-1074.
- Udenfriend, S., 1950. Identification of gamma-aminobutyric acid in brain by the isotope derivative method. *J Biol Chem* 187, 65-69.
- Uhlhaas, P. J., Haenschel, C., Nikolic, D., Singer, W., 2008. The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophr Bull* 34, 927-943.
- Valle, M., Barbanoj, M. J., Jane, F., 2002. Pharmaco-electroencephalography and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in basic research: focus on human pharmacology. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24 Suppl D, 129-137.
- van der Kleijn, E., van Rossum, J. M., Muskens, E. T., Rijntjes, N. V., 1971. Pharmacokinetics of diazepam in dogs, mice and humans. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 29 Suppl 3, 109-127.
- Van Dongen, H., Dinges, D., 2005. Circadian Rhythms in Sleepiness, Alertness, and Performance. In: MH Kryger, T. R., WC Dement, (Ed), *Principles and Practice of Sleep Medicine*. WB Saunders, Philadelphia, pp. 435-443.

- van Lier, H., Drinkenburg, W. H., van Eeten, Y. J., Coenen, A. M., 2004. Effects of diazepam and zolpidem on EEG beta frequencies are behavior-specific in rats. *Neuropharmacology* 47, 163-174.
- van Rijnsoever, C., Tauber, M., Choulli, M. K., Keist, R., Rudolph, U., Mohler, H., Fritschy, J. M., Crestani, F., 2004. Requirement of alpha5-GABAA receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *J Neurosci* 24, 6785-6790.
- Viani, A., Rizzo, G., Carrai, M., Pacifici, G. M., 1992. The effect of ageing on plasma albumin and plasma protein binding of diazepam, salicylic acid and digitoxin in healthy subjects and patients with renal impairment. *Br J Clin Pharmacol* 33, 299-304.
- Vidal, 2012. monographie NORDAZ 15 MG CP QUADRISEC.
- Vinkers, C. H., Klanker, M., Groenink, L., Korte, S. M., Cook, J. M., Van Linn, M. L., Hopkins, S. C., Olivier, B., 2009. Dissociating anxiolytic and sedative effects of GABAergic drugs using temperature and locomotor responses to acute stress. *Psychopharmacology (Berl)* 204, 299-311.
- Visser, S. A., Wolters, F. L., Gubbens-Stibbe, J. M., Tukker, E., Van Der Graaf, P. H., Peletier, L. A., Danhof, M., 2003. Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effects of GABAA receptor modulators: in vitro-in vivo correlations. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 88-101.
- Voshaar, R. C., Verkes, R. J., van Lijstelaar, G. L., Edelbroek, P. M., Zitman, F. G., 2005. Effects of additional oxazepam in long-term users of oxazepam. *J Clin Psychopharmacol* 25, 42-50.
- Wang, Q., Han, Y., Xue, H., 1999. Ligands of the GABAA receptor benzodiazepine binding site. *CNS Drug Reviews* 5, 125-144.
- Wang, X., Shang, D., Ribbing, J., Ren, Y., Deng, C., Zhou, T., Guo, F., Lu, W., 2012. Placebo effect model in asthma clinical studies: longitudinal meta-analysis of forced expiratory volume in 1 second. *Eur J Clin Pharmacol* 68, 1157-1166.
- Webb, J. A., Rostami-Hodjegan, A., Abdul-Manap, R., Hofmann, U., Mikus, G., Kamali, F., 2001. Contribution of dihydrocodeine and dihydromorphine to analgesia following dihydrocodeine administration in man: a PK-PD modelling analysis. *Br J Clin Pharmacol* 52, 35-43.
- Welling, P. G., 1984. Interactions affecting drug absorption. *Clin Pharmacokinet* 9, 404-434.
- Welling, P. G., 1989. Effects of food on drug absorption. *Pharmacol Ther* 43, 425-441.
- Whiting, P. J., 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* 8, 445-450.
- Whittington, M. A., Traub, R. D., Kopell, N., Ermentrout, B., Buhl, E. H., 2000. Inhibition-based rhythms: experimental and mathematical observations on network dynamics. *Int J Psychophysiol* 38, 315-336.
- Wiedemann, K., 2011. Biomarkers in development of psychotropic drugs. *Dialogues Clin Neurosci* 13, 225-234.
- WMA, 1996. Declaración de Helsinki.
- Wong, P. T., Yoong, Y. L., Gwee, M. C., 1986. Acute tolerance to diazepam induced by benzodiazepines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 13, 1-8.
- Yamazaki, A., Kumagai, Y., Fujita, T., Hasunuma, T., Yokota, S., Maeda, M., Otani, Y., Majima, M., 2007. Different effects of light food on pharmacokinetics and pharmacodynamics of three benzodiazepines, quazepam, nitrazepam and diazepam. *J Clin Pharm Ther* 32, 31-39.

- Yang, J., He, M. M., Niu, W., Wrighton, S. A., Li, L., Liu, Y., Li, C., 2012. Metabolic capabilities of cytochrome P450 enzymes in Chinese liver microsomes compared with those in Caucasian liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 73, 268-284.
- Yang, T. J., Krausz, K. W., Sai, Y., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V., 1999. Eight inhibitory monoclonal antibodies define the role of individual P-450s in human liver microsomal diazepam, 7-ethoxycoumarin, and imipramine metabolism. *Drug Metab Dispos* 27, 102-109.
- Yang, T. J., Shou, M., Korzekwa, K. R., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V., Yang, S. K., 1998. Role of cDNA-expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam. *Biochem Pharmacol* 55, 889-896.
- Yasumori, T., Li, Q. H., Yamazoe, Y., Ueda, M., Tsuzuki, T., Kato, R., 1994. Lack of low Km diazepam N-demethylase in livers of poor metabolizers for S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Pharmacogenetics* 4, 323-331.
- Yasumori, T., Nagata, K., Yang, S. K., Chen, L. S., Murayama, N., Yamazoe, Y., Kato, R., 1993. Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner. *Pharmacogenetics* 3, 291-301.
- Yeates, R. A., Laufen, H., Rader, K., Leitold, M., 1986. Preliminary study of the pharmacokinetics of desmethyldiazepam administered as drops or tablets. *Arzneimittelforschung* 36, 138-140.
- Yoo, H. D., Cho, H. Y., Lee, S. N., Yoon, H., Lee, Y. B., 2012. Population pharmacokinetic analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with genetic polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 39, 329-341.
- Young, R., Glennon, R. A., Brase, D. A., Dewey, W. L., 1986. Potencies of diazepam metabolites in rats trained to discriminate diazepam. *Life Sci* 39, 17-20.
- Zhang, Y. A., Reviriego, J., Lou, Y. Q., Sjoqvist, F., Bertilsson, L., 1990. Diazepam metabolism in native Chinese poor and extensive hydroxylators of S-mephenytoin: interethnic differences in comparison with white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 48, 496-502.
- Zingales, I. A., 1973. Diazepam metabolism during chronic medication unbound fraction in plasma, erythrocytes and urine. *J Chromatogr* 75, 55-78.