

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA
FARMACÈUTICA

MODELADO FARMACOCINÉTICO DE CICLOFOSFAMIDA
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.

M^a CARMEN LLOPIS GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 3 de juliol de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Marina Herráez Domínguez
- Dr. Antonio M. Rabasco Álvarez
- Dra. Concepción Peraire Guitart
- Dr. Juan José Torrado Durán
- Dra. Matilde Merino San Juan

Va ser dirigida per:

Dr. N. Víctor Jiménez Torres

Dr. Vicente Germán Casabó Alós

Dr. Juan José Pérez Ruixó

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Carmen Llopis García

Dipòsit legal: V-4160-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7641-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT [Q+] VALÈNCIA Facultat de Farmàcia



Modelado Farmacocinético de Ciclofosfamida en Pacientes con Cáncer de Mama

Tesis Doctoral
Presentada por:
M^a Carmen Llopis García
Valencia, 2009

*No hemos llegado al fin ni siquiera
al principio pero tal vez si al fin del
principio.*

Winston Churchil. 1972

*A toda mi Familia,
especialmente a Alejandro.*

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Los que suscriben, N. Víctor Jiménez Torres, Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia y Catedrático del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la Universidad de Valencia; Vicente G. Casabó Alós, profesores titulares del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, de la Universidad de Valencia; Juan J. Pérez Ruixó, Director Científico del Departamento de Farmacocinética y Metabolismo de Fármacos de AMGEN.

CERTIFICAN:

que la presente Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia ha sido realizada en el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia y en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia, por el licenciado en Farmacia M^a Carmen Llopis García, cuyo título es:

“Modelado Farmacocinético de Ciclofosfamida en Pacientes con Cáncer de Mama”

ha sido desarrollada bajo la dirección compartida de los mismos y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación, juicio y calificación.

N. V. Jiménez Torres
Ruixó

V. G. Casabó Alós

J.J. Pérez-

Valencia, de de 2009.

NOTA: Esta Memoria esta enmarcada dentro del proyecto de investigación “*Modelado del Comportamiento Farmacocinética-Farmacodinámico de la Ciclofosfamida a Dosis Altas en Pacientes con Cáncer de Mama de Alto Riesgo*” concedido por el Ministerio de Sanidad y Consumo a través del Fondo de Investigación Sanitaria, expediente 97/0758 y cuyo investigador principal es N. Víctor Jiménez Torres.

Quiero dedicar estas primeras líneas de agradecimiento al Dr. N. Víctor Jiménez Torres, Dr. Vicente Casabó Alós y Dr. Juan José Pérez Ruixó, por la paciencia que han tenido, el continuo esfuerzo y dedicación. Gracias por vuestro apoyo, trabajo, sugerencias y correcciones.

Agradecer a Dr. Javier García Conde y a la Dra. Pilar Azagra la ayuda prestada en el reclutamiento de pacientes y la recogida de datos en Hospital Clínico Universitario.

Agradecer a Dr. Daniel Almenar y Dr. Santiago Olmos la ayuda prestada en el reclutamiento de pacientes y la recogida de datos en Hospital Universitario Dr. Peset.

Agradecer al Hospital Universitario Dr. Peset y Hospital Clínico Universitario campo de trabajo de esta tesis. También agradecer al personal de enfermería ambos hospitales por su ayuda en la extracción de las muestras y en la recopilación de información de la administración.

Agradecer a Dra. Clara Medina por la ayuda prestada para la determinación cromatográfica de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida.

Especialmente quiero agradecer a todos los profesionales sanitarios del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset por su valiosa ayuda que me han prestado.

Agradecer a Víctor Jiménez Arenas por su ayuda prestada.

Agradecer a Josep Maria Cendros por su ayuda prestada.

Agradecer a Pr. Alan Boddy CANCER RESEARCH UNIT en The School of Medicine de la Universidad de Newcastle, Laboratorio de farmacología, Newcastle (Inglaterra) por los conocimientos adquiridos en mi estancia breve.

Agradecer a Pr. Mats Karlsson Universidad de Uppsala, Divison de Pharmacokinetics and drug Therapy Uppsala (Suecia) por los conocimientos adquiridos en mi estancia breve.

Por último, quiero agradecer a toda mi familia por su apoyo durante estos años.

Valencia, de de 2009

NDICE

I. Introducción	8
II. Objetivos	13
III. Antecedentes	15
III.1. Ciclofosfamida: características generales	15
III.1.1 Propiedades físico-químicas	16
III.1.2 Propiedades farmacológicas	22
III.1.3. Propiedades farmacocinéticas	30
III.2. Administración de Altas Dosis de Quimioterapia.	40
III.3. Análisis Farmacocinético	52
III.3.1. Modelos farmacocinéticos	54
III.4. Análisis Cinético y Dinámico Individual	74
III.4.1. Datos experimentales y datos observacionales	75
III.5. Análisis Cinético y Dinámico Poblacional	76
III.5.1. Modelo farmacoestadístico poblacional	78
III.5.2. Métodos de estimación de parámetros poblacionales	82
IV. Material y Métodos	91
IV.1. Pacientes y Tratamiento Farmacoterapéutico	91
IV.1.1. Criterios de inclusión y exclusión de pacientes	92
IV.1.2. Tratamiento farmacoterapéutico	94
IV.2. Recogida de Datos de la Historia Clínica	97
IV.3. Técnica Analítica	98
IV.3.1. Material, soluciones madre y patrones	98
IV.3.2. Método analítico	100
IV.4. Diseño del Estudio Farmacocinético	104
IV.5. Análisis Farmacocinético	105
IV.5.1. Base de datos	107

IV.5.2. Fichero control	109
IV.5.3. Modelos farmacoestadísticos	109
IV.5.4. Desarrollo de los modelos farmacoestadísticos	117
IV.5.4.1. Selección del modelo farmacoestadístico	117
IV.5.4.2. Exploración de las covariables.....	121
IV.5.4.3. Efecto de la concentración de ciclofosfamida sobre su autoinducción.	123
IV.5.4.4. Validación del modelo	124
V. Resultados y Discusión	125
V.1. Pacientes y Tratamiento Farmacoterapéutico	125
V.2. Técnica Analítica	129
V.3. Análisis Farmacocinético	130
V.3.1. Desarrollo de los modelos farmacoestadísticos	139
V.3.1.1. Selección del modelo farmacoestadístico	141
V.3.1.2. Exploración de las covariables	209
V.3.1.3. El efecto de la concentración de ciclofosfamida sobre su autoinducción	214
V.3.1.4. Validación del modelo	217
VI. Conclusiones	219
ANEXOS	221
BIBLIOGRAFÍA	263

I. INTRODUCCIÓN

Los planteamientos de prevención, detección, cribado, tratamiento y seguimiento del cáncer de mama han evolucionado, en los últimos 30 años, a un ritmo altamente satisfactorio. Dos resultados en salud significativos, como son mortalidad y detección temprana de la enfermedad, son suficientemente representativos para evidenciar este aserto. Para ambos se cuantifica una reducción en mortalidad del 30% y un incremento en la probabilidad de detectar carcinoma en estadio cero o 1, respectivamente, hasta en el 70% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama.

Las diferentes vertientes interdisciplinarias para el tratamiento del cáncer de mama aún no han incluido recomendaciones, por ningún grupo de trabajo ni por sociedades científicas, para el uso en la práctica clínica de modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos (PKPD). Una razón podría ser la ausencia de evidencia suficiente, como sucede con las trece categorías de marcadores tumorales para cáncer de mama

(Harris, 2007), para justificar su verdadera influencia en resultados significativos en salud (supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad, calidad de vida, menor toxicidad o coste-efectividad).

Las dificultades para que cada paciente reciba las dosis óptimas de antineoplásicos, durante todo su tratamiento, se sustentan en la amplia variabilidad en su respuesta, a veces incluso con dosis individualizadas. Los determinantes de esta variabilidad, se han tratado de fundamentar en los complejos procesos intracelulares y en los mecanismos de acción y de resistencia de los citostáticos, por lo que como criterio para predecir la respuesta en el paciente oncológico todavía se sigue utilizando la relación de la dosis con la respuesta (Grochow, 1998). Sin embargo, este concepto probabilístico se encuentra prácticamente superado porque la variabilidad en los procesos acontece desde la prescripción del tratamiento hasta la respuesta en el paciente; es multifactorial y no sólo explicable por la dosis.

Ante la ausencia de alternativas posológicas claras, los criterios convencionales se siguen aplicando aunque no garanticen una correcta individualización de las dosis de antineoplásicos (Jiménez, 2007); así, ante una situación de toxicidad se retrasa el tratamiento o se reduce la dosis inicialmente calculada entre un 25% y un 50 %. Este mismo criterio se aplica ante alteración de la función renal y a veces la hepática de los pacientes; también en obesos y mayores de 70 años, considerando que se ha optimizado el tratamiento antineoplásico.

El estado actual de la individualización posológica en el paciente oncológico, basado en alternativas diferentes a las convencionales, se focaliza en la monitorización de concentraciones plasmáticas de los fármacos y en el genotipado de los pacientes, aunque ambas son escasamente utilizadas en la rutina asistencial, excepto para fármacos como irinotecan, carboplatino, metotrexato o 5-Fluoruracilo, entre pocos más.

Se llega a evidenciar que el hecho destacable de la individualización posológica de antineoplásicos, dirigida o basada en principios farmacocinéticos o farmacogenómicos es su excepcionalidad; especialmente porque el conocimiento generado durante estos últimos años, en el campo de la Genética y de la Biología

Molecular es muy superior al éxito obtenido cuando ésta información se ha trasladado a la Farmacoterapia de enfermedades oncológicas.

Este marco conceptual es el alcance de la Presente Memoria de Tesis Doctoral, realizada en el Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, con una población de pacientes adultas, diagnosticadas de cáncer de mama de alto riesgo y tratadas con quimioterapia de intensificación según el protocolo STAMP-V en el Hospital Clínico Universitario y Dr. Peset, ambos de Valencia.

La alta variabilidad en la respuesta cinética de ciclofosfamida por una parte y la necesidad de administrar altas dosis, exigía caracterizar el comportamiento cinético de este fármaco para alcanzar la individualización posológica; también para identificar pacientes o subgrupos de población que se puedan beneficiar de estas estrategias (Evans, 1998).

La dinámica de cambio en los esquemas quimioterápicos es, en general, posiblemente la más elevada de toda la farmacoterapia moderna. Para el tratamiento de cáncer de mama, en sus diferentes estadios también. Hay sin embargo un hecho que le da actualidad a la presente Memoria y es que ciclofosfamida siempre está incluida en los esquemas (Bornmann, 2005).

Esta situación evidencia que la escasa aparición de nuevos fármacos y el resultado clínico, inferior al esperado, de los comercializados consolida a ciclofosfamida como citostático estándar de la mayor parte de los esquemas antineoplásicos, reforzando sus resultados clínicos por la complementariedad de las nuevas terapias, en particular la aportada por los anticuerpos monoclonales e inhibidores de receptores específicos.

En suma, el conocimiento de la respuesta cinética y dinámica de la ciclofosfamida aportado y la cuantificación de su variabilidad interindividual e intraindividual en pacientes, permitirá alcanzar la individualización posológica y optimizar su tratamiento farmacoterapéutico. Estos tres aspectos son fundamentales para abordar la

individualización posológica de este fármaco como quimioterápico en pacientes con cáncer de mama (McLeod, 1995; Kaijser, 1998).

II. OBJETIVOS

Objetivo Principal:

Establecer un modelo estructural farmacocinético poblacional, en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo tratados con ciclofosfamida a dosis altas, para predecir su respuesta individual.

Objetivos Secundarios:

Explorar mecanismos fisiológicos condicionantes de la autoinducción metabólica de ciclofosfamida.

Detección de subpoblaciones de pacientes a través de parámetros de eliminación de ciclofosfamida.

Plantear la influencia de covariables, a través del análisis exploratorio, sobre los valores centrales de los parámetros farmacocinéticos de ciclofosfamida.

III. Antecedentes

III.1. Ciclofosfamida: características generales

Desde su introducción en la práctica clínica en 1958, la ciclofosfamida ha sido y continúa siendo uno de los agentes antineoplásicos más utilizados en el tratamiento farmacoterapéutico del cáncer. Se trata de una mostaza nitrogenada con estructura química de oxazafosforina sustituida (2-[bis (2-cloroetil) amino]tetrahydro-2H-1, 3,2-oxazafosforina 2-oxido monohidrato) que actúa como agente alquilante. Este profármaco requiere su bioactivación (4hidroxiciclofosfamida) en los microsomas hepáticos (figura III.1).

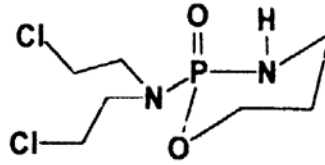


Figura III. 1 Estructura química de ciclofosfamida.

III.1.1 Propiedades físico-químicas

En estado natural (monohidrato), es un polvo cristalino blanco o casi blanco, soluble en lípidos. En disolución acuosa o en disolución de cloruro sódico (NaCl) al 0.9%, la solubilidad es inferior al 4% a temperatura ambiente. También es soluble en alcohol, diclorometano, acetona y altamente soluble en cloroformo. Ciclofosfamida en su forma anhidra es mucho menos estable y menos soluble en agua (Reynolds, 1996). En solución acuosa, a concentraciones comprendidas entre el 1-2%, el pH es de 4-6 y su punto de fusión está comprendido entre 49.5 y 53.0 °C. Las presentaciones comerciales de ciclofosfamida para inyección se preparan en mezcla con cloruro sódico 0.9 %. La osmolaridad a la concentración de ciclofosfamida de 20 mg/mL es de 352 mOsm/L.

Ciclofosfamida se administra como mezcla racémica y existe escasa información sobre el comportamiento cinético, dinámico y clínico de los enantiómeros considerados individualmente. En la actualidad, el desarrollo de las columnas quirales en cromatografía líquida de alta eficacia permite la separación e identificación de los isómeros R- y S-ciclofosfamida en el plasma (Masurel, 1989).

III.1.1.1 Estabilidad

En disolución acuosa, la degradación de ciclofosfamida monohidrato puede ser debida a procesos de hidrólisis, a la pérdida del ión cloruro o bien a ambos procesos (Friedman, 1967). La cinética de degradación en estas condiciones es de primer orden. El efecto de la temperatura sobre la degradación de ciclofosfamida ha sido estudiado ampliamente en diferentes vehículos (tabla III. 1).

En este contexto, Galleli y cols (1967) evidencian que las disoluciones de ciclofosfamida de 4mg/mL en medio NaCl 0.9%, conservadas en envase de vidrio a temperatura ambiente y sin protección de la luz, presentan un 3.5% de degradación a las 24 horas de su preparación. Del mismo modo, Benvenuto y cols (1981) comprueban que las mezclas intravenosas de ciclofosfamida de 6.6 mg/mL en glucosa 5% (G5%), conservadas en envases de vidrio y PVC a temperatura ambiente, sin protección de la luz, son estables durante 24 horas.

Ahora bien, la pérdida de actividad de ciclofosfamida puede deberse bien a su conservación a temperatura ambiente o bien a procesos de fotodegradación (Tesis Doctoral Medina, 1999) (tabla III.1).

Tabla III. 1 Influencia de la temperatura y la protección de la luz en la estabilidad de mezclas intravenosas de ciclofosfamida preparadas en envase de PVC a concentración de 4 mg/mL.

Vehículo	T(°C)	Luz*	T ₉₀ (días)	IC95% T ₉₀ (días)
NaCl 0.9%	24	No	2.91	2.39 - 3.71
		Si	3.75	2.87 - 5.40
	4	No	8.94	7.46 - 11.14
		Si	10.83	8.30 - 15.66
G 5%	24	No	3.98	3.66 - 4.39
		Si	3.14	2.54 - 4.11
	4	No	11.31	9.56 - 13.85
		Si	10.71	9.07 - 13.08

Luz*: Protección de la luz; T: Temperatura T₉₀: Tiempo durante el cual la concentración de principio activo es superior al 90% de la concentración inicial; G5%: Glucosa al 5%.

III.1.1.2 Métodos analíticos

La caracterización del comportamiento cinético de ciclofosfamida requiere la utilización de métodos analíticos específicos y sensibles. Estos métodos deben ser capaces de determinar ciclofosfamida y sus metabolitos, especialmente aquellos que

poseen actividad alquilante, como es 4hidroxiciclofosfamida (4OHCFA). En la bibliografía se han descrito distintos métodos para la determinación de ciclofosfamida en muestras de plasma y orina (tabla III.2).

Los límites de detección varían entre 0.1 y 40000 ng/mL en función del procedimiento de extracción, la longitud de onda de detección y del detector (Marjinson, 1986; Burton, 1988; Ekhart, 2007). Las condiciones cromatográficas no difieren sustancialmente entre los distintos métodos publicados. Así, es habitual la utilización de columnas C₈ o C₁₈, fases móviles compuestas por mezclas de acetonitrilo y tampón fosfato.

Desde el punto de vista analítico, la determinación de 4hidroxiciclofosfamida en muestras de sangre y/o plasma es muy compleja, ya que en ella confluyen una serie de factores. Por un lado, las disoluciones de 4hidroxiciclofosfamida son altamente inestables. En disolución acuosa la descomposición del producto es del 50% aproximadamente a los 75 minutos (min) (c=1 mg/mL), e incluso inferior a los 8 minutos a concentraciones superiores (c=50mg/mL). M Johansson y col realizaron un estudio sobre la estabilidad de 4hidroxiciclofosfamida en muestras de sangre y plasma. En sangre humana el tiempo de vida media de 4hidroxiciclofosfamida a 37°C es 4 min; sin embargo si las muestras se conservan a 4°C no se observa degradación después de 1h. A temperatura ambiente el tiempo de vida media de 4hidroxiciclofosfamida en plasma es de 8 min, pero si las muestras se desproteinizan previamente, 4hidroxiciclofosfamida permanece estable al menos 1 h. Conservadas a -70°C las muestras de plasma y plasma desproteinizado resultan estables al menos 4 meses (Johansson, 1994).

Tabla III. 2 Métodos de análisis propuestos para la determinación de ciclofosfamida en plasma y orina.

Técnica	Detector	LD (ng/mL)	Referencia
CLAE-EM**	EM	15	Baumann, 1999
CG**	Nitrógeno-fósforo	5	Bohnenstengel, 1995
CG**	Nitrógeno-fósforo	50	Huitema, 1998
CLAE**	UV-Vis	50	Huitema, 2000a
Colorim	UV-Vis	20*	Mohamed, 1994
CG-EM**	Captura electrónica	100	Momerency, 1994
CG-EM	EM	0.2	Sessink, 1993
CLAE	UV-Vis	300	Rustum, 1987
CLAE	UV-Vis	1000	Burton, 1988
Polar/colorim	UV-Vis	10*	Ellaihy, 1984
CG**	Nitrógeno-fósforo	50	Van den Bosch, 1981
CG**	EM	5	Bahr, 1981
CG	EM(SIM)	0.1	Momerency, 1994
CG-EM**	FID	1000	Lambrechts, 1990
CLAE	UV-Vis	20*	Masurel, 1989
CCF	Densitometria	1000	Hadidi, 1988a
CLAE	UV-Vis	300	El Yazigi, 1986
CLAE	UV-Vis	300	Hardy, 1984
CLAE**	EM	700	Sottani, 1998
CLAE**	UV-Vis	700	Medina, 1999
CLAE	EM	12.5-3333	Sadagopan, 2001
CLAE	EM	50-5000	E. de Jonge, 2004a
CLAE	EM	200-40000	Ekhart, 2007

LD: Límite de determinación; * unidades expresadas en $\mu\text{g/mL}$; ** determinación de ciclofosfamida (CFA) y metabolitos; CG: cromatografía gaseosa; EM: espectroscopia de masas; CLAE: cromatografía líquida de alta eficacia; CCF: cromatografía en capa fina; UV-Vis: ultravioleta visible; FID: Flame ionization detection; SIM: Single ion monitoring.

La cromatografía líquida en fase reversa con detección fluorescente y UV-V ha

sido también utilizada para la determinación de 4hidroxiciclofosfamida. J.E. Wright y col utilizaron una columna de tipo fenilo y detección fluorescente para la determinación de la hidroxiquinolona formada tras la reacción de la acroleína, obtenida por descomposición de 4hidroxiciclofosfamida, con 3-hidroxilaminas y molibdato amónico se centrifuga y el sobrenadante se calienta a 100°C durante 50 min protegiendo la muestra de la luz. Para efectuar la detección, se utiliza un sistema de derivatización postcolumna en el que se acidifica el eluyente con trifluoracético. Se han descrito algunas limitaciones del método relacionadas con la pérdida de acroleína por unión a proteínas, glutatión y con la obtención de valores anormalmente altos causados por la descomposición de conjugados acroleina-tiol oxidados para formar acroleína (Wright, 1995 y Teicher, 1996).

El empleo de detección uv-visible tras la separación cromatográfica requiere el empleo de reactivos cromógenos ya que la absorptividad molar de 4hidroxiciclofosfamida a la longitud de onda de máxima absorción, 190 nm, es baja. Sin embargo, en medio ácido se produce la ruptura del anillo de 4hidroxiciclofosfamida desplazando el equilibrio tautómero hacia la formación de aldofosfamida, especie química que contiene un grupo cetona. Aprovechando esta reacción se han propuesto una serie de métodos para la determinación de 4hidroxiciclofosfamida basados en la reacción de dicho grupo con algunos reactivos selectivos de grupo carbonilo.

Belfayol L y col propusieron el uso de semicarbácida como reactivo derivatizante de 4hidroxiciclofosfamida (Belfayol, 1995). También ha sido utilizado por Ekhart (Ekhart, 2007).

Se ha descrito un procedimiento para la determinación de 4hidroxiciclofosfamida basado en la separación mediante cromatografía líquida en fase reversa del derivado formado por reacción de 4hidroxiciclofosfamida con p-nitrofenilhidracina (PNFH) realizando la detección en el visible a 400nm (Slattery, 1996).

Johansson M y col propusieron la utilización del reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4DNFH) para la derivatización de 4hidroxiciclofosfamida en medio ácido (Johansson, 1994). En la tabla III.3., a modo de resumen, se muestran algunas de las

técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de 4hidroxiciclofosfamida junto con su límite de detección.

Tabla III. 3 Métodos de análisis propuestos para la determinación de 4hidroxiciclofosfamida en plasma.

Técnica	Detector	LD (ng/mL)	Referencias
CG	EM	25	Anderson, 1995
CLAE	EM	30	Baumann, 1999
CLAE	UV	25	Belfayol, 1995
CLAE	UV	700	Huitema, 2000a
CLAE	EM	5-2500	E.de Jonge, 2004a
CLAE	EM	50-5000	Ekhart, 2007
CLAE	UV	22	Johansson, 1994
CLAE	EM	30	Juma, 1980
CLAE	EM	30	Kalhorn, 1999
CLAE	UV	5	Medina, 1999

LD: Límite de determinación; CG: cromatografía gaseosa; EM: espectroscopia de masas; CLAE: cromatografía líquida de alta eficacia; UV: ultravioleta.

En relación con la identificación del comportamiento cinético quiral, en la literatura hay numerosos estudios (Ariëns, 1984; Patil, 1970; O'Neill, 1975; Sastry, 1973; Smith, 1984) comparando los efectos farmacodinámicos en animales. Estos estudios han demostrado que los enzimas que catalizan las reacciones son estereoselectivas.

A su vez, se detectan diferencias farmacocinéticas para los enantiómeros de un fármaco en la absorción, aclaramiento metabólico, aclaramiento renal, unión a tejidos y proteínas (Crom, 1992).

La estructura esteroquímica de ciclofosfamida e ifosfamida está relacionada con su eficacia y toxicidad (Williams, 1999). En este contexto, un estudio de 12 pacientes informa que diferencias en el aclaramiento de formación de los enantiómeros R y S ciclofosfamida $CL(R)=0.25$ es el doble que (S) 0.14 L/h. Asimismo, la capacidad de metabolización (R,S)-ciclofosfamida para adultos y niños R: 42 v.s. 74 % y para S: 48 v.s. 77% respectivamente. Sin embargo, para sus metabolitos dicloroetilados es mayor

R (25 v.s. 1.9 %) que para S (38 v.s. 3.6 %). Con este modelo se pretende evaluar el porcentaje de dosis de ciclofosfamida que es transformada a su metabolito tóxico o activo (Williams, 1999).

Los métodos para la determinación de los enantiómeros de ciclofosfamida, tanto de cromatografía de líquidos (Masurel, 1990; Corlett, 1994) como en gases, (Boos, 1991; Blaschke, 1986; Young; 1989; Kaijser; 1997; Graville, 1993), utilizan como fase estacionaria una fase quiral y como fase móvil una aquiral; sólo en uno de estos trabajos describe una reacción de derivatización precolumna, por tanto, se trata de una metodología analítica poco desarrollada y de amplia variabilidad en sus resultados.

Los diferentes métodos para la determinación de los enantiómeros de ciclofosfamida son descritos en la tabla III.4.

Tabla III. 4 Métodos de análisis propuestos para la determinación de los enantiómeros de ciclofosfamida en plasma.

Técnica	Detector	LD (ng/mL)	Referencias
CLAE	EM	30	Baumann, 1999
CLAE	UV	25	Belfayol, 1995
CG	EM	25	Corlett, 1994
CLAE	UV	22	Johansson, 1994
CLAE	EM	30	Kalhorn, 1999
CLAE	UV-Vis	30	Rustum, 1987
CG	EM	15	Williams, 1999

CG: cromatografía gaseosa; EM: espectroscopia de masas; CLAE: cromatografía líquida de alta eficacia; UV-Vis: ultravioleta visible.

III.1.2 Propiedades farmacológicas

Mecanismo de acción

Como la mayoría de los agentes alquilantes, el mecanismo de acción se basa en la alquilación de las bases nitrogenadas del ADN. La alquilación provoca la pérdida de

la configuración espacial de las cadenas de ADN e imposibilita la síntesis del ADN durante la mitosis y de esta forma ocasiona la muerte celular. En este sentido, García y cols (1988) demostraron que el poder citotóxico del fármaco se correlaciona con el grado de enlaces covalentes formados entre las dos cadenas de ADN. Aunque este compuesto puede formar uniones covalentes con otras moléculas (agua, aminoácidos, proteínas, etc.), el sitio de unión preferente son las bases púricas y pirimidínicas de la doble cadena de ADN.

La membrana celular es impermeable al paso de la mostaza fosforamida puesto que se encuentra ionizada a pH fisiológico ($pK_a = 4.75$). Sin embargo, ciclofosfamida, 4hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida, pueden atravesar la membrana de las células según los gradientes de concentración. En el interior de las células las oxidasas de función mixta catalizan la reacción de hidroxilación de ciclofosfamida a 4hidroxiciclofosfamida y la degradación intracelular espontánea de 4hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida origina la formación de la mostaza fosforamida que posee capacidad alquilante (Moskwa, 1985; Boyd, 1986). En este sentido, ciclofosfamida, 4hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida se consideran como moléculas transportadoras de mostaza fosforamida hasta el interior de las células.

Ahora bien, en el interior de las células neoplásicas de muchos tumores humanos no existe una cantidad suficiente de oxidasas de función mixtas como para catalizar la reacción anterior. En estos casos, 4hidroxiciclofosfamida reacciona con los grupos tioles de distintas moléculas y da lugar a compuestos resistentes a la degradación enzimática del aldehído deshidrogenasa (ALDH), sin posibilidad de formar espontáneamente la mostaza fosforamida (Hohorst, 1976). No obstante, el equilibrio existente entre estos compuestos y 4hidroxiciclofosfamida origina una formación sostenida de mostaza fosforamida, directamente proporcional a la cantidad de compuestos con estructura alquiltio, que garantiza el mantenimiento de la actividad alquilante durante un periodo de tiempo más prolongado. La elevada selectividad y especificidad de la ciclofosfamida se debe probablemente a 4hidroxiciclofosfamida y la posibilidad de liberar mostaza fosforamida en las células tumorales (Colvin, 1990).

Factores que alteran la sensibilidad de la célula

La variabilidad de los procesos farmacocinéticos de ciclofosfamida condiciona la distinta cantidad de fármaco que accede a las células y la variabilidad farmacodinámica provoca diferencias interindividuales en la respuesta terapéutica o tóxica debido a la sensibilidad de la célula al agente quimioterápico.

El proceso de detoxificación más importante de los metabolitos activos de ciclofosfamida es la oxidación de la aldofosfamida y la formación de carboxifosfamida mediante la acción de diferentes isoenzimas de ALDH. El aumento de la actividad de la ALDH ha sido asociado con el desarrollo de resistencia al tratamiento con ciclofosfamida (Sreerama, 1993). Este hecho explica porque células con elevada actividad de ALDH, como las células hematológicas pluripotenciales o las células de las mucosas, quedan protegidas de la acción citotóxica de ciclofosfamida (Kastan, 1990). Estos resultados se han comprobado en estudios animales donde la administración concomitante de cianamida, inhibidor de ALDH, junto con ciclofosfamida provoca un aumento de la toxicidad hematológica (Moore, 1991).

El glutatión intracelular es un agente protector del daño citotóxico de los agentes alquilantes. La depleción intracelular mediante inhibidores de la síntesis de glutatión, como butionina-sulfoximina (BSO) o ácido etacrínico, incrementan la sensibilidad celular a los agentes alquilantes, como el melfalán o ciclofosfamida (Gallo, 1995; Friedman, 1989). Por el contrario, cabría pensar que concentraciones elevadas de glutatión intracelular se podrían asociar con resistencia al tratamiento con ciclofosfamida, u otros agentes alquilantes; sin embargo, el papel que desempeña el glutatión intracelular en la resistencia a los agentes alquilante es todavía desconocido (Moore, 1991).

Aplicaciones terapéuticas

Como fármaco antineoplásico, ciclofosfamida es particularmente útil por su amplio espectro de acción, facilidad de administración y versatilidad de dosis que pueden ser administradas. De hecho ciclofosfamida forma parte de protocolos de quimioterapia de primera línea que se administran a pacientes diagnosticados de neuroblastoma,

retinoblastoma, micosis fungoide, enfermedad de Hodgkin y linfomas malignos (linfoma linfocítico nodular o difuso, linfoma de células mixtas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkitt), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y cáncer de mama.

En el tratamiento del cáncer de mama, la monoterapia con ciclofosfamida produce una respuesta objetiva en el 35% de los pacientes. Su utilización con otros fármacos, provoca respuestas objetivas en el 90% de los pacientes. En este sentido, en la actualidad la administración de protocolos de quimioterapia basados en ciclofosfamida se considera de elección en el tratamiento de los pacientes con cáncer de mama.

Dosificación y vías de administración

Ciclofosfamida se administra por vía oral a dosis comprendidas entre 100 y 200 mg/día. La administración de dosis más altas de 600 a 1000 mg/m², repetidas cada 3-4 semanas se realiza por perfusión intravenosa continua de 96 horas, requiere soporte hematopoyético bien con trasplante de médula ósea, bien con infusión de precursores hematopoyéticos periféricos.

Toxicidad y efectos adversos

Toxicidad hematológica. Los efectos adversos más frecuentes y limitantes de dosis de ciclofosfamida se producen en la médula ósea y en comparación con otras mostazas nitrogenadas, son más fácilmente reversibles tras la interrupción del tratamiento. Los efectos adversos más frecuentes son leucopenia, trombocitopenia, anemia y raramente hipoprotrombinemia. La mielodepresión de la médula ósea se produce debido a la constante renovación de las células hematopoyéticas, que las hace muy vulnerables a los citostáticos. Cuando esto se produce, las células sanguíneas circulantes no se reproducen y su vida media justifica la aparición diferida de las alteraciones en el hemograma. De hecho, la médula ósea tiene reservas de precursores de leucocitos durante 8-15 días. Por este motivo, la leucopenia no se observa en sangre periférica hasta el décimo día después de aplicar la dosis de tratamiento y su duración puede prolongarse durante 14-28 días.

La leucopenia es el efecto adverso más frecuente que obliga a esperar 3-4 semanas antes de administrar el siguiente ciclo de quimioterapia y realizar un recuento leucocitario con fórmula granulocitaria antes de cualquier ciclo. Si las cifras de leucocitos o de granulocitos son normales, el paciente recibirá el 100% de la dosis prevista. Si las cifras de leucocitos están entre $2-3.9 \cdot 10^9$ /L o las de granulocitos entre $1-1.9 \cdot 10^9$ /L se administrará el 50% de la dosis y si las cifras son inferiores a las citadas, no será posible administrar la nueva tanda y se realizará un nuevo hemograma al cabo de una semana. Durante el periodo de neutropenia es frecuente la aparición de fiebre, más aún si se utilizan dosis altas donde la neutropenia es de mayor duración.

En ocasiones, los factores estimulantes de colonias granulocíticas (G-CSF) y granulocíticas-monocíticas (GM-CSF) son utilizados para poder administrar la dosis completa del protocolo de quimioterapia cuando en el ciclo anterior se originó una neutropenia severa o bien para acortar el período de neutropenia en los tratamientos de intensificación con soporte hematopoyético de médula ósea. Las dosis administradas de G-CSF son de 5 a 10 mg/kg/día hasta que la cifra de neutrófilos se mantenga durante 3 días superior a $1 \cdot 10^9$ /L.

La trombocitopenia es menos frecuente que la leucopenia y se manifiesta a los 10-14 días de la administración de la quimioterapia. La aparición diferida de esta toxicidad no se debe a la existencia de reservas medulares, sino a la vida media de las plaquetas (8-10 días). Si el recuento de plaquetas es superior a $100 \cdot 10^9$ /L se administrará el 100% de la dosis. Entre $75 - 99 \cdot 10^9$ /L se administrará el 25% de la dosis. Si las cifras son inferiores, se retrasará la tanda una semana y se repetirá de nuevo la analítica.

La anemia es menos frecuente y se detecta más tarde que la leucopenia y la trombocitopenia, ya que los hematíes permanecen 120 días en la sangre periférica. La anemia aparece tras la administración de dosis elevadas o tratamientos prolongados. En algunas ocasiones, los pacientes tratados con ciclofosfamida dan positivo el test de Coombs y desarrollan anemia hemolítica. Ante una trombocitopenia o anemia grave se transfundirá concentrado de plaquetas y/o hematíes según corresponda.

Toxicidad gastrointestinal y hepática. Anorexia, náuseas y vómitos son muy frecuentes, especialmente cuando se administran altas dosis. Existe una amplia variabilidad interindividual en la intensidad y forma de aparición, destacar que la aparición de náuseas y vómitos se producen de forma diferida, es decir, transcurridas entre 9 y 18 horas desde su administración y suele responder adecuadamente al tratamiento con antieméticos de tipo benzamídico (p. ej. metoclopramida) y/o antagonistas de los receptores 5-HT₃ de la serotonina (p.ej. ondansetrón, granisetron o tropisetron). Ocasionalmente, puede aparecer diarrea, colitis hemorrágica, mucositis y más raramente estomatitis aftosa, otras ulceraciones del tracto digestivo, enterocolitis y hepatotoxicidad. Cuando la exposición a la ciclofosfamida es mayor puede ocasionar una enfermedad veno-oclusiva en el hígado, incrementando la toxicidad del órgano (E. de Jonge, 2006).

Toxicidad en el tracto genitourinario. El 20% de los pacientes en tratamiento con ciclofosfamida experimentan cistitis hemorrágica no bacteriana. Esta complicación es más frecuente en la población pediátrica y tras la administración de ifosfamida, en lugar de ciclofosfamida.

El tratamiento profiláctico incluye la hidratación y la asociación de productos ricos en grupos -SH, como N-acetilcisteína o el 2-mercanosulfonato sódico (MESNA). El MESNA interacciona con los metabolitos urotóxicos de ciclofosfamida y disminuye la incidencia y severidad de la cistitis hemorrágica. La administración del MESNA provoca el aumento de la excreción urinaria de cisteína, que reacciona con la acroleína presente en la orina y contribuye a los efectos uroprotectores (Stillwell, 1988).

Como consecuencia de una acción tóxica sobre el túbulo renal puede aparecer un cuadro de retención hídrica sin edema y con hiponatremia a dosis superiores a los 50 mg/kg, que puede ocasionar nefrotoxicidad, necrosis tubular aguda y uretritis hemorrágica. En la mayoría de los casos estas lesiones suelen revertir tras la interrupción del tratamiento con ciclofosfamida.

Toxicidad pulmonar. La toxicidad pulmonar se manifiesta en forma de fibrosis pulmonar intersticial que, en algunas ocasiones puede ser de pronóstico fatal. En

comparación con otros agentes alquilantes, como las nitrosoureas, este efecto adverso se produce con menor frecuencia tras la administración de ciclofosfamida. Su aparición se ha asociado a la administración de dosis altas durante un periodo largo de tiempo. El mecanismo desencadenante de este fenómeno parece ser la citotoxicidad directa sobre el epitelio pulmonar que provoca alveolitis y fibrosis. En algunos casos, la interrupción del tratamiento y la administración de corticoides se ha mostrado como una alternativa efectiva.

Toxicidad dermatológica. La administración de ciclofosfamida a dosis convencionales provoca alopecia en el 33% de los pacientes y se produce tres semanas después del inicio del tratamiento. Las implicaciones sociológicas y psicológicas de este efecto adverso obligan a informar al paciente antes del inicio del tratamiento. Además, aunque generalmente se trata de una complicación reversible, el nuevo cabello puede ser de color y textura diferentes al original. La alopecia permanente esta asociada a la alta exposición a carboplatino, tiotepa y tepa que se administra junto con la ciclofosfamida (E. de Jonge, 2002).

Toxicidad cardíaca. La cardiotoxicidad es una complicación del tratamiento con ciclofosfamida que se manifiesta a dosis superiores a los 60 mg/kg/día y es la toxicidad limitante de dosis en la administración de quimioterapia mieloablativa. De hecho, se han documentado casos de muertes tras la administración de dosis de 4 g cada 24 horas durante 4 días en un ensayo clínico en fase I (American Hospital Formulary Service, 1998).

Carcinogenicidad y teratogenicidad. Algunos pacientes que han recibido tratamiento con ciclofosfamida han experimentado el desarrollo de tumores secundarios, entre los que destacan enfermedades linfoproliferativas y mieloproliferativas y el cáncer de vejiga. Aunque la relación causal no esta bien establecida, la posibilidad de desarrollar tumores secundarios a la administración de ciclofosfamida debe ser considerada para establecer en cada paciente individual la relación beneficio-riesgo del tratamiento farmacoterapéutico que este va recibir.

El desarrollo de neoplasias secundarias ocurre más frecuentemente en aquellos pacientes diagnosticados de enfermedades mieloproliferativas y linfoproliferativas o enfermedades autoinmunes que recibieron tratamiento con ciclofosfamida entre otros fármacos.

En la actualidad se dispone de suficientes datos para afirmar que la incidencia a largo plazo de otros tumores sólidos o leucemias secundarias es significativamente mayor en mujeres diagnosticadas de cáncer de mama subsidiarias de tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en ciclofosfamida que en la población general. Así, se estima que entre 1 y 10 pacientes de cada 10000 que reciben ciclofosfamida durante 6 meses de tratamiento adyuvante sistémico desarrollará una leucemia en los 10 años siguientes al diagnóstico de cáncer de mama (Curtis, 1992).

Embarazo, fertilidad y lactancia. Cuando ciclofosfamida se administra durante el primer trimestre del embarazo el riesgo de teratogenia y muerte fetal es elevado, pero siempre inferior al originado por los antimetabolitos análogos del ácido fólico. Durante el segundo y tercer trimestres del embarazo el riesgo de desarrollar teratogenicidad se reduce al mínimo.

Entre el 10-30% de los pacientes en tratamiento con ciclofosfamida desarrollan una atrofia del tejido reproductor, con oligospermia e incluso, aplasia germinal en los varones y amenorrea en las mujeres. Ambas afectaciones pueden ser reversibles y están asociadas con las dosis administradas y la duración del tratamiento. En casos extremos, puede aparecer esterilidad, que puede ser de carácter permanente, tanto en hombres como en mujeres.

Dado que ciclofosfamida se distribuye a la leche materna, la administración a las madres con niños en periodo de lactancia materna debe evitarse con el fin de no ocasionar la toxicidad iatrogénica en el niño.

Interacciones farmacológicas

Las interacciones farmacológicas se producen cuando la administración concomitante de dos o más fármacos provoca alteraciones en el comportamiento cinético y dinámico de al menos uno de los fármacos administrados. En este sentido, la administración concomitante de algunos fármacos con ciclofosfamida puede alterar el comportamiento cinético y dinámico de este fármaco y comprometer la eficacia y seguridad del tratamiento farmacoterapéutico instaurado. Del mismo modo, ciclofosfamida puede alterar el comportamiento de otros fármacos cuando ambos se administran concomitantemente. Esta subdivisión se utiliza para la descripción de las interacciones farmacológicas que pueden aparecer en los pacientes subsidiarios de tratamiento con ciclofosfamida.

Las **interacciones a nivel farmacocinético** de mayor importancia son las que aparecen cuando ciclofosfamida se administra junto con alopurinol, antagonistas H₂, barbitúricos, cloramfenicol, sulfafenazol y dapsona entre otros.

Las **interacciones a nivel farmacodinámico** de mayor importancia clínica son las que aparecen cuando ciclofosfamida se administra junto con azatioprina, fármacos opiáceos y pentostatina entre otros.

III.1.3. Propiedades farmacocinéticas

La adecuada descripción de la farmacocinética de la ciclofosfamida y sus metabolitos ha sido posible. Aunque no se entiende completamente el papel de los metabolitos de la ciclofosfamida respecto a la eficacia y toxicidad en los tratamientos con ciclofosfamida. Sin embargo, la relación entre toxicidad y exposición a ciclofosfamida y sus metabolitos ha sido establecida. Las variaciones en el balance metabólico activación y inactivación debido a la propia autoinducción de la ciclofosfamida, la interacción fármaco-fármaco y las diferencias individuales que han sido reportadas, sugieren la posibilidad para la optimización de las terapias con ciclofosfamida. El conocimiento de la farmacocinética de la ciclofosfamida y la

posibilidad de monitorizarla, puede ser útil para mejorar su índice terapéutico (E. de Jonge, 2005a).

Absorción

La ciclofosfamida presenta buena absorción oral y alcanza la concentración máxima transcurrida 1 hora desde su administración. Mathias y cols (1984) cuantificaron la biodisponibilidad en magnitud mediante la relación del área bajo la curva tras la administración por vía oral y por vía intravenosa, AUC_{po}/AUC_{iv} . Según estos autores, la biodisponibilidad en magnitud está comprendida entre 0.87 y 0.96.

Distribución

Aproximadamente el 20% de ciclofosfamida se une a las proteínas plasmáticas y a las dosis utilizadas en la práctica clínica diaria no existe evidencia de tratarse de un proceso saturable o dosis-dependiente. Los metabolitos del profármaco se unen en mayor proporción a las proteínas plasmáticas, pero ninguno de ellos supera el umbral del 70%. El volumen aparente de distribución es similar al del agua corporal total y se encuentra comprendido entre 0.54 y 1.1 L/kg (Edwards, 1980; Grochow, 1983). Los parámetros farmacocinéticos tras la administración intravenosa se muestran en las tablas III.5 y III.6, para ciclofosfamida y su metabolito 4hidroxiciclofosfamida.

Ciclofosfamida y sus metabolitos no atraviesan la barrera hematoencefálica y las concentraciones alcanzadas en líquido cefalorraquídeo no son lo suficientemente grandes como para ser utilizada en el tratamiento de las leucemias meníngeas.

Tabla III. 5 Parámetros farmacocinéticos de ciclofosfamida.

Dosis	Nº Pat.	CL (L/h)	V (L)	T _{1/2} (h)	UPP (%)	Referencia
6-80 mg/kg	26	-	0.64	6.45	13	Bagley, 1973
1 g/m ²	23	4.33	0.57	6.2	14	Bailey, 1991
500mg/m ²	12	0.49	2.7	4.8	19	Busse, 1997
100 mg/kg		0.45	2.7		30	
4 g/ m ²	12	1.74/3.84	0.64	-	-	Chen, 1995
4-6 g/ m ²	35	3.03	43.7	-	-	E.de Jonge, 2005a
4-6 g/ m ^{2*}	49	1.76 ^a /2.91 ^b	31.9	-	-	E.de Jonge, 2004b
60 mg/kg	19	-	-	8.7±4.6	16	Fasola, 1991
6g/ m ^{2**}	14	1.14 ^a /1.76 ^b	9.75/21.5	-	-	Hassan, 1999
6-4g/ m ^{2*}	46	1.62 ^a /5.36 ^b	32.5	-	-	Huitema, 2002
6-4g/ m ^{2*}	34	1.58 ^a /4.76 ^b	31.0	-	-	Huitema, 2001
60 mg/kg	12	5.6	-	5	-	Moore, 1991
100 mg	40	-	0.57	7.0	-	Mouridsen, 1976
500-800 mg	7	4.0	0.71	8.0	-	Juma, 1979
6g/ m ²	41	1.93	21.30	-	-	Peréz-Ruixó, 1999
150-400 mg/m ²	16	4.2	0.52	7.6	-	Powis, 1987
	-	-	0.70	8.2	13	Juma, 1979
60 mg/kg	18	4.0	0.51	6.8	-	Ren, 1998
120mg/kg	7	-	-	5.2±1.8	-	Slattery, 1996
370-2490 mg/m ²	38** ***	2.9	0.26	3.2	-	Yule, 1996
600 mg/m ^{2***}	65	4.23	34.6	-	-	Joerger, 2007
400 mg/m ^{2****}	22	1.83 ^a /1.79 ^b	13.1	-	-	McCune, 2008
45 mg/kg	20	0.0286 ^{b,S,^}	0.694 ^S	-	-	Salinger, 2006

Abreviaturas: CL = aclaramiento plasmático total, V = volumen de distribución; T_{1/2} = semivida de eliminación; UPP = unión a proteínas plasmáticas.* Infusión 1 hora durante 4 días;** infusión 96 h;***infusión 15min **** niños, infusión 30 min.***** edades entre 0.17 y 18 años.^a aclaramiento no inducible y ^b aclaramiento inducible.^S unidades normalizadas por Kg.[^] aclaramiento no inducible = 0.00895(edad/36.8)^{0.945}.

Tabla III. 6 Parámetros farmacocinéticos de 4hidroxiciclofosfamida.

Dosis	N°Pat	CL(L/h)	V (L)	T _{1/2} (h)	Referencia
500mg/m ²	12	3.6	-	-	Busse,1997
4 g/ m ²	12	0.60	0.64	-	Chen,1997
6g/ m ²	14	300	30	-	Hassan,1999
6-4g/ m ^{2*}	46	170	1	-	Huitema,2002
6-4g/ m ^{2*}	34	206	1	-	Huitema,2001

Abreviaturas: CL = aclaramiento plasmático total, V = volumen de distribución;

T_{1/2} = semivida de eliminación;* Infusión 1 hora durante 4 días.

Metabolismo

Ciclofosfamida es un profármaco cuya bioactivación enzimática es necesaria para garantizar sus efectos citostáticos (figura III.2) (Moore, 1991; Boddy, 2000). La hidroxilación del carbono en posición 4 es la primera reacción metabólica de la ciclofosfamida. Esta reacción se produce en los microsomas hepáticos a través de los sistemas enzimáticos de las subfamilias 2A6, 2B6, 2C, 3A4 y 3A5 del complejo enzimático del citocromo P 450 (CYP) (Chang, 1993; Chang, 1997a; Busse, 1997). El principal metabolito de esta reacción es 4hidroxiciclofosfamida, que se encuentra en equilibrio tautomérico con su forma ceto, la aldofosfamida. La aldofosfamida mediante una reacción de β -eliminación origina la mostaza fosforamida, con actividad alquilante y la acroleína, compuesto urotóxico responsable de la cistitis hemorrágica. Esta reacción no enzimática es catalizada por compuestos básicos, proteínas, como la albúmina y posiblemente algunos enzimas intracelulares como las 3'-5' exonucleasas (Hohorst, 1986; Moore, 1991).

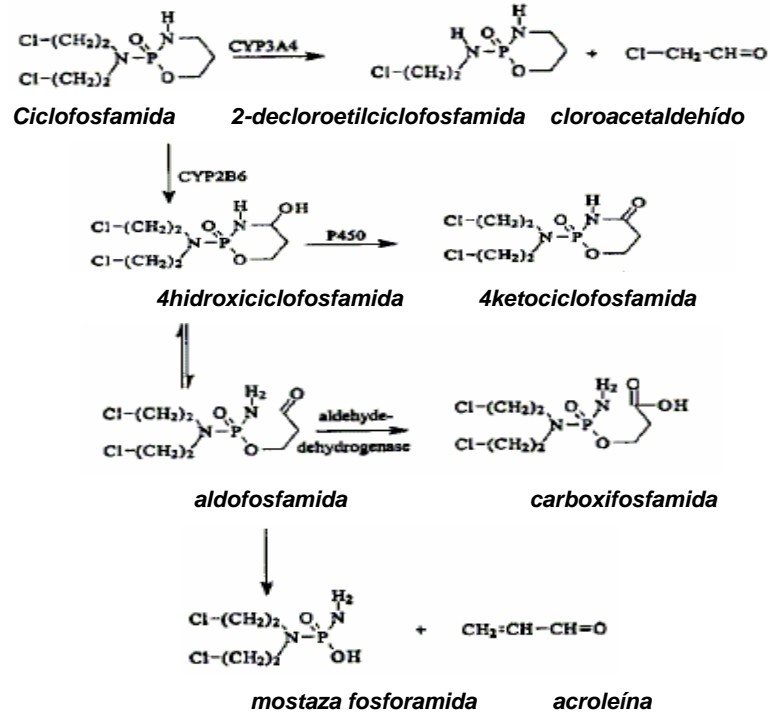


Figura III. 2 Vía metabólica de ciclofosfamida. Los enzimas encargados de catalizar las reacciones de metabolización de ciclofosfamida son: 1) complejo enzimático del citocromo P-450, 2) reacción no enzimática, 3) citocromo P-450 subfamilia 3A4, 4) e 5) isoenzimas de aldehído deshidrogenasa.

Simultáneamente a la formación de los metabolitos activos de ciclofosfamida, 4hidroxiciclofosfamida, aldofosfamida y mostaza fosforamida, se produce la excreción urinaria de ciclofosfamida inalterada y tres reacciones metabólicas que originan los metabolitos inactivos decloroetilciclofosfamida, cetociclofosfamida y carboxifosfamida. La oxidación de la cadena lateral de ciclofosfamida, mediada por CYP3A4, origina decloroetilciclofosfamida y cloroacetaldehído, compuesto con propiedades neurotóxicas (Bohnenstengel, 1995). Sin embargo, el proceso de detoxificación más importante es la transformación de 4hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida en cetociclofosfamida y carboxifosfamida, mediante la acción de diferentes isoenzimas de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) acoplada al coenzima nicotin-adenin dinucleótido (NAD) (Dockham, 1992; Moore, 1991). Este enzima se encuentra en una amplia variedad de tejidos, incluidas las células neoplásicas y el aumento de su actividad ha

sido asociado con el desarrollo de resistencia al tratamiento con ciclofosfamida (Sreerama, 1993).

El aclaramiento no renal por metabolismo hepático es la principal vía de eliminación de ciclofosfamida. No obstante, en el ámbito de dosis convencionales utilizado en la práctica clínica, no existe evidencia de saturación del metabolismo y el aclaramiento corporal de ciclofosfamida es aproximadamente de 5.4 L/h en pacientes con función hepática y renal normal, la ciclofosfamida está clasificada como fármaco de baja extracción (Moore, 1991). La semivida biológica de ciclofosfamida tras su administración intravenosa es de 3-12 horas, aunque tanto el fármaco como sus metabolitos pueden ser detectados en plasma después de 72 horas. El aclaramiento corporal de ciclofosfamida está aumentado en pacientes pediátricos y en aquellos que reciben concomitantemente tratamiento con fármacos inductores del metabolismo hepático (Bagley, 1973; Sladek, 1984).

Uno de los principales factores responsables de la amplia variabilidad interindividual en el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida es la expresión individual de los enzimas que intervienen en su vía metabólica (Busse, 1997). De hecho, como el aclaramiento sistémico de ciclofosfamida es mucho menor que el flujo sanguíneo hepático, el principal determinante de la variabilidad interindividual del aclaramiento es la capacidad intrínseca del hígado para metabolizar el fármaco y las alteraciones del flujo sanguíneo hepático en los pacientes en tratamiento con este fármaco no alteran su velocidad de eliminación. Sin embargo, la insuficiencia hepática puede reducir la velocidad de metabolización de ciclofosfamida y la velocidad de formación de 4hidroxiciclofosfamida. En este caso, como sólo una pequeña fracción de dosis es eliminada por orina, la exposición a los metabolitos activos no sufre cambios significativos (Moore, 1991). Así, tras la administración de 15 mg/kg de ciclofosfamida por vía intravenosa la semivida biológica de eliminación es mayor en pacientes con insuficiencia hepática que en pacientes con función hepática normal; sin embargo, no se evidencian diferencias en el desarrollo de toxicidad en ambos grupos de población (Juma, 1984). Estos hechos justifican la necesidad de no reducir las dosis a administrar en pacientes con insuficiencia hepática.

Ciclofosfamida es un potente inductor del CYP, que provoca la autoinducción de su propio metabolismo y origina un comportamiento farmacocinético tiempo dependiente. De hecho, en la administración a altas dosis en perfusión continua de 4 días, como tratamiento de acondicionamiento previo a la reinfusión de progenitores hematopoyéticos, se ha evidenciado un aumento de la actividad enzimática del CYP a lo largo del tratamiento y el aclaramiento de ciclofosfamida el cuarto día puede ser más de dos veces superior al aclaramiento inicial (Moore, 1988; Chen, 1995). Este hecho también se ha demostrado tras la administración de dosis múltiples por vía oral, pero no se ha evidenciado en pacientes con cáncer de mama que reciben tratamiento con dosis únicas de ciclofosfamida cada tres semanas, ni en pacientes en tratamiento concomitante con fenobarbital (D'Incalci, 1979; Chen, 1997). Por otra parte, las alteraciones en la actividad enzimática de CYP condicionan la evolución temporal de las concentraciones de ciclofosfamida pero, no sucede lo mismo con sus metabolitos (Moore, 1988; Sladek, 1984) y con la respuesta terapéutica o tóxica tras la administración concomitante de inductores enzimáticos (Colvin, 1990; McLeod, 1995).

Además, la disminución de la vida media de ciclofosfamida puede ser debida a la saturación de la unión a proteínas plasmática (Bagley, 1973). Este factor combinado con la autoinducción de ciclofosfamida y la inhibición del metabolismo de 4hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida provocaría una acumulación de los metabolitos activos que saturaría los lugares de unión a las proteínas plasmáticas. Este hecho se traduce en el aumento de la fracción libre y la disminución de la semivida (Kaijser, 1998). No obstante, son necesarios más estudios que investiguen la autoinducción de ciclofosfamida y confirmen las hipótesis existentes hasta el momento y su implicación clínica.

Han sido varios los mecanismos descritos en la bibliografía para tratar de explicar esta aparente autoinducción del metabolismo de ciclofosfamida. Sin embargo, de los datos publicados hasta el momento no es posible discernir si el aumento de metabolismo es debido al aumento de la cantidad del CYP (autoinducción), a la disminución de la velocidad de degradación del sistema enzimático, al aumento de la actividad del CYP como consecuencia de un cambio en el spin de la hemoproteína del CYP.

A las dosis convencionales administradas, el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida no ha mostrado ser dosis-dependiente. No obstante, tras la administración intravenosa de 4 g/m^2 en 90 minutos, ciclofosfamida posee un aclaramiento dosis-dependiente en la mitad de los pacientes tratados (Chen, 1995; Anderson, 1996; Chen, 1997). La descripción del aclaramiento corporal mediante un modelo de Michaelis-Menten, permite tratar adecuadamente la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas en forma de "palo de hockey" y estimar un constante de Michaelis-Menten de $250 \mu\text{M}$ ($70\text{-}494 \mu\text{M}$) (Chen, 1997).

Tras repetidas administraciones o infusiones continuas en pacientes con cáncer durante un periodo de varios días produce un incremento del aclaramiento total, pero no altera el volumen de distribución o el aclaramiento renal y disminuye la semivida de eliminación debido a la baja extracción hepática (Graham, 1983; Fasola, 1991). El aclaramiento tiempo dependiente de la ciclofosfamida ha sido modelado en la administración de dosis altas de 6 g/m^2 con infusión continua de 96 h por Hassan mediante un modelo mecanístico de inducción enzimática donde la ciclofosfamida incrementa la velocidad de producción del enzima y por ello incrementa la cantidad de enzima que elimina a la ciclofosfamida (Hassan, 1999). Cuando se administra $6\text{-}4 \text{ g/m}^2$ dosis pero infusiones cortas (1h) también se observa autoinducción, Huitema propone modelo mecanístico basado en citocromo P-450 (activación/inhibición enzimática) y la interacción fármaco-fármaco con la tiotepa que en el esquema quimioterapia se administraba después de la ciclofosfamida (Huitema, 2001). Este modelo también es propuesto por E. de Jonge (E.de Jonge, 2004b; E. de Jonge, 2005a).

En especial aquellos fármacos que son metabolizados por los isoenzimas CYP2B6, CYP2C9 y CYP3A4 del citocromo P-450 (Ren, 1997; Chang, 1993 y 1997; Hassan, 1999). Además el glutatión S transferasa (GST) y aldehído deshidrogenasa (ALDH). El polimorfismo de estas enzimas puede afectar a la farmacocinética de ciclofosfamida por lo tanto a su toxicidad o efectividad. En el estudio realizado por Ekhart, la evaluación de la variante de los alelos en CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP2A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 y ALDH3A1 no explica la variabilidad interindividual en la farmacocinética de la ciclofosfamida y 4hidroxiciclofosfamida, probablemente no son la causa de la variabilidad en la toxicidad observada (Ekhart,

2008a). Es conocida interacción de la ciclofosfamida y tiotepa utilizadas en este esquema, sin embargo no se pudo cuantificar esta interacción debido a no conocer los niveles plasmáticos de la misma. Un estudio reciente se ha visto que pacientes heterocigóticos para los alelos ALDH3A1*2 y ALDH1A1*2 han incrementado el riesgo de cistitis hemorrágica y toxicidad hepática, respectivamente, comparado con pacientes homocigóticos para estos alelos cuando son tratados con altas dosis de ciclofosfamida en combinación con carboplatino y tiotepa (CTC). La farmacogenética puede identificar pacientes con riesgo de toxicidad (Ekhart, 2008b).

En 1996, la relevancia clínica de esta observación no había sido establecida; sin embargo, en un estudio en *in vitro* se vio que la tiotepa inhibía el metabolismo de ciclofosfamida (Anderson, 1996). En 2001, Huitema y cols estudian esta interacción *in vivo*, describiéndola como una fuerte y reversible inhibición de la conversión de ciclofosfamida en 4hidroxiciclofosfamida. El valor IC₅₀, inhibición de la formación de 4hidroxiciclofosfamida por tiotepa fue 23µM. Este valor estaba en concordancia con el obtenido por Anderson, IC₅₀ entre 1 y 40 µM (Huitema, 2000b; Huitema, 2001). Esto prueba la hipótesis de la inhibición por tiotepa de los enzimas del citocromo P450 responsable de la metabolización de ciclofosfamida. La ciclofosfamida y tiotepa son ambos metabolizados por los enzimas de clase 2B y 2C (Chang, 1993 y 1997). La ciclofosfamida muestra una autoinducción que como consecuencia disminuye su exposición e incrementa la exposición de 4hidroxiciclofosfamida durante el tratamiento (Huitema, 1999; Ren, 1998). El AUC y C_{max} de 4hidroxiciclofosfamida fueron fuertemente reducidos cuando es administrada la tiotepa antes que ciclofosfamida, ya que estas pacientes reciben perfusiones de ciclofosfamida, carboplatino y tiotepa de aproximadamente de 1 hora durante 4 días, una infusión detrás de otra en un mismo día. El incremento del AUC 4hidroxiciclofosfamida fue acompañado con una disminución del AUC de ciclofosfamida, ya que la mayor vía de eliminación de la ciclofosfamida es 4hidroxiciclofosfamida. Sin embargo, también es metabolizada 2-decloroetilciclofosfamida. Una cantidad (17-29%) considerable de ciclofosfamida es eliminada por la orina de forma inalterada (Ren, 1998; Chen 1995). La eliminación vía 2-decloroetilciclofosfamida es aproximadamente 5 % (Ren, 1998; Busse, 1999). Chen y cols no han encontrado una diferencia significativa en la eliminación de ciclofosfamida inalterada en la orina cuando esta combinada con tiotepa (Chen, 1995; Huitema, 2001). Sin embargo Busse y Huitema han encontrado un incremento del

aclaramiento renal (ciclofosfamida inalterada) y en la formación de 2-decloroetilciclofosfamida comparando entre los tratamientos con dosis altas y convencionales de ciclofosfamida (Busse, 1999, Huitema, 2000b). Tanto ciclofosfamida como 2-decloroetilciclofosfamida no tiene actividad antitumoral.

Hay que tener en cuenta también el efecto de la comedicación que puede inhibir la bioactivación de la ciclofosfamida que es un profármaco que se bioactiva por citocromo P-450. En el estudio de E. de Jorge, fueron testados los posibles inhibidores de la bioactivación que son normalmente comedicación utilizada en el tratamiento de altas dosis de quimioterapia con microsomas de hígado humano. Los valores de K_m y V_{max} para la conversión de ciclofosfamida en 4hidroxiciclofosfamida fueron de 93 μM y 4.3 $\text{nmol/h}\cdot\text{mg}$, respectivamente. No se observó inhibición para el aciclovir, carboplatino, ciproxacino, granisetrón, mesna, metoclopramida, ranitidina, roxitromicina y temazepam. La inhibición fue observada para amfotericina B, dexametasona, fluconazol, itraconazol, lorazepam, ondansetrón y tiotepa con valores IC_{50} de 50, >100, >50, 5, 15, >100 y 1.25 μM , respectivamente. Solo la inhibición del metabolismo de ciclofosfamida por la tiotepa es clínicamente relevante y podría tener influencia en la respuesta terapéutica y tóxica de la ciclofosfamida (E. de Jonge, 2005c).

Eliminación

Aunque la principal vía de eliminación de ciclofosfamida es su metabolización en los microsomas hepáticos, existen otras vías de eliminación secundarias como son la eliminación renal o biliar. Así, en pacientes que reciben ciclofosfamida marcada con isótopos radiactivos, se ha obtenido una recuperación en orina del 70% de la actividad radiactiva administrada, 1.8% en heces y 1.2% en aire espirado. De la actividad radiactiva recuperada en orina, una pequeña parte corresponde con la excreción del fármaco inalterado que, aproximadamente, supone el 10% de la dosis administrada (Bagley, 1973; Juma, 1979). No obstante, la mayor parte de ciclofosfamida excretada por la orina está en forma de metabolitos inactivos, de los cuales la carboxifosfamida es el más abundante (Hadidi, 1988b; Busse, 1997).

La excreción urinaria de ciclofosfamida aumenta tras la exposición al fármaco como consecuencia de una menor reabsorción a nivel tubular (Bagley, 1973). Este

hecho, unido a la saturación de la unión a proteínas plasmáticas y la autoinducción del metabolismo, contribuye a explicar la disminución de la vida media de ciclofosfamida tras 24-48 horas de tratamiento (Kaijser, 1998).

En el caso de la insuficiencia renal, el aclaramiento de ciclofosfamida es similar al que poseen los pacientes con función renal normal (Bramwell, 1979). Además, en ambos grupos de población no existen diferencias significativas en la incidencia de toxicidad hematológica (Grochow, 1983). Por tanto, al igual que en la insuficiencia hepática, en la insuficiencia renal no es necesario reducir las dosis a administrar. Sin embargo, en pacientes sometidos a sesiones de hemodiálisis de 6 horas de duración la recuperación de ciclofosfamida en el líquido de diálisis alcanza hasta el 72% de la dosis administrada. De hecho, estos pacientes presentan una semivida biológica más corta que los pacientes con insuficiencia renal no sometidos a diálisis (Juma, 1981).

Recientemente, Ekhart estudio la alteración de la farmacocinética de ciclofosfamida y tiotepa en pacientes con insuficiencia renal moderada; los resultados sugieren que no es necesario ajustar la dosis de ciclofosfamida en estos pacientes. Sin embargo, hay que tener precaución con la tiotepa pues se hay una correlación entre exposición y toxicidad (Ekhart, 2008c).

III.2. Administración de Altas Dosis de Quimioterapia.

Desde que Hryniuk en 1986, introdujo el concepto de intensidad de (Hryniuk, 1986a), referido a dosis ajustada al tamaño corporal por semana ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$), cuyo método más habitual de aplicar es la escalada de dosis, se presentaron una serie de estudios retrospectivos, que avalaban la importancia de este concepto en el tratamiento del cáncer de mama a la vez que detectaban contradictorios (Hryniuk, 1986b; Hryniuk, 1988). En cualquier caso, la información retrospectiva y algunos datos prospectivos respaldan la opinión de que se debe evitar la reducción arbitraria de la intensidad de la dosis (Amador, 2004; Budman, 1998; Pérez-Ruixó, 2000). En efecto, varios autores informan que los beneficios clínicos de la terapia adyuvante (supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global) en cáncer de mama disminuyen cuando no se administran las dosis completas predefinidas o programadas (Bonadonna, 1995; Wood, 1994; Budman, 1998; Colleoni, 1998).

La quimioterapia intensiva se inició hace ya más de 20 años. Hasta el momento, la quimioterapia intensiva en varios tumores sólidos parece conseguir una mayor tasa de respuestas objetivas, pero dada la toxicidad del tratamiento, el alto coste y la tecnología empleada, el objetivo final de este tratamiento debe ser exclusivamente el aumento de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. Por lo tanto, la quimioterapia intensiva debe realizarse en las situaciones más favorables: en pacientes con tumores quimiosensibles en respuesta completa o parcial o como modalidad adyuvante para aumentar el porcentaje de pacientes curados.

En los tratamientos de intensificación es necesario distinguir la administración de los antineoplásicos a dosis convencionales e intervalos de tiempo más cortos (densidad de dosis) de los predeterminados en los correspondientes esquemas y los tratamientos basados en dosis altas. Estos se caracterizan porque los antineoplásicos se administran a dosis superiores a las convencionales y obliga en el 100% de los casos al ingreso del paciente con el fin de llevar a cabo cuidados de soporte (McCauley, 1996; Gurney, 1993a; Gurney, 1993b).

La intensificación de dosis con ciclofosfamida ha sido estudiada por los protocolos B-22 y B-25 del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) con dosis de hasta 1.200 mg/m², sin soporte y hasta 2.400 mg/m² asociando al tratamiento el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF); desafortunadamente no hubo ventaja significativa ni en la prolongación de la supervivencia libre de enfermedad ni en la supervivencia global al compararlas con la dosis estándar de 600 mg/m² (Fisher, 1997; Fisher, 1999).

En el caso de la doxorubicina la intensificación de dosis se realizó con el estudio C9344 del US Intergroup, asignando al azar a mujeres, con tumores y ganglios positivos, en tres grupos según fueran a recibir 60/75/ o 90 mg/m², respectivamente. Después del tratamiento se hizo una segunda asignación aleatoria para recibir paclitaxel o no recibir ninguna otra terapia y también se les ofreció a las pacientes con tumores de receptores de estrógeno positivos tamoxifeno durante 5 años. De nuevo no se encontró diferencia en cuanto a supervivencia libre de enfermedad relacionada con la dosis de doxorubicina. En contraste con esta información, un estudio canadiense en

el que se combinó epirubicina con ciclofosfamida y FU-5 (esquema FEC) y se administró hasta una dosis total de ciclofosfamida de 720 mg/m^2 durante seis ciclos de 4 semanas cada uno, consiguió en las pacientes una supervivencia libre de enfermedad (sin recaída) y una supervivencia global superior en comparación con el esquema CMF con valores significativos de 63% frente a 53%, $P = 0.009$ y 77% versus 70%, $P = 0.03$, respectivamente (Levine, 1998). La forma en que se ideó el ensayo no permite determinar si la antraciclina o la intensidad de la dosis es la responsable de la mejoría en los resultados o si es la combinación de ambos factores. De acuerdo con los resultados del estudio Bonnetterre J y col la intensificación de la dosis de epirubicina conllevó a unas tasas más altas de supervivencia en mujeres con enfermedad de pronóstico precario (Bonnetterre, 2005). Sin embargo, a los 10 años en mujeres premenopáusicas con ganglios positivos las dosis altas de epirubicina no conllevaron un aumento en la supervivencia (Fumoleau, 2003).

En el cáncer de mama, el tratamiento basado en la administración de quimioterapia a altas dosis y rescate con células precursoras hematopoyéticas surge como consecuencia de dos ensayos clínicos fase I realizados a mediados de los años 80 (Peters, 1986; Eder, 1988). Estos estudios se realizaron sobre pacientes refractarias o en recidiva tras recibir varios esquemas de quimioterapia estándar previos y el tratamiento consistía en la administración de 2 o 3 agentes alquilantes en combinación (ciclofosfamida, cisplatino, carmustina o melfalán). Los resultados pusieron de manifiesto la posibilidad de obtener un porcentaje elevado de respuestas parciales e incluso de respuestas completas. Sin embargo, estas respuestas fueron escasas, de corta duración y sin traducción en la supervivencia. Estos ensayos contribuyeron al establecimiento de las dosis máximas toleradas de los citostáticos administrados y fue el paso previo para el inicio de otros nuevos ensayos, esta vez en mujeres con enfermedad metastásica. En una primera etapa, la quimioterapia intensiva con trasplante de médula ósea se realizó como tratamiento de inicio en un sólo ciclo y se logró una elevada tasa de respuestas completas y un porcentaje considerable de supervivencia de larga duración.

Según el estudio realizado por Tallman se administraba dosis convencionales con o sin altas dosis con autotransplante de células autólogas en pacientes con cáncer de mama, se concluye que no había diferencia significativa en tasa de supervivencia a los

cinco años (Tallman, 2003). El estudio randomizado de Leonard dosis convencionales v.s. altas dosis se concluía que la dosis alta de quimioterapia no es superior a la dosis convencional en pacientes con cáncer de mama con múltiples nódulos implicados (Leonard, 2004).

El estado actual de la información sobre la intensificación de la dosis en el tratamiento del cáncer de mama sigue situado en el escenario de la polémica ya que existen cuestiones no resueltas como ¿cuál es la influencia de la dosis sobre la eficacia del tratamiento de intensificación? y ¿cuál es el efecto de la dosis umbral en términos de respuesta? (Dang, 2005).

El ensayo intergrupar Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9741 comparó, en un diseño factorial 2x2, el uso de adriamicina (A), ciclofosfamida (C) y paclitaxel (T) de forma secuencial (AC seguido de T) versus la administración concurrente (TAC) cada 3 semanas o cada 2 semanas, con soporte de filgrastim en 2005 pacientes pre y posmenopáusicas con ganglios positivos. No se encontró diferencia alguna en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad o global entre las pacientes pertenecientes a los regímenes administrados de forma concurrente o secuencial. Sin embargo, las pacientes sometidas al régimen de cada dos semanas mostraron una tasa de superioridad en cuanto supervivencia libre de enfermedad. (CRI = 0.74; IC 95%, 0.58-0.93) y supervivencia global (CRI = 0.69; IC 95%, 0.50-0.92), con una diferencia a 3 años de 3% y 2%, respectivamente (Citron, 2003).

Un metanálisis con 13 estudios (Farquhar, 2005), incluye 2535 mujeres asignadas a la azar a recibir quimioterapia de dosis altas con autotransplante y 2529 mujeres asignadas al azar a recibir quimioterapia convencional. Hubo 65 muertes relacionadas con el tratamiento en el brazo de dosis altas y cuatro en el brazo de dosis convencional (RR 8.58; IC del 95%: 4.13 a 17.80).

Se realizó otro metanálisis con 13 estudios randomizados que comparaban dosis altas con convencionales en mujeres con cáncer de mama con mal pronóstico. Incluyendo 5064 mujeres, hubo un significativo beneficio de supervivencia para el grupo de altas dosis a los 3 años (RR 1.19; IC 95% 1.06, 1.19) y a los 4 años. (RR 1.24; IC del 95%: 1.03 a 1.50) y a los 5 años fue estadísticamente significativo (RR

1.06; IC 95% 1.00, 1.13). Las razones de supervivencia global no fueron significativamente diferentes en ningún durante el seguimiento. Había más muertes relacionadas con el tratamiento en el brazo de altas dosis (RR 8.58; IC del 95%: 4.13 a 17.80). La morbilidad fue mayor en el grupo con altas dosis pero la diferencia no fue significativa en la incidencia de cánceres secundarios. El grupo con altas dosis mostraba pero calidad de vida inmediatamente después del tratamiento, pero había pocas diferencias en un año. En conclusión, no hay suficiente evidencia que soporte el uso de altas dosis de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama con mal pronóstico (Farquhar, 2007).

Estas cifras, altamente interesantes, no han permitido cambiar la curva de supervivencia global de todas las enfermas y por consiguiente, dada la toxicidad del tratamiento, éste debe todavía considerarse en fase experimental. Así pues es necesaria la realización de ensayos clínicos fase III aleatorizados para establecer conclusiones definitivas y avalar la utilización de altas dosis de quimioterapia y rescate de células hematopoyéticas en la práctica clínica asistencial.

Los fármacos más utilizados en el tratamiento de cáncer de mama metastásico son ciclofosfamida, tiotepa, carboplatino o cisplatino y carmustina, se caracterizan por presentar una gran actividad frente al cáncer de mama. Los tipos de quimioterapia intensiva de consolidación más experimentados son: CVP (ciclofosfamida, etopósido y cisplatino) del M.D. Anderson de Houston (Dunphy, 1990), CBP (ciclofosfamida, BCNU y carboplatino) de la Universidad de Durham (Kotesek, 1994), CT (ciclofosfamida y tiotepa) de la Universidad de Chicago y del Johns Hopkins Hospital (Williams, 1989; Kennedy, 1991), CCbT (ciclofosfamida, carboplatino y tiotepa) del hospital Dana Farber de Boston (Antman, 1992). Este último esquema también se denomina STAMP-V (en inglés, acrónimo de Solid Tumor Autologous Marrow Program), es considerado como el protocolo de quimioterapia a altas dosis que provoca una menor mortalidad (5%), gracias a la administración en perfusión intravenosa continua de 96 horas, así como la ausencia de toxicidad pulmonar y renal al no incluir fármacos como la carmustina y el cisplatino (Antman, 1992; McCauley, 1996). Gast (Gast, 2002), hace referencia a los beneficios en 11 pacientes con cáncer de mama metastásicos tratados con dosis altas repetidas y trasplantes autólogo. De los cuales, 5 tienen remisión

completa y el resto menos 1 que muere a los 7 meses siguen vivos (Horton, 2000, Bergh, 2000).

Las mujeres con invasión de 4 o más ganglios en el momento del diagnóstico presentan un elevado riesgo de recidiva (*Cáncer de mama de alto riesgo*). En efecto, entre el 65% y el 80% de las pacientes con tumores de más de 5 cm presentan recidivas en los primeros cinco años. Mientras que las pacientes con tumores de menos de 2 cm y sin afectación ganglionar tienen tasas de recidivas a los 5 años que no superan el 15%. Este hecho justifica la evaluación de las altas dosis de quimioterapia y el rescate con células precursoras hematopoyéticas como tratamiento adyuvante en este grupo de pacientes.

En este sentido, existe un creciente número de estudios que evalúan esta estrategia terapéutica como tratamiento de consolidación para este grupo de pacientes (Koteseck, 1994; Peters, 1993). Consideran, como pacientes de alto riesgo, aquellas en estadios II y III que presentan más de 10 ganglios afectados. El tratamiento estándar consta de la administración de quimioterapia adyuvante estándar, basada en la administración de antraciclinas, altas dosis de quimioterapia y rescate hematopoyético, radioterapia y tamoxifeno si la paciente presenta los receptores estrogénicos positivos. Con esta estrategia, se ha evidenciado que el 71% de las pacientes permanece libre de enfermedad, comparado con el 28-34% alcanzado en otros ensayos clínicos con dosis estándar de quimioterapia, tras 5 años de seguimiento (Peters, 1995).

Aún en el caso que esta modalidad terapéutica demostrara su eficacia todavía no se dispone de información suficiente para evaluar la importancia relativa de los tratamientos de intensificación frente a los de altas dosis, así como los potenciales pacientes que se beneficiarían de recibir estas alternativas terapéuticas, ni las implicaciones económicas que conlleva, ni los efectos que a largo plazo puede ocasionar. Tampoco se ha esclarecido cual es el protocolo de quimioterapia óptimo a utilizar en la práctica clínica, ni si la administración de sucesivos ciclos de altas dosis mejorase la respuesta al tratamiento, en términos de recidivas y de supervivencia global (McCauley, 1996).

III.2.1. Evidencia de la eficacia de la administración de altas dosis de quimioterapia.

El tratamiento de tumores sólidos con altas dosis de quimioterapia, con o sin soporte de progenitores hematopoyéticos, es una de las estrategias terapéuticas que más expectativas ha creado en el desarrollo oncológico de la última década. Las altas dosis de quimioterapia se basan en las hipótesis de que son capaces de vencer la resistencia a fármacos, erradicar la enfermedad metastásica e incrementar la proporción de curación.

Los primeros ensayos clínicos de quimioterapia a altas dosis en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo o metástasis, fueron iniciados en los años 80. A principio de los años 90, Dr Peters William presenta en la sociedad americana de oncología clínica los resultados preliminares de los estudios en fase II en pacientes con más de 10 nódulos axilares positivos (tabla III.7.) (Peters, 1990). Estos pacientes fueron tratados con dosis estándares de quimioterapia adyuvante seguidas por un ciclo de altas dosis agentes alquilantes, con resultados esperanzadores. Estos resultados impulsaron el entusiasmo por convertir la terapia adyuvante de altas dosis a una opción estándar para el tratamiento de cáncer de mama de alto riesgo (Antman, 1992).

Tabla III. 7 Resultados de altas dosis de quimioterapia adyuvante para cáncer de mama con 10 o más nódulos: Ensayo en Fase II.

Institución	Nº pacientes	2 años	3 años	5 años
Milán	67	93	-	56
Universidad de Duke	85	79	71	71
City of Hope	46	73	-	-
Universidad de Emory	27	80	-	-

- información desconocida

En 1998, fueron presentados los resultados preliminares de dos ensayos randomizados comparados con dosis estándar de terapia adyuvante con FAC o FEC. The *Netherlads Cancer Institute* randomizadamente asigna 81 mujeres, con una afectación nódulos linfáticos axilar apical tratadas, con 4 ciclos más un régimen de altas dosis de FEC o CTCb con trasplante, seguido de radiación y 2 años de

tamoxifeno. En la mediana de seguimiento de 49 meses, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global fueron similares (Rodenhuis, 1998).

Un segundo estudio de la University Texas *M. D. Anderson Cancer Centre*, Houston, randomizadamente asignó 78 pacientes a 8 ciclos de FAC con o sin ciclos de quimioterapia a altas dosis con ciclofosfamida, etopósido y cisplatino. Con una mediana de seguimiento que excede los 78 meses, no hubo ventajas para los pacientes tratados con altas dosis. Este estudio fue cerrado, pues tenía suficiente poder estadístico (más del 30%).

En el congreso ASCO celebrada en 1999, se dedicó de forma monográfica, a la exposición y análisis de 4 trabajos aleatorizados sobre el papel de la quimioterapia a altas dosis en las pacientes con cáncer de mama. El Dr Hortobagi en su intervención hizo referencia a la nueva información que aportan los ensayos de Peters, Bergh y Bezwoda junto a las importantes controversias de los últimos años (tabla III.8.).

Tabla III. 8 Ensayo randomizado de a altas dosis de quimioterapia adyuvante para cáncer de mama primario.

Autor	Quimioterapia de inducción		Quimioterapia altas dosis	Fechas	Nº de centros	Media de seg. (meses)
	Programada	Tipo				
Peters	Post-cirugía	CAF x 4	C,B,cP	1/91-5/98	40	37
Bergh	Post-cirugía	FEC x 4	C,Tt, Cb	?	?	24
Bezwoda	Ninguno	NA	C,MX,E	?	1	64

NA: No aplicable; seg: seguimiento; FEC: 5 Fluoruracilo, epirrubicina y ciclofosfamida; CAF: ciclofosfamida, adriamicina y 5-Fluoruracilo; Mx: metotrexato; Cb: carboplatino; Tt: Tiotepa; B: BCNU; C: ciclofosfamida.

Esto indicaba la necesidad de cuestionarse la hipótesis de que un solo ciclo de quimioterapia, con agentes alquilantes a dosis altas o regímenes similares, como tratamiento de mantenimiento puede resultar curativo, así como la necesidad de explorar en mayor profundidad distintas estrategias como la administración de altas

dosis de quimioterapia como terapia o varios ciclos de quimioterapia utilizando dosis intermedias.

Los ensayos clínicos randomizados “Cancer and Leukemia Group B (CALGB)” (Peters WP), “SBG” (Bergh), “Dutch” (Rodenhuis), “MD Anderson” (Hortobagyi) incluyen un total de 1467 pacientes. La mediana de seguimiento fue de 2 a 6.5 años en 1999. Ninguno de estos estudios mostraron ventajas estadísticamente significativas para las altas dosis con trasplante (Antman, 1999). De hecho, 2 de los estudios mostraron una tendencia no significativa a favor de régimen con trasplante (Hortobagyi, 1999). El ensayo “Dutch “ fue el más grande de todos los estudios publicados (885 pacientes randomizados) y por tanto, tiene el mayor poder estadístico para detectar modestas diferencias. La comparación de 4 ciclos de FEC (una combinación de 5-fluoruracilo, epirubicina y ciclofosfamida) con sus adicionales ciclos de FEC o con CTCb (combinación de ciclofosfamida, tiotepa y carboplatino) con trasplante, radioterapia y tamoxifeno durante 2 años. En el estudio completo, la mortalidad fue de 1 de 443 pacientes con dosis estándar FEC y 4 de 442 con altas dosis CTCb. Las medianas de seguimiento durante 3 años, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global fueron significativamente mejores para las altas dosis. La mediana de 3 años de seguimiento, la tendencia fue de (P=0.057) los resultados fueron favorable a las altas dosis. En un primer análisis de 284 pacientes, la mediana de supervivencia a los 6 años, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia global fueron significativamente mejores para la terapia de altas dosis. Mostró un 15% en supervivencia libre de enfermedad para altas dosis en el grupo con seguimiento más largo.

El ensayo “Scandinavian” participaron 525 pacientes entre los meses de marzo de 1994 y 1998, comparando 3 ciclos de inducción FEC seguidos por un ciclo de altas dosis CTCb con 6 ciclos de altas dosis moderadamente ajustados FEC (Las dosis en mg/m² de FEC fueron ajustados a individual tolerancia a 600 de 5-fluoruracilo, 120 de epirubicina y 1800 de ciclofosfamida por ciclo). Las dosis acumulativas de la terapia ajustada excedieron en el brazo de pacientes que recibieron altas dosis de CTCb. Por lo tanto, estos estudios evaluaron las diferencias entre un ciclo de alta dosis con 6 ciclos de quimioterapia de intensificación. Estos estudios probablemente incluyeran

algunos pacientes con enfermedad metastásicas (pacientes con médula afectada y anormal ecografía de hueso fueron incluidas) (Bergh, 2000).

La mediana de seguimiento durante 3 años, la supervivencia libre de enfermedad fue significativamente mejorada para los 6 ciclos de la terapia con dosis ajustadas comparada con 1 ciclo de altas dosis. De los 251 pacientes sobre el brazo de dosis-ajustadas, 6 pacientes desarrollaron leucemia y 3 mielodisplasia, comparado con ninguna sobre el brazo de trasplante. La mediana de seguimiento fue sólo de 3 años por ello pueden aparecer casos adicionales. Asociando la topoisomerasa la tendencia a producir leucemia temprana, pero las leucemias producidas por agentes alquilantes son de tendencia retardada. El trasplante recogido después de 3 ciclos de quimioterapia es menos perjudicial que la aplicación 6 ciclos escalados.

Un gran ensayo randomizado apuntaba hacia la confirmación de los resultados sugeridos por Bezwoda que se inició en 1990 y finalizó en 1995, cuando se comparaban las altas dosis a las dosis con el mejor esquema de dosis convencionales. Antes de que algún ensayo confirmara lo contrario pensaron en la revisión de los estudios realizados por Bezwoda. Un grupo de oncólogos de US intergroup hizo una revisión en enero del 2000. De esta revisión se pudo ver las múltiples controversias del estudio de Bezwoda que hizo que los resultados no fueran validos. Pues él tergiverso el grupo control en sus publicaciones. Los resultados de los estudios no deberían ser utilizados. La revisión proporciona una fuerte evidencia de la importancia de las revisiones de los ensayos clínicos (Weis, 2000).

En la ASCO del 2000 fueron presentados por grupo "Dutch" los primeros resultados del estudio randomizado de 885 pacientes quienes recibieron FEC a dosis convencionales (5-FU 500 mg/m², epirubicina 90 mg/m² y ciclofosfamida 500 mg/m²) 5 ciclos comparado con 4 ciclos de FEC seguido por carboplatino, tiotepa y ciclofosfamida (CTCb). Los primeros análisis de todos los pacientes no muestran diferencia significativa alguna en la supervivencia global, muy cerca de ser estadísticamente significativa para tiempo libre de enfermedad en el caso de los que recibieron la terapia de trasplante con altas dosis. Sin embargo, en el análisis de un

subgrupo de 284 pacientes, ha sido descrito un beneficio significativo en la supervivencia de aquellos pacientes que recibían altas dosis.

Finalmente, Bearman en agosto de 2000 escribe: “ningún estudio fue diseñado para realizar análisis intermedios”. En el estudio SBG 9401, los últimos resultados publicados del fueron 104 recaídas de 251 pacientes tratadas con dosis ajustadas de FEC respecto a 139 recaídas de 274 pacientes tratadas altas dosis de CTCb (ciclofosfamida, tiotepa y carboplatino), la media de seguimiento para todos fue 60.8 meses. El tiempo libre de supervivencia fue de 121 y 150 eventos y las muertes de 100 y 121 pacientes, respectivamente. La conclusión fue que este estudio muestra una mejoría del tratamiento con una dosis ajustadas de FEC en la recaída del cáncer de mama, pero también incrementa la incidencia mieloide grave y mielodisplasia (Wilking, 2007).

En la ASCO, de 2001 fueron presentados los resultados finales del Cancer and Leukemia Group B 9082 (CALBG9082) (Peters, 1999). Un total de 785 pacientes con 10 o más nódulos axilares positivos fueron randomizadamente tratadas con ciclofosfamida doxorubicina/5FU (CAF) seguido por HDCT con STAMP-I (ciclofosfamida, cisplatino y BCNU a 5625, 165 y 600 mg/m², respectivamente) o un único ciclo con los mismos fármacos con intervalos de dosis (900, 90 y 90 mg/m², respectivamente). Este control no estándar fue escogido para proporcionar simetría entre los grupos de tratamiento en todos los aspectos menos en la dosis. Todas las pacientes recibieron irradiación en el pecho y las pacientes con receptores estrógeno positivos recibieron en tamoxifeno durante 5 años.

La mediana de seguimiento es de 5.5 años y un 89% de los eventos requeridos por el análisis, ambos evento libre y supervivencia global fueron equivalentes (tabla III. 9). La razón recidiva fue más alta en el brazo de dosis estándar que en el brazo de altas dosis, hay un incremento en la mortalidad temprana en los pacientes que reciben altas dosis. Tratamiento-recaída mortalidad fue claramente relacionado con la edad de los pacientes y la experiencia del tratamiento del centro 4% en pacientes más jóvenes de 40 años vs 14 % en pacientes mayores de 50 años y 7% mortalidad en centros más grandes vs 15% en centros más pequeños. La mayoría de datos este ensayo muestra una mayor mejoría en la supervivencia global con un seguimiento más largo.

El Instituto Nazionale Tumori, Milan, Italia y el Michelangelo Cooperative Group, informó de los resultados de 5 años del ensayo randomizado comparando dosis estándares con HDCT en 382 pacientes con 4 o más nódulos afectados (Gianni, 2001).

Tabla III. 9 Ensayo randomizado a altas dosis de quimioterapia vs dosis convencionales.

	Dosis estándar	HDCT
Eventos libres de enfermedad (%)	60	61
Supervivencia global (%)	72	70
Recaída (%)	39.1	28.9
Muertes por tratamiento	0	32

HDCT: Altas dosis de quimioterapia.

Todas las pacientes recibieron tamoxifeno durante 5 años a pesar del estado de receptores. Las HDCT no mejoraron de la progresión libre de enfermedad o la supervivencia global (tabla III.10).

Tabla III. 10 HDCT vs Epirrubicina/ Ciclofosfamida, Metrotrexato, Fluoruracilo: no diferencias en la supervivencia.

	ET y CMF(n=197)	HDCT(n=185)
Supervivencia libre	62	65
Supervivencia global	77	76

HDCT: Altas dosis de quimioterapia; ET: Epirrubicina;CMF: Ciclofosfamida, metrotrexato y Fluoruracilo

A pesar de la avalancha de datos publicados sobre este aspecto y de una tendencia hacia una mayor efectividad de la quimioterapia de intensificación, no existen ensayos clínicos aleatorizados que permitan evidenciar la superioridad de este tipo de tratamientos y avalen su utilización en la práctica clínica, especialmente por los resultados controvertidos recientemente aparecidos desde Europa (Amador, 2004). El estudio de Quintela (Quintela-Fandino, 2006), con 84 pacientes con cáncer de mama de alto riesgo tratadas con quimioterapia adyuvante, STAMP V y seguimiento de 64 meses (5.3 años), informa de 45 recaídas y 35 muertes.

III.3. Análisis Farmacocinético

Entre los factores que pueden explicar la distinta respuesta clínica en los pacientes se encuentra la variabilidad inherente a los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos, cuyo análisis y manejo en el paciente, constituye un reto para los profesionales sanitarios. De hecho, para muchos fármacos, sigue sin ser posible predecir el resultado clínico de su administración con relación a su comportamiento cinético y dinámico.

Clásicamente, el establecimiento de una pauta posológica se ha basado en las relaciones dosis-respuesta. La relación existente entre la respuesta farmacodinámica y la dosis ha merecido la atención de numerosos estudios, con objeto de predecir cual será la respuesta clínica del paciente ante la administración del medicamento (Sambol, 1989). Sin embargo, las limitaciones en la interpretación de las curvas dosis-respuesta justifican la necesidad de profundizar en el estudio de la relación entre la concentración del fármaco y su efecto farmacológico. Este objetivo se alcanza de forma más directa cuando se estudia la relación existente entre la concentración de fármaco en el organismo y su respuesta clínica que, cuando se hace con respecto a la dosis-respuesta ya que, para definir las bases científicas de la farmacoterapia, generalmente, se requiere hacer referencia a la evolución temporal de sus concentraciones plasmáticas (Holford, 1995).

En el campo de la oncología, una característica principal del tratamiento farmacológico antineoplásico es la variabilidad en la respuesta clínica deseada. Las razones o determinantes de esta variabilidad se han tratado de fundamentar en los complejos procesos intracelulares y en los mecanismos de acción y resistencia de los citostáticos por lo que, la potencial relación de la dosis con la respuesta todavía se sigue utilizando como criterio para predecir la respuesta en el paciente oncológico (Grochow, 1998; Gurney, 1996). Pero, el concepto probabilístico de la dosis-respuesta se encuentra prácticamente superado en base a que, la variabilidad en los procesos que acontecen, por tanto es multifactorial y no sólo explicable por la dosis. En pacientes diagnosticados de cáncer la consecución de resultados óptimos presenta,

una barrera adicional derivada del estrecho índice terapéutico que presentan la mayoría de los fármacos antineoplásicos. Esta circunstancia supone una dificultad añadida para definir la dosis óptima que, no obstante, siempre implica un riesgo de toxicidad en el paciente oncológico superior al inherente en el tratamiento farmacoterapéutico de otras enfermedades.

El interés por conocer y cuantificar las distintas fuentes de variabilidad en la respuesta farmacológica se fundamenta en la hipótesis de que, reducir variabilidad en la disposición por el organismo a los antineoplásicos es disminuir variabilidad en su respuesta clínica, tanto en términos de eficacia como de toxicidad y calidad de vida de los pacientes (Jiménez, 1999). El análisis farmacocinético y farmacodinámico en amplios grupos de población ha puesto de manifiesto que la amplia variabilidad interindividual en el comportamiento farmacodinámico de los pacientes, en la mayoría de los casos, es superior a la variabilidad farmacocinética. Un ejemplo de este hecho se evidencia en los analgésicos opiáceos (Levy, 1998).

El análisis farmacocinético y farmacodinámico se basa en el desarrollo de modelos capaces predecir la pauta posológica óptima que debe recibir un paciente. Un modelo es una función matemática que realiza una descripción simplificada de un aspecto concreto de la realidad. Y como tal función matemática, esta compuesta por una variable dependiente, que en los modelos farmacocinéticos habitualmente es la concentración de fármaco y en los dinámicos es la respuesta del efecto farmacológico; una o más variables independientes, como es el tiempo en los modelos farmacocinéticos y la concentración del fármaco en los modelos dinámicos; una o más constantes, como la dosis en los modelos farmacocinéticos y el efecto farmacológico basal en algunos modelos farmacodinámicos y uno o más parámetros, cuyo valor permite evaluar las propiedades intrínsecas del fármaco estudiado en relación con otros principios activos. Los términos volumen de distribución y aclaramiento son parámetros típicos de los modelos farmacocinéticos y el efecto farmacológico máximo y la concentración de fármaco que produce la mitad del efecto máximo son parámetros típicos de los modelos farmacodinámicos.

En esta Memoria, el término modelo farmacocinético se emplea para describir la

evolución temporal de las concentraciones del fármaco en el organismo, la denominación modelo farmacodinámico se utiliza para describir el efecto farmacológico en función de las concentraciones del fármaco en la biofase y los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos quedan restringidos para describir la relación entre las concentraciones en plasma y en biofase cuando ambas no se encuentran en equilibrio.

III.3.1. Modelos farmacocinéticos

III.3.1.1. Administración intravenosa de medicamentos en perfusión continua

En algunas ocasiones se busca la incorporación del fármaco al organismo mediante una cinética de orden cero a través de la administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante, k_0 . En este caso, las curvas concentración-tiempo generadas con este método de administración se caracterizan por alcanzar y mantener una concentración única y prácticamente constante, durante el tiempo en que se mantiene el tratamiento. Las expresiones diferenciales se expresan en las ecuaciones III.1 y III.2:

$$\frac{dC}{dt} = k_0 - k_{el} \cdot C \quad \text{Ecuación III. 1}$$

$$\frac{dC}{dt} = k_0 - k_{el} \cdot C - k_{12} \cdot C + k_{21} \cdot P \quad \text{Ecuación III. 2}$$

Las curvas de nivel plasmático tras la administración intravenosa en perfusión continua presentan dos tramos muy bien delimitados que resultan de la superposición de los procesos de incorporación de orden cero y eliminación de orden uno para el modelo de distribución monocompartimental y originan los perfiles concentración plasmática-tiempo que se muestran en la figura III.3.

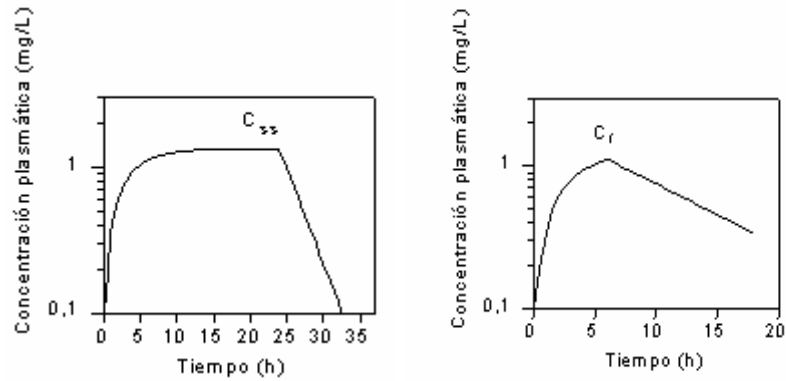


Figura III. 3 Curvas de concentración plasmática-tiempo, a escala semilogarítmica, obtenidas mediante perfusión intravenosa a velocidad constante de fármacos monocompartimentales, tanto si se alcanza (derecha) o no (izquierda) el estado estacionario antes de finalizar de la perfusión intravenosa (Jiménez, 1997).

El tramo inicial es ascendente y convexo, que resulta de la incorporación y desaparición del fármaco y se denomina, en general, fase de absorción. Durante esta fase el perfil de las curvas es bastante similar, tanto para fármacos monocompartimentales como bicompartimentales; sin embargo, las ecuaciones que definen el perfil temporal de la concentración del fármaco son totalmente diferentes. Así, la ecuación que representa la concentración de fármaco a cualquier tiempo, t , desde el inicio de la perfusión intravenosa en el modelo monocompartimental se corresponde con la ecuación III.3:

$$C_t = \frac{K_o}{k_{el} \cdot V_d} (1 - e^{-k_{el} \cdot t}) \quad \text{Ecuación III. 3}$$

Si la perfusión intravenosa se mantiene un tiempo suficientemente grande, la concentración del fármaco se hace prácticamente constante y se obtiene la denominada meseta o concentración en estado estacionario, C_{∞} . En efecto, para fármacos monocompartimentales, la exponencial $e^{-k_{el}t}$ de la ecuación III.3 se reduce a cero y esta ecuación se transforma en la ecuación III.4.

$$C_{\infty} = \frac{k_o}{k_{el}} = \frac{K_o}{k_{el} \cdot V_d} = \frac{K_o}{Cl_p} \quad \text{Ecuación III. 4}$$

Cuando se interrumpe la perfusión intravenosa aparece el segundo tramo de la curva que se caracteriza por ser descendente y cóncavo. Este tramo se debe sólo a los procesos de eliminación para un modelo, el modelo monocompartimental y es independientemente de si se ha alcanzado o no el estado estacionario. La curva de la concentración de un fármaco monocompartimental a cualquier tiempo, t , posterior al tiempo de perfusión, T , queda definida por las ecuaciones III.5 y III.6, según se haya interrumpido la perfusión intravenosa sin haber alcanzado la concentración asintótica o habiéndose alcanzado, respectivamente.

$$C = \frac{k_o}{k_{el}} (1 - e^{-k_{el}T}) \cdot e^{-k_{el}(t-T)} \quad \text{Ecuación III. 5}$$

$$C = C_{\infty} \cdot e^{-k_{el}(t-T)} \quad \text{Ecuación III. 6}$$

III.3.1.2. Modelos farmacocinéticos no lineales

Aunque en la mayoría de los fármacos los procesos de absorción, distribución y eliminación son lineales, existen algunos principios activos en los que estos procesos son no lineales. En este caso, la cinética que mejor describe los pares de valores concentración-tiempo es de orden mixto. En este apartado se considera únicamente la no linealidad en la fase de eliminación, ya que la mayor parte de los procesos saturables descritos conciernen al metabolismo. En un fármaco con características de monocompartimentalidad que se administra por vía intravenosa en bolus y se elimina sólo por metabolismo saturable, la concentración del fármaco cambia con el tiempo de acuerdo con la cinética mixta que expresa la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{V_{max} \cdot C}{K_m + C}; \quad \text{donde } V_{max} = \frac{V_{max}^*}{V_d} \quad \text{Ecuación III. 7}$$

La representación gráfica de la eliminación del fármaco en función de la concentración del fármaco según la ecuación de Michaelis Menten origina el perfil que se muestra en la figura III.4.

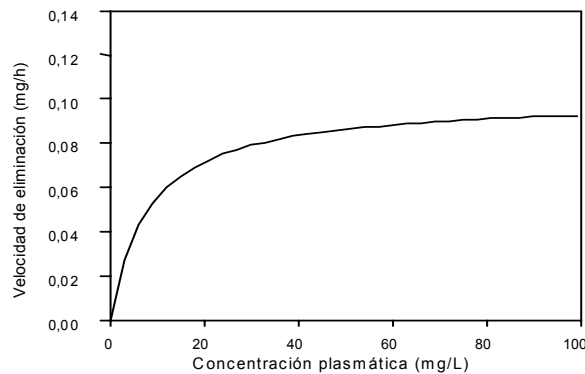


Figura III. 4 Representación gráfica de la velocidad de eliminación frente a la concentración plasmática de un fármaco que se elimina, exclusivamente por metabolismo hepático, de acuerdo con una cinética de Michaelis-Menten (Jiménez, 1997).

En la expresión anterior V_{max}^* representa la velocidad máxima de eliminación por metabolismo (cantidad/tiempo) y K_m es la constante de Michaelis-Menten, es decir, la concentración a la cual la velocidad de eliminación es la mitad de la velocidad máxima, C es la concentración del fármaco a cualquier tiempo, V_{max} es la velocidad máxima de eliminación expresada en unidades de concentración/tiempo y V_d es el volumen de distribución del fármaco en el organismo.

Es de gran utilidad clínica predecir el tiempo que tardará una concentración inicial dada (C_0) en reducirse a un determinado valor de interés (C). De este modo, se puede definir el tiempo 50% como el tiempo necesario para que la concentración plasmática se reduzca a la mitad ($t_{50\%}$). En los procesos de orden uno este tiempo coincide con la semivida biológica, la cual es constante e independiente de la dosis administrada. Sin embargo, en los procesos no lineales dicho tiempo depende de la concentración plasmática que se alcance, C_0 , según la expresión III.8.

$$t_{50\%} = \frac{\frac{C_0}{V_{\max}} + 0.693 \cdot K_m}{V_{\max}} \quad \text{Ecuación III. 8}$$

La figura III.5 representa la no linealidad del $t_{50\%}$, aclaramiento plasmático (Cl_p) y AUC en función de la dosis administrada o la concentración plasmática.

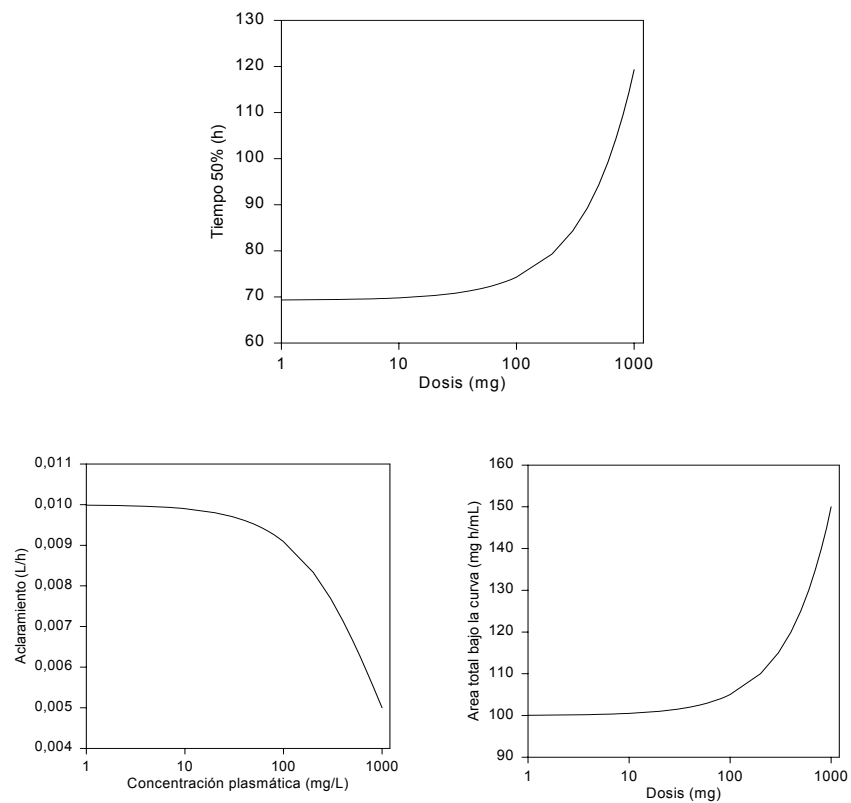


Figura III. 5 Representaciones gráficas que ilustran la no linealidad del $t_{50\%}$, Cl_p y AUC en función de la dosis administrada o la concentración plasmática (Jiménez, 1997).

Del mismo modo que ocurre con el $t_{50\%}$, el aclaramiento es dosis-dependiente y según su definición, cociente entre la velocidad de eliminación y la concentración plasmática en el mismo momento, la expresión del aclaramiento es la siguiente:

$$Cl_p = \frac{V_m}{K_m + C} \cdot V_d \quad \text{Ecuación III. 9}$$

Como muestra la ecuación III.9. el aclaramiento disminuye cuando aumenta la concentración plasmática. No obstante, es habitual el hecho de considerar como representativo del proceso el aclaramiento medio correspondiente a la administración de una dosis única, que obliga a considerar la concentración media de fármaco, de acuerdo con la ecuación III.10:

$$\overline{Cl_p} = \frac{V_{max}}{K_m + C} \quad \text{Ecuación III. 10}$$

A diferencia de los procesos lineales, el área bajo la curva de concentración plasmática aumenta de forma desproporcionada al incrementar la dosis (figura III.5), tal y como se desprende de la función parabólica que representa la ecuación III.11:

$$AUC_0^\infty = \frac{D}{V_d \cdot V_{max}} \cdot \left(\frac{D}{2 \cdot V_d} + K_m \right) \quad \text{Ecuación III. 11}$$

III.3.1.3. Modelos Autoinducción Enzimática

La variación interindividual de P450 causa diferencias en el metabolismo de los fármacos en general. De esta manera, algunos individuos responden mejor al tratamiento, dependiendo de si se produce una mayor o menor cantidad de enzimas P450 específicas en sus organismos y de si el sustrato que se metaboliza es activo por sí mismo o si por el contrario, se activa a través de la reacción catalizada por la enzima P450. Según el consenso general, las dos principales causas que provocan la variación interindividual del metabolismo de los fármacos son: los polimorfismos genéticos y la inducción o inhibición enzimática debida al suministro concomitante de otros fármacos, factores ambientales o al mismo sustrato (Bruno, 2007; Mcfadyen, 2004).

Los niveles y la actividad de ciertas subfamilias P450 varían de un individuo a otro, siendo la inducción o inhibición de estas enzimas uno de los factores fundamentales. En efecto, se ha demostrado que ciertas subfamilias pueden ser inducidas o inhibidas

después de la exposición de los individuos a fármacos, que se suministran concomitantemente, compuestos endógenos, compuestos exógenos o por autoinducción de fármacos. Así, la inducción o inhibición de enzimas P450 tiene un impacto positivo o negativo en la farmacoterapia, dependiendo de las características de los metabolitos obtenidos en la biotransformación de fármacos.

Se han estudiado los efectos de la inhibición enzimática de la citocromo CYP3A4 ocasionada por la naringinina (compuesto encontrado en el zumo de frutas cítricas) y su forma aglicona.

El efecto contrario se observa con los inductores de las enzimas CYP3A4 y CYP2C8 la dexametasona, el fenobarbital y la rifampicina (Bruno, 2007) (Figura III.6). El efecto inductor sobre CYP3A4 es negativo para fármacos antitumorales como el paclitaxel, docetaxel, vincristina y videstina, porque produce un incremento en metabolitos con pocas propiedades antitumorales, causando la eliminación más rápida del fármaco. Por otro lado, la inducción de CYP3A4 produce un efecto positivo sobre la actividad de pro-fármacos como la ifosfamida y ciclofosfamida porque se produce mayor cantidad de metabolitos con propiedades antitumorales.

Algunos estudios indican que los taxanos tales como el paclitaxel, incrementan considerablemente los niveles de CYP3A4 (Figura III.6) al activar los genes que codifican para esta enzima. El efecto resultante en este caso es la inducción de la propia degradación del paclitaxel, disminuyendo así su efectividad terapéutica (Nallani, 2004; Synold, 2001). CYP3A4, la más abundante de las enzimas P450 en hígado humano, esta relacionada con el metabolismo de cerca del 60% de los fármacos actualmente conocidos y es muy proclive a ser inhibida por una variedad de fármacos, tales como: claritromicina, eritromicina, isoniazida, tamoxifeno, irinotecano, ritonavir, delavirdina, verapamilo, diltiazem, gestodeno y raloxifena (Thummel, 1998; Zhou, 2005) (Figura III.6).

El efecto producido por la inhibición de la actividad enzimática de las enzimas P450 sobre el metabolismo de agentes antineoplásicos en general tiene consecuencias negativas ya que puede generar un incremento riesgos o de la toxicidad de los agentes antineoplásicos, en especial cuando algunas isoenzimas P450 producen metabolitos capaces de unirse covalentemente a enzimas P450,

inhibiéndolas. Esta inhibición también puede conducir a una disminución o interrupción de la producción de metabolitos con propiedades citotóxicas, en el caso de los pro-fármacos.

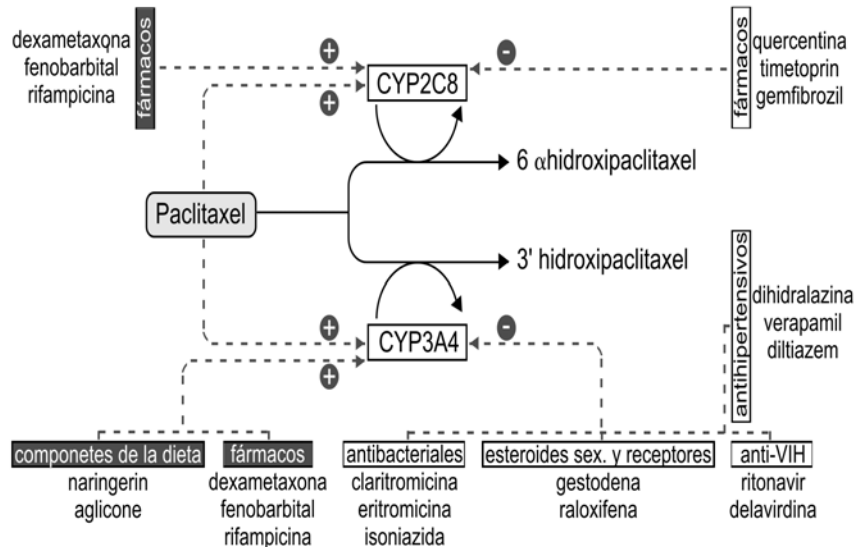


Figura III. 6 Biotransformación del paclitaxel, agentes inductores (+) e inhibidores (-) de las enzimas CYP2C8 y CYP3A4.

En la bibliografía podemos encontrar diferentes modelos que intentan explicar estos fenómenos de autoinducción. Aspectos a tener en cuenta en los modelos de autoinducción enzimática:

- 1) La parte del modelo "turnover" que debería ser afectada por el agente inductor. La tradicional revisión del mecanismo de inducción enzimática es a través de la síntesis de novo (Levy, 1979; Okey, 1990; Chien, 1997); por ello la mayoría de modelos de inducción son descritos como la estimulación de producción de enzima (Boddy, 1995; Hassan, 1999; Magnusson, 2008).

En la figura III.7 se representa el modelo de autoinducción descrito por Hassan para la ciclofosfamida. Las ecuaciones diferenciales III.12 a la III.14 describen el modelo descrito (Hassan, 1999).

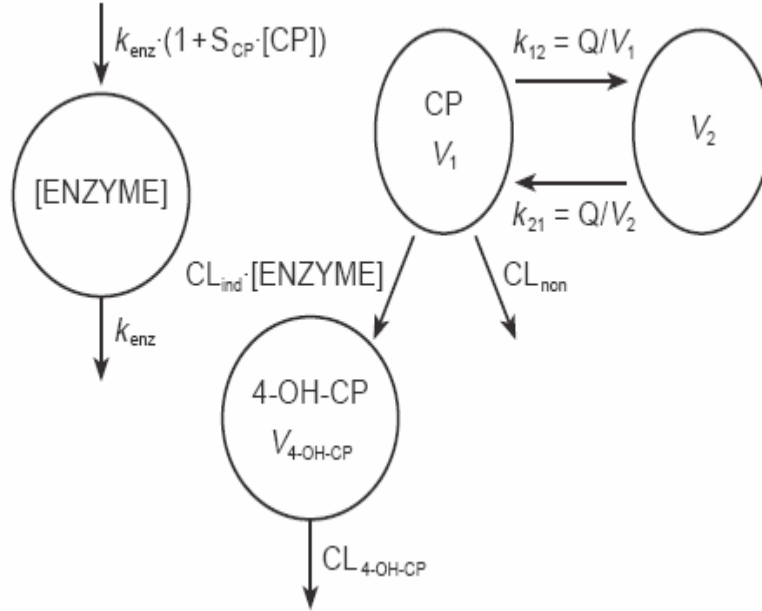


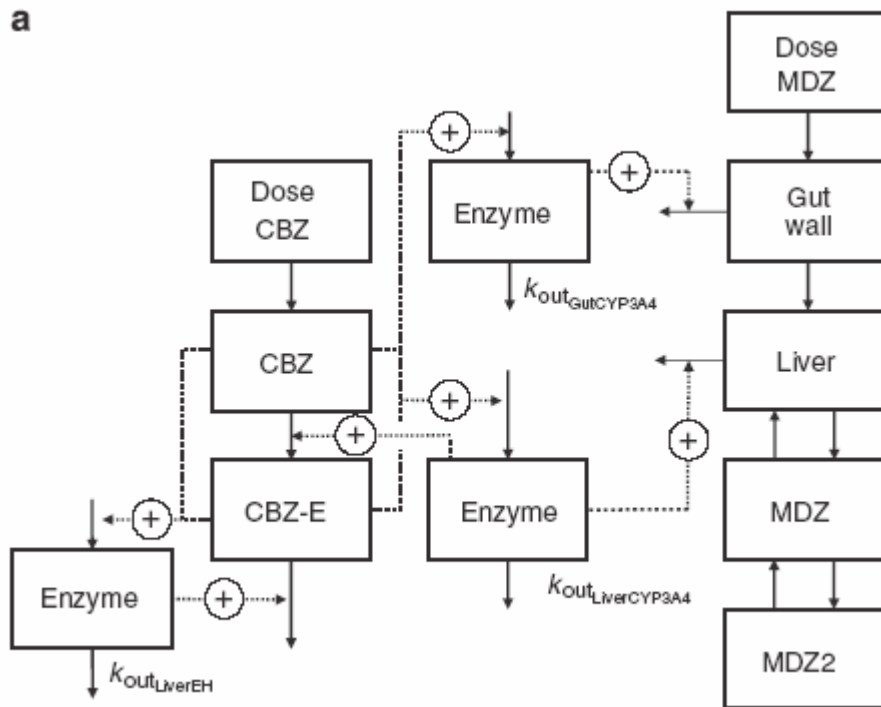
Figura III. 7. Esquema de presentación del modelo de dos compartimentos para la ciclofosfamida (CP) y dos vías de eliminación un aclaramiento inducible (Cl_{ind}) y un aclaramiento no inducible (Cl_{non}), un compartimento para la 4 hidroxiciclofosfamida (4-OH-CP) lincado con la vía inducible y un aclaramiento ($Cl_{4-OH-CP}$) y un compartimento para el enzima con una cantidad de enzima [ENZYME]. La concentración de ciclofosfamida estimula la velocidad de producción del enzima de manera lineal ($1+S_{CP} \cdot CP$) y la cantidad de enzima afecta al aclaramiento inducible de ciclofosfamida ($Cl_{ind} \cdot [ENZYME]$).

$$\frac{dC_p}{dt} = K_0 - \frac{Q}{V_1} + \frac{Q}{V_2} - Cl_{in} \cdot CP[ENZYME] - Cl_{non} \cdot CP \quad \text{Ecuación III. 12}$$

$$\frac{d[ENZYME]}{dt} = K_{enz} \cdot (1 + S_{CP} \cdot CP) - K_{enz} \quad \text{Ecuación III. 13}$$

$$\frac{d4OHCP}{dt} = Cl_{ind} \cdot CP \cdot [ENZYME] - Cl_{4-OH-CP} \cdot 4OHCP \quad \text{Ecuación III. 14}$$

En la figura III.8 se representa el modelo de autoinducción descrito por Magnusson para la carbamacepina. Las ecuaciones diferenciales III.15 a la III.18 describen el modelo descrito (Magnusson, 2008).



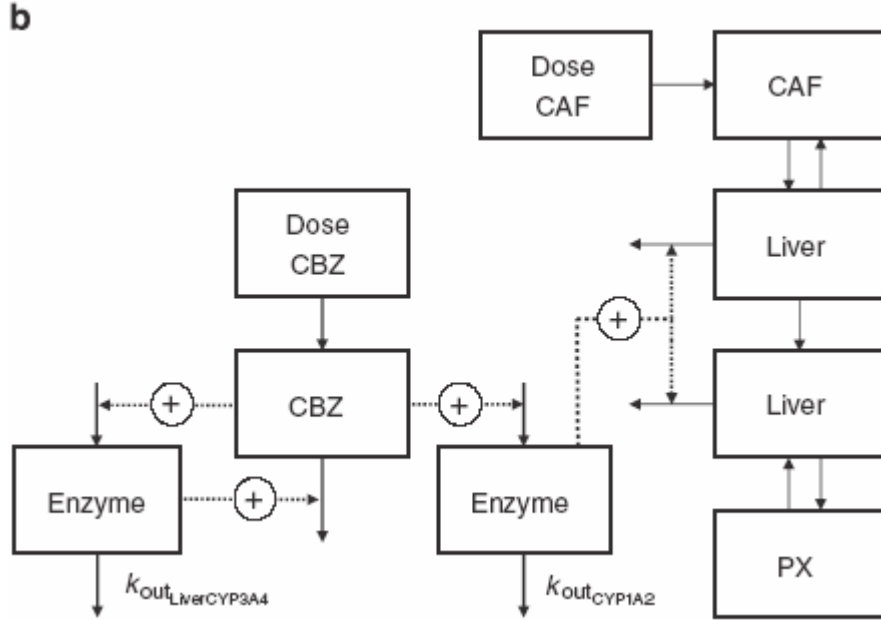


Figura III. 8. La estructura de los submodelos a) de la carbamazepina y midazolam y b) cafeína. La línea continua representa los flujos entre los compartimentos. La línea discontinua representa donde la cantidad de enzima afecta a las velocidades de cada compartimento: Carbamazepina (CBZ), carbamacepina-10,11-epoxide (CBZ-E), Midazolam (MDZ), Cafeína (CAF) y paraxantina (PX). K_{out} es la constante de velocidad "turnover" asociada con los diferentes procesos de inducción.

$$induction = IND_{MAX} \cdot CBZ_{1/0} \quad \text{Ecuación III. 15}$$

$$induction = IND_{Slope} \cdot A_{CBZ} \quad \text{Ecuación III. 16}$$

$$induction = \frac{IND_{MAX} \cdot A_{CBZ}}{K_{m,induction} + A_{CBZ}} \quad \text{Ecuación III. 17}$$

$$\frac{dA_{Enzyme}}{dt} = R_{in}(1 + induction) - K_{out} \cdot A_{Enzyme} \quad \text{Ecuación III. 18}$$

Las funciones evaluadas: modelo de paso (Ecuación III.15), modelo lineal (Ecuación III.16) y modelo no lineal (Ecuación III.17). IND_{MAX} es la máxima inducción, $CBZ_{1/0}$ es 1 o 0, dependiendo de la presencia del inductor, A_{CBZ} es la cantidad de los inductores, IND_{Slope} esta relacionado A_{CBZ} para la magnitud de la inducción y $K_{m,induction}$ es la cantidad de inductores correspondientes a la

mitad de la máxima inducción. El curso del tiempo de inducción es descrito por un modelo "turnover" (Ecuación III.18), donde R_{in} es la velocidad de producción de orden 0, K_{out} es la constante "turnover" de velocidad de de primer orden, A_{enzyme} es la cantidad de enzima.

Sin embargo, un incremento de concentración de enzima puede también ser el resultado de un disminución en la eliminación de enzima a través de la estabilización de proteínas, que fue el caso de la ifosfamida del modelo de Kerbusch (Kerbusch, 2000).

En la figura III.9 se representa el modelo de autoinducción descrito por Kerbusch para la ifosfamida. Las ecuaciones diferenciales III.19 a la 21 describen el modelo descrito (Kerbusch, 2000).

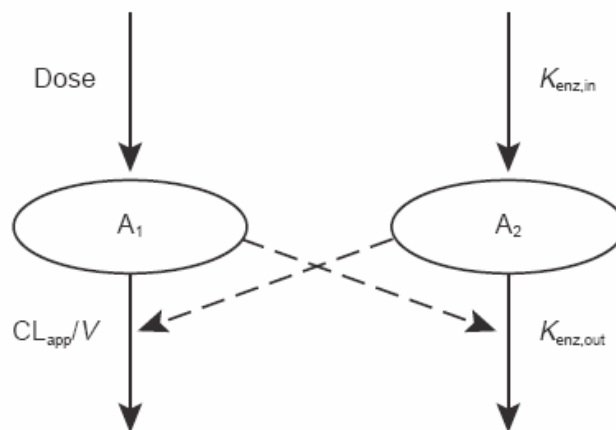


Figura III. 9. Modelo farmacocinético de la ifosfamida con autoinducción. A1 es la cantidad de ifosfamida en el compartimento 1 descrito como la entrada de la dosis y salida del un aclaramiento aparente (CL_{app}) dividido por el volumen de distribución (V). A2 es la cantidad de enzima relativa en el compartimento 2 hipotético donde se determina la constante de velocidad de formación ($K_{enz,in}$) y la constante de velocidad de degradación ($K_{enz,out}$). La línea discontinua representa el efecto de enzima (A_2) sobre la velocidad de eliminación de ifosfamida (CL_{app}/V) y el efecto del ifosfamida sobre la degradación del enzima ($K_{enz,out}$).

$$\frac{dA_1}{dt} = R - (Cl_{app} \cdot C_p) \quad \text{Ecuación III. 19}$$

$$Cl_{app} = Cl \cdot A_2 \quad \text{Ecuación III. 20}$$

$$\frac{dA_2}{dt} = K_{enz,in} - K_{enz,out} \cdot A_2 \cdot \left(1 - \frac{Cp}{Cp + IC50}\right) \quad \text{Ecuación III. 21}$$

Al no conocer la cantidad real de enzima en su compartimento se considera valor 1 (fracción del valor basal igual a 100%); consecuentemente, la constante de formación ($K_{enz,in}$) se iguala al producto constante de eliminación enzimática ($K_{enz,out}$) por la cantidad de enzima (Enz basal). (Ecuación III.22. a III.24.).

$$\frac{dA_2}{dt} = K_{enz,in} - K_{enz,out} \cdot A_2 \quad \text{Ecuación III. 22}$$

$$K_{enz,in} = K_{enz,out} \cdot A_{2,basal} \quad \text{Ecuación III. 23}$$

Al considerar el valor basal de $A_2=1$ resulta que $K_{enz,in}=K_{enz,out}$.

$$\frac{dA_2}{dt} = K_{enz,out} - K_{enz,out} \cdot A_2 \cdot \left(1 - \frac{Cp}{Cp + IC50}\right) \quad \text{Ecuación III. 24}$$

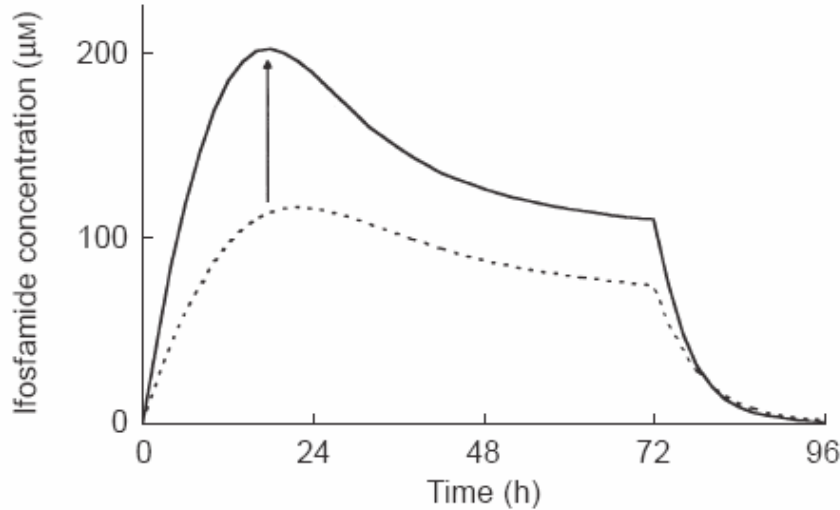


Figura III. 10. Perfiles farmacocinéticos de ifosfamida simulados después de administración en infusión i.v. continua de 72 h de 10 g (línea punteada) y 20 g (línea) de ifosfamida en paciente basada en los parámetros poblacionales encontrados

- 2) La forma de la relación entre el agente inductor y la magnitud de la inducción. La magnitud de la inducción del enzima depende de la concentración de componente inductor, según la relación lineal, como el modelo de autoinducción de la ciclofosfamida (Hassan, 1999), una relación no lineal como la ifosfamida (Kerbush, 2000) y la ciclofosfamida (Huitema, 2001; E. de Jonge, 2005a). Hay también ejemplos de modelos donde la inducción completa existe en presencia del inductor y no hay inducción en su ausencia, como la autoinducción de la fenitoína (Frame, 1998).

En la figura III.11 se representa el modelo de autoinducción descrito por Huitema para la ciclofosfamida. Las ecuaciones diferenciales que describen el modelo se encuentra en la figura III.12 (Huitema, 2001).

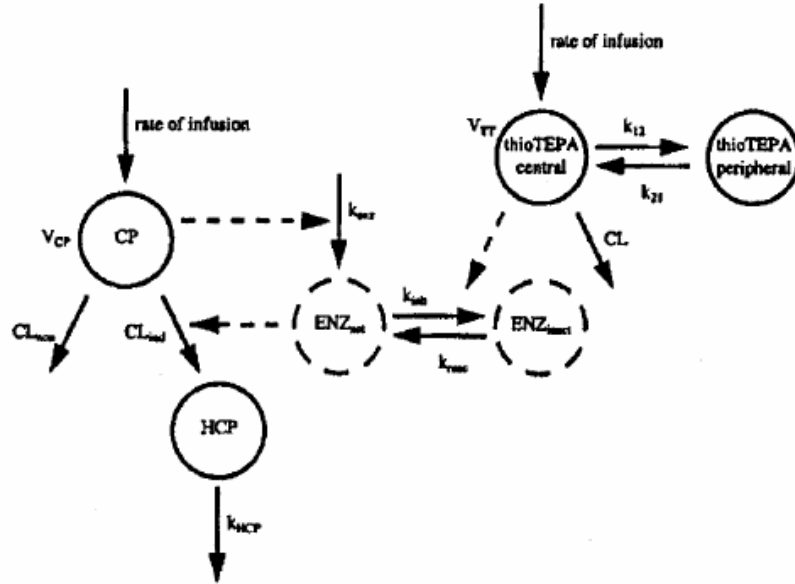


Figura III. 11. Representación gráfica del modelo final de CP y HCP. Aclaramiento de CP con dos vías, vía no inducible (CL_{non}) y una vía inducible (CL_{ind}) que principalmente forma HCP. CL_{ind} es mediado por la cantidad de enzima activo del compartimiento hipotético que es incrementado por CP (k_{enz}) causando autoinducción y reversiblemente inhibida por la tiotepa (k_{in} y k_{act} , respectivamente).

Compartment	Differential equation describing compartment
CP	$\frac{dA(CP)}{dt} = R - \frac{CL_{non}}{V_{CP}} \times A(CP) - \frac{CL_{ind}}{V_{CP}} \times A(ENZ) \times A(CP) \text{ for } t \leq T_{inf}$ $\frac{dA(CP)}{dt} = -\frac{CL_{non}}{V_{CP}} \times A(CP) - \frac{CL_{ind}}{V_{CP}} \times A(ENZ) \times A(CP) \text{ for } t > T_{inf}$
HCP	$\frac{dA(HCP)}{dt} = \frac{CL_{ind}}{V_{CP}} \times A(ENZ) \times A(CP) - k_{HCP} \times A(HCP)$
Active enzyme pool (ENZ_{act})	$\frac{dA(ENZ_{act})}{dt} = k_{enz} \times \frac{[CP]}{IC_{50} + [CP]} - k_{ass} \times [TT] \times A(ENZ_{act}) + k_{diss} \times A(ENZ_{inact})$
Inactive enzyme pool (ENZ_{inact})	$\frac{dA(ENZ_{inact})}{dt} = k_{ass} \times [TT] \times A(ENZ_{act}) - k_{diss} \times A(ENZ_{inact})$

Figura III. 12. Ecuaciones diferenciales de transporte de masas de varios compartimentos para el modelo CP y HCP.

En la figura III.13 se representa el modelo de autoinducción descrito por E. de Jonge para la ciclofosfamida. Las ecuaciones diferenciales que describen el modelo se encuentra en la figura III.14 (E. de Jorge, 2005a).

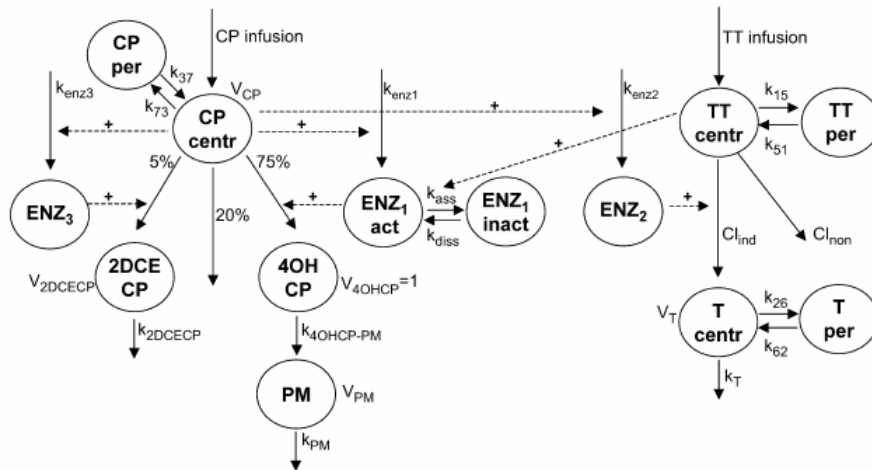


Figura III. 13. Representación del modelo farmacocinético de ciclofosfamida (CP) y sus metabolitos 4-hidroxiciclofosfamida (4OHCP), “-decloroetilciclofosfamida (2DCECP) y mostaza fosfamida (PM) y la interacción con tiotepa (TT) (centr, compartimento central; per, compartimento periférico; ENZ_{1act} y ENZ_{1inact} enzima activo e inactivo relacionados con el metabolismo de CP; ENZ_1 enzima relacionado con el metabolismo de TT; ENZ_3 enzima relacionado con el metabolismo 2DCECP).

Compartment	Differential Equation
1 TT central	$\frac{dA(1)}{dt} = R - \frac{CL_{TTind}}{V_{TT}} \times A(1) \times A(12) - \frac{CL_{TTnon}}{V_{TT}} \times A(1) - k_{15} \times A(1) + k_{51} \times A(5)$
2 T central	$\frac{dA(2)}{dt} = \frac{CL_{TTind}}{V_{TT}} \times A(1) \times A(12) - k_{26} \times A(2) + k_{62} \times A(6) - k_7 \times A(2)$
3 CP central	$\frac{dA(3)}{dt} = R - 0.75 \times \frac{CL_{CP}}{V_{CP}} \times A(3) \times A(10) - 0.20 \times \frac{CL_{CP}}{V_{CP}} \times A(3) - 0.05 \times \frac{CL_{CP}}{V_{CP}} \times A(3) \times A(13) - k_{37} \times A(3) + k_{73} \times A(7)$
4 4OHCP central	$\frac{dA(4)}{dt} = 0.75 \times \frac{CL_{CP}}{V_{CP}} \times A(3) \times A(10) - k_{4OHCP-PM} \times A(4)$
5 TT peripheral	$\frac{dA(5)}{dt} = k_{15} \times A(1) - k_{51} \times A(5)$
6 T peripheral	$\frac{dA(6)}{dt} = k_{26} \times A(2) - k_{62} \times A(6)$
7 CP peripheral	$\frac{dA(7)}{dt} = k_{37} \times A(3) - k_{73} \times A(7)$
8 2DCECP	$\frac{dA(8)}{dt} = 0.05 \times \frac{CL_{CP}}{V_{CP}} \times A(3) \times A(13) - k_{2DCECP} \times A(8)$
9 PM	$\frac{dA(9)}{dt} = k_{4OHCP-PM} \times A(4) - k_{PM} \times A(9)$
10 ENZ _{1act} *	$\frac{dA(10)}{dt} = k_{enz1} \times \frac{[CP]}{0.01^2 + [CP]} - k_{ass} \times A(1) \times A(10) + k_{dis} \times A(11)$
11 ENZ _{1inact}	$\frac{dA(11)}{dt} = k_{ass} \times A(1) \times A(10) - k_{dis} \times A(11)$
12 ENZ ₂ *	$\frac{dA(12)}{dt} = k_{enz2} - k_{enz2} \times \left(1 - \frac{E_{max} \times [CP]}{0.01^2 + [CP]}\right) \times A(12)$
13 ENZ ₃	$\frac{dA(13)}{dt} = k_{enz3} \times \frac{[CP]}{0.01^2 + [CP]}$

TT = thiotepa, T = tepa, CP = cyclophosphamide, 4OHCP = 4-hydroxycyclophosphamide, 2DCECP = 2-dechloroethyl cyclophosphamide, PM = phosphoramide mustard, R = rate of infusion

*Concentrations of 0.01 μmol/L were very low compared to plasma concentrations of CP recorded. Therefore these processes were modeled as 'on-off' phenomena.

*Initial value of these hypothetical enzyme compartments is 1.

Figura III. 14. Ecuaciones diferenciales de transporte de masas de varios compartimentos para el modelo TT, CP, 4OHCP, PM y 2DCECP.

- 3) Como manejar la presencia de un tiempo de latencia. La presencia de un tiempo de latencia para la iniciación de la inducción ha sido observada en varios estudios. Un mecanismo sugerido de tiempo de latencia es la cadena de eventos requeridos para la síntesis de proteínas. Por tanto, un modelo de transducción puede ser un apropiado modelo, esto fue hecho en modelo de autoinducción de artemisinín por Gordi y Elsherbiny (Gordi, 2005; Elsherbiny, 2008). Sin embargo, los modelos más empíricos, donde la autoinducción no ocurre hasta un tiempo de corte, ha sido usados por Boddy (Boddy, 1995) y Frame (Frame, 1998).

En la figura III.15 se representa el modelo de autoinducción descrito por Gordi para el estudio de las propiedades inductivas de antimalárico artemisinín usando mefenotina como prueba para la actividad enzimática de CYP2B6 y CYP2C19 (Gordi, 2005).

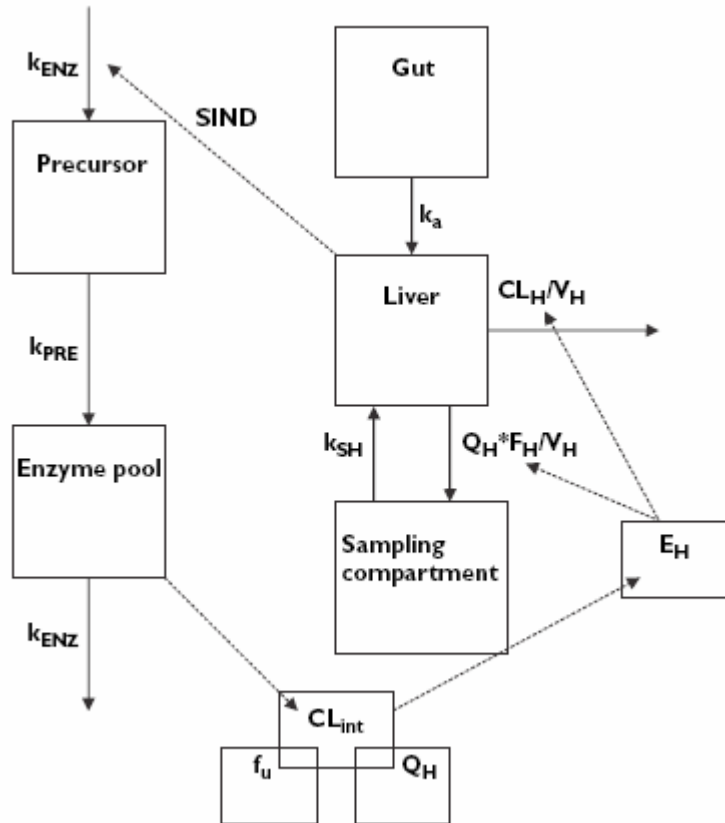


Figura III. 15. El diagrama representa el modelo de inducción aplicado a la concentración de artemisinín en saliva.

En la figura III.16 se representa el modelo de autoinducción descrito por Elsherbiny para el estudio de las propiedades inductivas de antimalárico artemisinín usando mefentoína como prueba para la actividad enzimática de CYP2B6 y CYP2C19 (Elsherbiny, 2008).

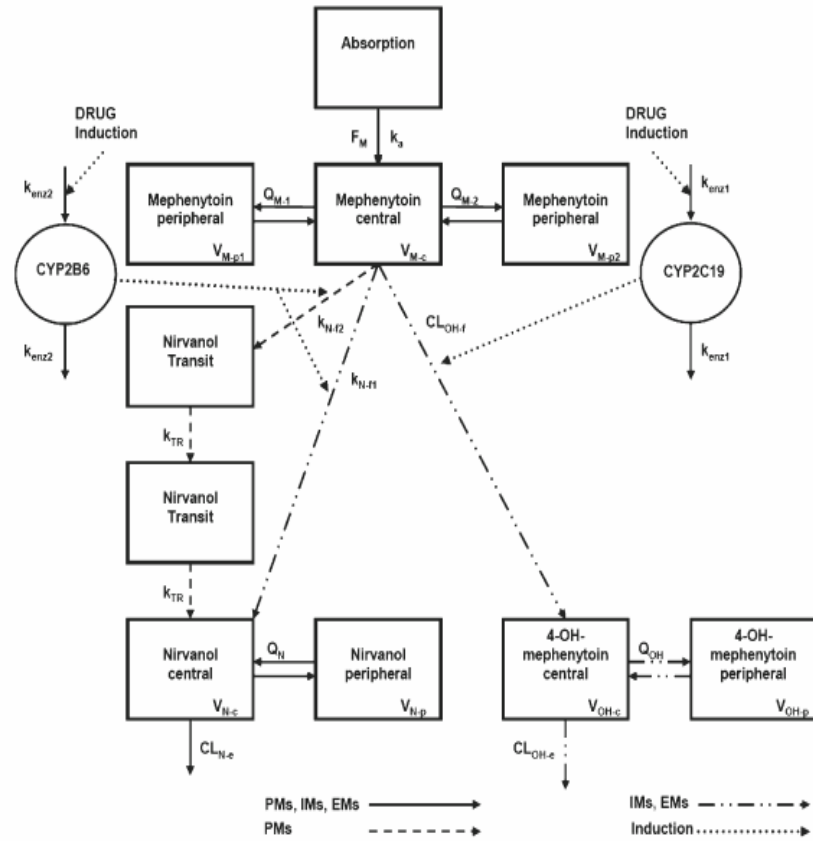


Figura III. 16. Integración del modelo farmacocinético enzima “turn-over” de S-mefentoína y sus metabolitos S-nirvanol y S-4-hidroximefenoína. Los diferentes fenotipos (EM, IM y PM) del CYP2C19 inducen la formación S-nirvanol y S-4-hidroximefenoína. F_M es la biodisponibilidad de S-mefentoína. k_a es la constante de absorción de S-mefentoína. CL_{OH-f} y CL_{OH-e} son los aclaramientos de formación y eliminación S-4-hidroximefenoína, respectivamente. k_{N-f1} y k_{N-f2} son la constante de formación y eliminación del S-nirvanol en los EMs/IMs y PMS del CYP2C19. CL_{N-e} es el aclaramiento de eliminación de S-nirvanol. V_{M-c} , V_{OH-c} y V_{N-c} son los volúmenes de los compartimentos centrales de S-mefentoína, S-4-hidroximefenoína y S-nirvanol, respectivamente. V_{M-p1}/V_{M-p2} , V_{OH-p} y V_{N-p} son los volúmenes periféricos de S-mefentoína, S-4-hidroximefenoína y S-nirvanol, respectivamente. Q_{M-1}/Q_{M-2} , Q_{OH} y Q_N son los aclaramientos intercompartimentales de S-mefentoína, S-4-hidroximefenoína y S-nirvanol, respectivamente. $k_{enz}(n)$ es la constante de velocidad de producción y degradación de los enzimas.

- 4) Que datos usar para la medida de la inducción enzimática. Hay diversas fuentes de datos para desarrollar los modelos de inducción. La mayoría de datos comunes a las concentraciones plasmáticas del fármaco afectado por la inducción. Cualquier fármaco afectado puede ser el mismo el causante de la inducción ej. Autoinducción o afectados por otros inductores como el modelo de fenobarbital-nortritilina (von Bahr, 1998), donde el cambio en la velocidad de eliminación de nortritilina sobre el tiempo fue usada como medida de inducción enzimática. Algunas veces los datos de los metabolitos pueden ser usados para describir la inducción enzimática, como el modelo presentado por Hassan (Hassan, 1999), donde los datos de metabolitos del paso de inducción metabólica están disponibles. Fuentes alternativas de datos pueden ser generadas a partir de estudios *in vitro*, donde la concentración es medida utilizando tiempo real PCR o incubación con marcadores funcionales. La investigación realizada por Bomhard (Bomhard, 1998), donde las actividades de varios enzimas del citocromo P450 fue medida siguiendo el tratamiento del diclobenceno. El estudio realizado por Magnusson en incubados de microsomas de rata que habían varias administraciones de fenitoína. En la figura III.18 se representa el modelo de autoinducción descrito por Magnusson para el fenobarbital en ratas (Magnusson, 2006).

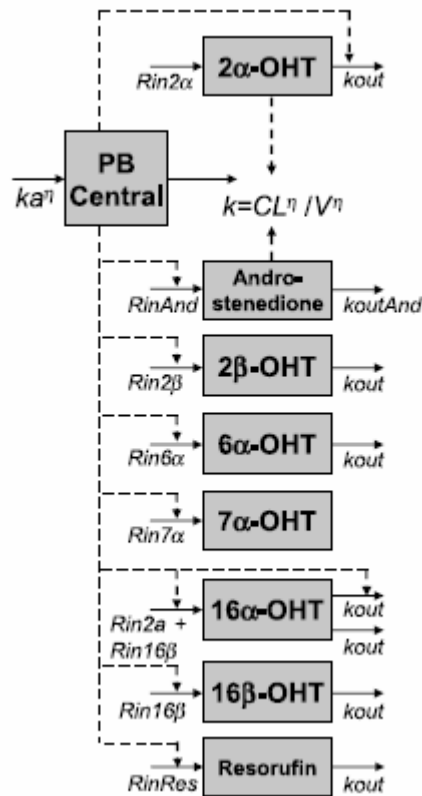


Figura III. 17. El diagrama describe un compartimento para la fenitoína (PB) y 8 compartimentos de actividad enzimática. La PB reduce la formación 2α y 16 αOHT. Induce la formación de resorufin y 2β, 6α y 16β-OHT.

III.4. Análisis Cinético y Dinámico Individual

Tras la administración de un fármaco a un paciente, la determinación de sus parámetros cinéticos y dinámicos es la etapa crucial para desarrollar con garantía de éxito la individualización posológica. Este hecho exige la obtención y el análisis de las concentraciones del fármaco y la medida de sus efectos farmacológicos. En condiciones de máxima eficiencia, se exige establecer una estrategia de toma de muestras (o diseño experimental) que garantice la estimación óptima de los parámetros cinéticos y dinámicos (D'Argenio, 1981).

III.4.1. Datos experimentales y datos observacionales

En los últimos años se han propuesto una amplia variedad de métodos para caracterizar el comportamiento farmacocinético o farmacodinámico en una determinada población. Estos métodos han permitido cuantificar el comportamiento poblacional, no solo mediante la utilización de datos experimentales procedentes de estudios controlados, sino también con datos observacionales procedentes de la monitorización clínica asistencial. La disponibilidad de datos experimentales u observacionales va a condicionar el método de estimación a utilizar en la caracterización del comportamiento cinético y dinámico en una población (tabla III.11.)

Tabla III. 11. Ventajas e inconvenientes de los datos experimentales y observacionales.

Datos	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Experimentales	<ul style="list-style-type: none"> -Gran número de datos -Diseño experimental óptimo -Tiempos de dosificación y extracción controlados -Posibilidad de aplicación de métodos de estudio estándar 	<ul style="list-style-type: none"> -Número limitado de individuos -Individuos no tributarios de tratamiento farmacológico -Alto coste
Observacionales	<ul style="list-style-type: none"> -Individuos representativos de la población a tratar -Gran número de individuos -Bajo coste 	<ul style="list-style-type: none"> -Número limitado de datos por paciente -Posibles errores en tiempos de dosificación y extracción de muestras -Diseño de dosificación y extracción de muestras pobre -Posible sesgo de variables concomitantes desconocidas -Necesidad de programas complejos

La utilización de datos observacionales, procedentes de la monitorización clínica rutinaria, inicialmente requiere no despreciar la información aportada por cualquier

paciente perteneciente a la población de estudio.

En este contexto, se debe recordar que cuando el número de pacientes tratados rutinariamente con el fármaco a estudio es elevado, se puede suplir la escasez de observaciones por individuo, a través del análisis de los datos con las técnicas poblacionales adecuadas (Rodríguez, 1996a). En cualquier caso, Grasela y cols (Grasela, 1986), proporcionan unas directrices básicas a tener en consideración a la hora de diseñar un estudio de farmacocinética poblacional a partir de datos observacionales (tabla III.12).

Tabla III. 12 Directrices básicas para el diseño de estudios de farmacocinética poblacional

-
- La obtención de las muestras de concentración del fármaco debe realizarse a tiempos aleatorios y sin seguir un protocolo experimental rígido.
 - Es necesario, al menos entre 2 y 4 muestras por paciente; aunque una sola muestra por paciente es capaz de proporcionar información adicional cuando se combina con más datos.
 - La muestra debe estar formada por un mínimo de 50 a 100 sujetos representativos de la población subsidiaria del tratamiento con fines terapéuticos.
 - Los pacientes pueden recibir diversos medicamentos de forma concomitante, así como una dieta variada para obtener información de posibles interacciones.
-

III.5. Análisis Cinético y Dinámico Poblacional

La experiencia acumulada con los estudios individuales evidencia la gran variabilidad existente en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos a la cual se había prestado escasa atención hasta hace poco más de 15 años. Por ello el análisis farmacocinético y farmacodinámico en amplios grupos de población implica el cambio de referencia del individuo a la población y exige un cambio en la metodología utilizada en su estudio.

En efecto, la incorporación de la metodología bayesiana a la farmacocinética clínica para el control adaptado de la respuesta farmacocinética y la necesidad cada

vez mayor de la individualización posológica de fármacos con estrecho ámbito terapéutico, en distintos grupos de población, justificó la necesidad de conocer no sólo la tendencia central de la respuesta farmacocinética en los individuos de la población, sino también la variabilidad intraindividual e interindividual (Sheiner, 1979a; Whiting, 1986; Colburn, 1988; Rodríguez, 1996b).

Además, esta metodología ha alcanzado un amplio desarrollo en subgrupos de población (Collart, 1992; Grasela, 1985).

En este contexto, el análisis farmacocinético y/o farmacodinámico en grupos de poblaciones tiene como objetivo determinar la tendencia central del comportamiento cinético y dinámico de los medicamentos y cuantificar su variabilidad, ínter e intraindividual, en función de una serie de parámetros de efecto fijo y otros de efecto aleatorio, que permitan alcanzar la individualización posológica con un mayor conocimiento de los factores que explican la variabilidad en la respuesta. En su sentido más amplio, la farmacocinética o farmacodinamia poblacional puede definirse como el estudio de la variabilidad de las concentraciones plasmáticas o el efecto farmacológico entre los distintos individuos que reciben pautas posológicas normalizadas (Aarons, 1991a; Mandema, 1995). Por ello, el desarrollo del análisis farmacocinético y farmacodinámico en grupos de pacientes tiene una serie de objetivos que a modo de resumen se exponen en la tabla III.13.

Tabla III. 13 Objetivos de los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos (Bruno, 1998).

Determinar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico del fármaco en poblaciones de pacientes representativos de la patología a tratar.

Explicar la variabilidad interindividual e intraindividual mediante la identificación de los factores que las condicionan.

Caracterizar el comportamiento cinético y dinámico de los pacientes de forma individual mediante la estimación bayesiana.

Investigar el valor pronóstico de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos individuales en la respuesta clínica al tratamiento, en términos de eficacia y seguridad.

III.5.1. Modelo farmacoestadístico poblacional

Es obvio que una importante fuente de variabilidad, tanto en farmacocinética como en farmacodinamia, se debe a la existencia de diferencias interindividuales que se asume que pueden ser caracterizadas mediante un modelo estructural común a todos los individuos de una población; sin embargo, el valor del vector de los parámetros del modelo puede diferir entre los distintos individuos de la población. Este hecho se expresa matemáticamente mediante la ecuación III.25:

$$\phi_i = g(\theta, x_i) + \eta_i \quad \text{Ecuación III. 25}$$

donde g es una función matemática conocida que describe el valor de ϕ en función del vector de parámetros de tendencia central de la población θ (valor típico poblacional) y las covariables específicas del individuo x_i , como la edad, el peso o el estado fisiopatológico entre otras; el parámetro η_i representa la variación aleatoria del vector de parámetros individuales alrededor del valor típico poblacional y se asume que es independiente entre los distintos individuos. Esta medida de dispersión interindividual η_i permite cuantificar la variabilidad interindividual de los parámetros estudiados. Para una mayor simplicidad, se asume que las covariables específicas del individuo permanecen constantes en el tiempo; en cualquier caso, es posible incorporar al modelo covariables predictoras tiempo-dependiente.

Las relaciones cuantitativas establecidas entre las características específicas de los pacientes y los parámetros del modelo pueden ser categóricas, como la relación entre la presencia o no de insuficiencia hepática y el aclaramiento plasmático de un fármaco; o continuas, como la relación entre el valor del aclaramiento de creatinina y el aclaramiento renal de un fármaco. La incorporación de estas covariables predictoras dentro de los modelos farmacoestadísticos debe considerarse en términos de reducción de la variabilidad poblacional asociada a las observaciones.

La disminución de la variabilidad interindividual, asociada a un determinado parámetro poblacional cuando se incorporan modelos de regresión que incluyen covariables predictoras, es uno de los criterios utilizados para valorar la posible

inclusión o exclusión de estas covariables en el modelo farmacoestadístico final, porque se traduce en una predicción individual de mayor exactitud y precisión (Wählby, 2001).

Para la descripción completa del modelo farmacoestadístico poblacional es necesario caracterizar la función de distribución de probabilidad de η_i . Las distintas asunciones realizadas sobre la función de distribución de probabilidad, de los efectos aleatorios interindividuales, es una de las diferencias básicas entre los distintos métodos de estimación de parámetros poblacionales que se discutirá más adelante. Si se considera que η_i es el vector de los efectos aleatorios interindividuales de dimensión p que presenta una función de distribución de probabilidad F , la verosimilitud de las observaciones y_i del individuo i -ésimo de la población puede expresarse de la siguiente forma:

$$L_i(\Psi, F) = \int l_i(y_i / \Psi, \eta) \cdot F(\eta) \cdot d\eta \quad \text{Ecuación III. 26}$$

donde Ψ comprende los parámetros (θ, ξ, σ^2) que son comunes a todos los individuos de la población y $l_i(y_i / \Psi, \eta)$ es la verosimilitud de las observaciones del individuo i -ésimo conocido Ψ y η , que puede ser calculada mediante la ecuación III.27:

$$l_i(y_i / \phi_i, \xi, \sigma^2) = (2\pi)^{-\frac{M}{2}} \cdot \det(C_i)^{-\frac{1}{2}} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2}(y_i - E_i)^T C_i^{-1}(y_i - E_i)\right)$$

Ecuación III. 27

Esta ecuación es similar a la ecuación utilizada para el cálculo de la verosimilitud de las observaciones de un individuo aislado, pero en este caso $\phi_i = g(\theta, x_i) + \eta_i$. Para N individuos la verosimilitud de todos los datos se expresa de la siguiente forma:

$$L(\Psi, F) = \prod_{i=1}^N L_i(\Psi, F) \quad \text{Ecuación III. 28}$$

Las estimaciones máximo verosímiles de los parámetros poblacionales Ψ y F pueden obtenerse mediante la maximización de $L(\Psi, F)$. Ahora bien, resulta de gran dificultad resolver exactamente la integral de la ecuación ya que la mayoría de los

modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos presentan una dependencia no lineal entre las observaciones y los efectos aleatorios. Como consecuencia no es posible calcular la distribución de los y_i , ni incluso sus dos primeros momentos de esta distribución.

Las aproximaciones realizadas para simplificar los cálculos justifican la existencia de los distintos métodos de estimación de parámetros poblacionales que se describen más adelante (Mandema, 1995). En definitiva, para caracterizar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico en una determinada población son esenciales los elementos que se presentan en la tabla III.14.

Tabla III. 14 Elementos esenciales para definir un modelo farmacoestadístico.

-
- Modelo estructural farmacocinético y/o farmacodinámico que describa la respuesta observada (p.ej. evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de un fármaco) en un determinado individuo.
 - Modelo de regresión que describa la relación cuantitativa entre las características individuales del paciente y sus parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (V_d , Cl , EC_{50} , E_{max} , K_{e0} , etc).
 - Modelo de varianza interindividual que describa la variabilidad inexplicable por el modelo de regresión de los parámetros del modelo estructural.
 - Modelo de varianza residual que describa la variabilidad de las observaciones inexplicable por diferencias interindividuales.
-

Estos elementos caracterizan el modelo farmacoestadístico poblacional en el cual se pueden distinguir tres tipos de parámetros: parámetros de efecto fijo y parámetros de efecto aleatorio interindividual e intraindividual (Sheiner, 1991).

Parámetros de efecto fijo. Cuantifican el comportamiento cinético y/o dinámico medio del fármaco en la población así como, las relaciones existentes entre los parámetros del modelo estructural y las características individuales de los pacientes (modelos de regresión). Estos parámetros son, por ejemplo, los valores medios de los volúmenes de distribución en una población específica o los valores de los coeficientes de regresión de la relación establecida entre el aclaramiento del fármaco y el aclaramiento de creatinina.

Estos parámetros se convierten en una herramienta útil para la toma de decisiones clínicas y de investigación, ya que permiten desarrollar una recomendación “a priori” de la dosificación para una población específica de pacientes.

Parámetros de efecto aleatorio interindividual. Cuantifican la magnitud típica de la variabilidad cinética y/o dinámica entre los individuos de una población; es decir, describen la distribución de los valores de los parámetros individuales con respecto al valor típico poblacional.

La magnitud de la variabilidad en un parámetro farmacocinético y/o farmacodinámico puede ser un indicador útil para la seguridad del fármaco. De hecho, una aproximación para definir el índice terapéutico de un medicamento administrado de forma crónica puede ser la relación entre el ámbito de concentraciones plasmáticas en estado estacionario y el valor de la variabilidad interindividual del aclaramiento. A partir de esta definición, se pueden identificar situaciones en las que sea necesario la monitorización y ajuste de dosis de los pacientes. Así, en dos poblaciones con los mismos valores medios de parámetros farmacocinéticos, pero con diferentes grados de variabilidad interindividual, al administrar una misma dosis estándar se obtendrán efectos farmacológicos con mayor variabilidad en la población de mayor valor en la variabilidad de sus parámetros cinéticos. Por esta razón, los parámetros de efecto aleatorio interindividual permiten evaluar la incertidumbre, cinética o dinámica, asociada a una recomendación posológica realizada, tanto a priori como a posteriori, en un paciente que pertenece a la población para la cual se ha caracterizado su comportamiento cinético y/o dinámico. Desde el punto de vista del diseño experimental, estos parámetros son los principales determinantes del tamaño de la muestra de pacientes necesarios para la correcta caracterización del comportamiento farmacocinético-dinámico poblacional.

Parámetros de efecto aleatorio intraindividual. Cuantifican la magnitud de la variabilidad residual, incluyendo entre otras, la variabilidad cinética y dinámica intraindividual, el error de la técnica analítica, el error en la selección del modelo farmacostatístico, el error en los tiempos de muestreo, etc. Estos componentes de la varianza residual no se pueden estimar fácilmente por separado, ya que para ello se

necesitaría un número importante de datos clínicos suficientemente detallados y completos. Su principal utilidad reside en poder detectar la fuente de error y su magnitud.

Desde el punto de vista del diseño experimental, estos parámetros son los principales determinantes del número óptimo de muestras a obtener de un paciente para la correcta caracterización del comportamiento poblacional. En la estimación bayesiana de parámetros individuales para la individualización posológica, la magnitud de la variabilidad residual condiciona la utilidad de la información individual disponible (Yamaoka, 1985), hasta tal punto que cuando la magnitud de la variabilidad residual es muy superior a la magnitud de la variabilidad interindividual, el número de observaciones necesarias para estimar correctamente el comportamiento cinético y/o dinámico a nivel individual puede ser tan elevado que esta práctica sea inabordable y la mejor solución sea la administración de pautas posológicas estándar.

Tradicionalmente, se han utilizado los parámetros de efecto fijo para establecer una pauta de dosificación inicial. No obstante, de esta forma sólo se puede predecir el comportamiento medio del cual el paciente puede diferir significativamente. Sólo el conocimiento de los parámetros de efecto aleatorio permite estimar cuánto puede desviarse del valor medio el comportamiento individual; es decir, cuál es el nivel de confianza del régimen de dosificación seleccionado. De aquí se desprende la trascendencia clínica de la estimación exacta y precisa de estos parámetros (Sheiner, 1991).

III.5.2. Métodos de estimación de parámetros poblacionales

Desde un punto de vista estadístico, los métodos de estudio poblacional se pueden clasificar en función de las asunciones realizadas acerca de la distribución de probabilidad de los parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos. Así, los métodos paramétricos asumen una distribución de probabilidad conocida, generalmente una distribución normal o normal-logarítmica, de la cual se desconocen sus características (primer y segundo momento). Los métodos no paramétricos no realizan asunción alguna acerca de la distribución de los datos y el investigador tendrá que estimar la

función de distribución de probabilidad (tabla III.15). Otra clasificación es agrupar los métodos en función de la forma en que se realiza la estimación de los parámetros poblacionales, es decir, métodos en una etapa y métodos en dos etapas.

Tabla III. 15 Clasificación de los métodos de estudio poblacional.

<u>A. MÉTODOS PARAMÉTRICOS</u>	<u>B. MÉTODOS NO PARAMÉTRICOS</u>
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Métodos simples de datos <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Método simple promedio de datos ⇒ Método simple de combinación de datos ❖ Métodos en dos etapas <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Método estándar ⇒ Método global ⇒ Método iterativo ⇒ Método de filtrado no lineal ⇒ Algoritmo EM ❖ Modelo no lineal de efectos mixtos ❖ Métodos bayesianos: Gibbs sampler 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Métodos no paramétrico de máxima verosimilitud ❖ Método no paramétrico de máxima expectación ❖ Método no paramétrico uniforme de máxima verosimilitud

III.5.2.1. Modelo no lineal de efectos mixtos

El modelo de efectos mixtos (en inglés, Nonlinear Mixed Effects Model, NONMEM) (Beal, 1979) fue desarrollado para solventar los inconvenientes inherentes a los métodos en dos etapas. El término “modelo de efectos mixtos” hace referencia a la inclusión de parámetros de efecto fijo y aleatorio, tanto interindividual como intraindividual, en el modelo farmacoestadístico con el fin de ser estimados en una única etapa. En realidad, este método es la primera aproximación farmacoestadística para el análisis de datos poblacionales capaz de utilizar los datos obtenidos en la práctica clínica, en especial cuando éstos son de escasa calidad. De hecho este método permite estimar la variabilidad interindividual sin obviar la gran cantidad de limitaciones presentes en los datos observacionales (Sheiner, 1977; Steimer, 1984).

En un modelo farmacoestadístico general, la j -ésima medida de concentración plasmática o efecto farmacológico, en el individuo i -ésimo de la población de estudio puede expresarse como:

$$y_{ij} = f(\Phi, x_{ij}, \eta_i) + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ecuación III. 29}$$

y la linealización del modelo farmacoestadístico mediante series de Taylor de primer orden con respecto a las variables que cuantifican los efectos aleatorios puede expresarse como:

$$y_{ij} = f(\Phi, x_{ij}) + G_{ij}(\Phi, x_{ij})\eta_i + \varepsilon_{ij} + \gamma_{ij} \quad \text{Ecuación III. 30}$$

$$\text{donde } G_{ij}(\Phi, x_{ij}) = \left. \frac{\partial f(\Phi, x_{ij}, \eta_i, \varepsilon_{ij})}{\partial \eta_i^T} \right|_{\eta_i=0} \quad \text{Ecuación III. 31}$$

donde $G_{ij}(\theta, x_{ij})$ es la matriz $1 \cdot p$ de las primeras derivadas de $f(\theta, x_{ij}, \eta_i, \varepsilon_{ij})$ con respecto a η_i , en η_i igual a cero y γ_{ij} es el término asociado al error cometido en la linealización. En este ejemplo, el modelo es lineal en ε_{ij} y por tanto, no es necesario linealizar la función respecto de ε_{ij} . En algunas ocasiones, puede ser conveniente una transformación de los datos, como la transformación logarítmica, para garantizar la linealidad con respecto a ε_{ij} . Por otra parte, el método NONMEM asume que los parámetros de efecto aleatorio, ε_{ij} y η_i , son independientes y su función de distribución de probabilidad sigue una ley normal, cuya media y varianza viene expresada de la siguiente forma:

$$\varepsilon_{ij} \approx N(0, \sigma^2) \quad \text{Ecuación III. 32}$$

$$\eta_i \approx N(0, \Omega) \quad \text{Ecuación III. 33}$$

donde Ω es la matriz de varianza-covarianza $P \cdot P$ de los P vectores η_i (Sheiner, 1977). La función de distribución de probabilidad normal se elige principalmente por dos razones. En primer lugar, esta función de distribución de probabilidad proporciona un modelo de varianza empírico, pero razonable para muchas situaciones reales que

implican procesos aleatorios, como pueden ser numerosos procesos biológicos. Por otra parte, desde el punto de vista matemático, se prefiere la función de distribución de probabilidad normal porque los componentes aleatorios individuales contribuyen de forma aditiva a los datos observacionales. Este hecho permite desarrollar con relativa facilidad funciones matemáticas de menor complejidad que pueden ser resueltas mediante procedimientos iterativos. Las funciones de distribución de probabilidad no normales son difíciles de resolver y la obtención de las estimaciones de los parámetros del modelo consume mucho tiempo, incluso en potentes ordenadores.

Teniendo en cuenta, las asunciones sobre la función de distribución de probabilidad de ε_{ij} y η_i , su independencia y la linealización del modelo farmacostatístico, la esperanza matemática y la matriz de varianza-covarianza de las observaciones del individuo i -ésimo de la población pueden expresarse de la siguiente forma:

$$E_i = f(\Phi, x_i) \quad \text{Ecuación III. 34}$$

$$C_i = G(\Phi, x_i) \mathcal{O} G(\Phi, x_i)^T + \sigma^2 I_{n_i} \quad \text{Ecuación III. 35}$$

donde $f(\Phi, x_i)$ es el vector de las predicciones de y_i , $G(\Phi, x_i)$ representa la matriz $N_i \times P$ de las primeras derivadas de $f(\Phi, x_i, \eta_i, \varepsilon_i)$ con respecto a η_i . Cuando η_i es igual a cero I_{n_i} representa la matriz identidad de tamaño n_i . Según el principio de máxima verosimilitud, los parámetros del modelo más probables son aquellos que hacen máxima la función de verosimilitud, es decir, la probabilidad de obtener los valores observados. Así, la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales mediante el método de máxima verosimilitud se obtiene al minimizar -2 veces el logaritmo de la verosimilitud poblacional ($-2LL$) de la forma expresada en la siguiente ecuación:

$$OBJ_{NONMEM} = -2LL = \sum_{i=1}^N \left[\log(\det(C_i)) + (y_i - E_i)^T C_i^{-1} (y_i - E_i) \right] \quad \text{Ecuación III. 36}$$

Como se puede apreciar, la minimización de la función objetivo se realiza en función de los valores poblacionales ϕ , Ω , σ^2 . Esta función objetivo es muy similar a la empleada por el método global en dos etapas, pero en este caso se emplean las observaciones realizadas de cada individuo, contenidas en el vector y_i , mientras que el método global utiliza el vector de los parámetros individuales obtenido en la primera etapa. Esto hace que los dos métodos compartan algunas propiedades y limitaciones estadísticas (Rodríguez, 1996b).

La aproximación descrita hasta aquí se denomina **aproximación de primer orden** del método NONMEM (en inglés, First Order, FO) y probablemente, se trata del método más utilizado y validado en el análisis farmacocinético y farmacodinámico poblacional (Mandema, 1995). Los estudios de simulación evidencian la superioridad de este método frente al método estándar en dos etapas y los métodos simples de datos en cuanto a la exactitud y precisión de la estimación de parámetros farmacocinéticos poblacionales de distintos modelos estructurales, bien con datos experimentales donde la superioridad se manifiesta en la estimación de los parámetros de efecto aleatorio (Grasela, 1986; Collart, 1992; Arons, 1991b; Kaniwa, 1990; Pai, 1992), bien con datos observacionales donde la superioridad se manifiesta tanto en los parámetros de tendencia central como de variabilidad (Sheiner, 1980; Sheiner, 1981a; Sheiner, 1983; Beal, 1984; Steimer, 1984; White, 1991; Mentré, 1995). Es más, a medida que la variabilidad residual se incrementa, los métodos en dos etapas y los métodos simples de datos tienen una mayor pérdida de exactitud y precisión en la estimación de los parámetros poblacionales que la aproximación de primer orden del método NONMEM.

La correcta caracterización de la variabilidad interindividual exige el análisis de un número suficiente de individuos representativos de la población de estudio que permita caracterizar esta magnitud. En cualquier caso, el número de individuos necesarios para un estudio poblacional y el número de observaciones necesarias en cada individuo dependen del modelo farmacoestadístico utilizado y pueden ser determinadas a priori mediante estudios de simulación (Edrenyi, 1981; Al-Banna, 1990; Ette, 1993; Pérez-Ruixo, 1998).

El posible sesgo cometido en el proceso de estimación de parámetros, condicionado por el error cometido en la aproximación de primer orden, γ_i , en algunas ocasiones puede distorsionar considerablemente los parámetros obtenidos. En 1984, por primera vez, se evaluó el impacto de la linealización del modelo farmacostatístico mediante la comparación con la solución exacta obtenida de los parámetros farmacocinéticos poblacionales de un modelo monocompartimental mediante la estimación por máxima verosimilitud (Beal, 1984). En este caso, no existieron diferencias significativas en la exactitud y precisión de la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y el método NONMEM con aproximación de primer orden puede utilizarse sin cometer ningún sesgo cuando la variabilidad interindividual es menor del 25%. Posteriormente, se demostró que el sesgo inherente a la aproximación de primer orden se incrementa cuanto mayor sea la magnitud de la variabilidad interindividual y la variabilidad residual (White, 1991). Este sesgo podría ser debido bien a la utilización de un modelo de varianza log-normal para la simulación de los datos analizados, bien a la evaluación de la aproximación de primer orden en η_i igual a cero. En cualquier caso, la bondad de la aproximación de primer orden depende de la magnitud de la variabilidad interindividual y de la no linealidad del modelo. Por ello, en el análisis de datos reales estos problemas pueden ser resueltos parcialmente mediante la incorporación de covariables predictoras que reduzcan el grado de variabilidad interindividual.

Recientemente se ha desarrollado la aproximación de **primer orden condicional** (en inglés, First Order Conditional Estimation, FOCE). Con este método, la linealización en serie de Taylor se hace para $\eta_j = \eta_j^*$, lo cual permite solventar, en parte, el sesgo en la estimación de los parámetros poblacionales. En cambio, el tiempo requerido para el procesado de los datos con este método puede incrementarse considerablemente. Además, el valor de la función mínimo objetivo obtenido no es comparable con el que se obtiene con el método de primer orden.

En la identificación de covariables para la construcción del modelo farmacostatístico poblacional final suele utilizarse el método de primer orden, siempre y cuando la correlación entre concentraciones observadas y estimadas con el modelo básico (sin covariables) no aparezca sesgada. En este caso, una vez obtenido

el modelo final pueden reestimarse los parámetros farmacocinéticos poblacionales con el método de primer orden condicional (Burtin, 1994). En cambio, cuando la correlación entre concentraciones observadas y estimadas con el modelo básico aparece sesgada, debe emplearse el método de primer orden condicional. Si de esta forma el sesgo no desaparece, puede ser debido a un error en la selección del modelo estructural (Sheiner, 1992).

El método NONMEM también permite la aplicación de modelos de regresión múltiple para estudiar la influencia de las características antropométricas, biométricas, fisiopatológicas o cualquier otro predictor de los pacientes sobre los parámetros farmacocinéticos. En el caso de los modelos de regresión lineal es posible utilizar la propuesta por Hosmer y Lemeshow (1989) para obtener el mejor modelo predictivo. Así se pueden detectar interacciones entre fármacos (Grasela, 1987) e incluso mejorar el diseño y la recopilación de datos de ensayos clínicos (Antal, 1989). La gran ventaja de este método es la posibilidad de emplear datos de rutina clínica que difícilmente podrían ser utilizados en otros métodos. Asimismo, las ventajas estadísticas de este método, sobre el método en dos etapas, incluyen mayor eficacia en la estimación de los parámetros poblacionales, la posibilidad de estimar intervalos de confianza no sólo de los parámetros de efecto fijo, sino también de los de efecto aleatorio, la capacidad de evaluar el modelo obtenido ponderando automáticamente los datos y la exactitud y precisión de las estimas de los parámetros citados, independientemente del número de concentraciones plasmáticas por paciente y dosis (Sheiner, 1983).

Las aproximaciones paramétricas descritas hasta aquí asumen que los parámetros farmacocinéticos proceden de una distribución de probabilidad normal o log-normal, definida por unos parámetros desconocidos como son la media y su varianza. Mallet, describió una aproximación no paramétrica, que no realiza ninguna asunción sobre la forma de la distribución de probabilidad de los parámetros poblacionales, sino que estima esta función en la muestra de estudios a partir de datos mediante el procedimiento de máxima verosimilitud (Mallet, 1986). De esta forma, los **métodos no paramétricos** han sido los últimos métodos incorporados al análisis poblacional de datos, siendo posible explorar las distribuciones de probabilidad de los parámetros en su totalidad y detectar posibles multimodalidades, excesos de variabilidad, asimetrías,

valores extremos o sesgos en las distribuciones. Esta posibilidad les confiere una importante ventaja respecto a los métodos paramétricos y justifica su mayor utilización como herramienta exploratoria de los datos que complementa la información obtenida mediante los métodos paramétricos. Además, estos métodos pueden servir para verificar la validez de las asunciones estadísticas realizadas mediante el análisis por métodos paramétricos y obtener estimaciones refinadas de la variabilidad interindividual cuando existen factores desconocidos por el investigador que influyen significativamente en la variable respuesta (Dodge, 1991; Rodríguez, 1996c; Ette, 1998; Karlsson, 1998). Por otra parte, se trata de métodos en una etapa, al igual que el modelo no lineal de efectos mixtos, que permite incorporar pacientes de los que únicamente se disponga de una observación. Básicamente, existen dos métodos no paramétricos: el método no paramétrico de máxima verosimilitud (NPML) y el método no paramétrico de máxima expectación (NPEM).

Los métodos no paramétricos presentan una serie de inconvenientes comunes, como la complejidad teórica, la dificultad de su implementación del software y el excesivo tiempo de procesamiento de datos. Tampoco es posible obtener directamente los intervalos de confianza para los parámetros poblacionales estimados y por tanto, no permiten una valoración estadística de los resultados obtenidos. En general, se prefiere una función de distribución de probabilidad continua en lugar de la solución discreta que estos programas generan como consecuencia de su mayor aplicabilidad. Por otra parte, en los métodos no paramétricos es necesario conocer previamente el modelo de varianza residual, que no siempre está disponible ni es fácil de obtener, por lo que en numerosas ocasiones requiere asumir el modelo de error derivado de la técnica analítica como modelo de varianza residual. Esta asunción implica considerar a la técnica analítica como la principal fuente de variabilidad residual (Mallet, 1986; Dodge, 1994; Rodríguez, 1996c).

Estos problemas, unido a la complejidad y escasa disponibilidad de programas informáticos que implementen los algoritmos no paramétricos, en contraste con la relativa simplicidad y amplia divulgación de los métodos paramétricos y la mayor eficiencia y poder de los estos últimos justificaría su menor utilización y aplicación en el análisis de los datos. No obstante, la utilidad del análisis poblacional no paramétrico ha

sido ampliamente utilizada en los últimos años con diversos fármacos en distintas poblaciones como es el caso de la gentamicina en neonatos (Dodge, 1993), neonatos de bajo peso (Dodge, 1991), en patología vascular periférica (Izquierdo, 1991; Tesis Doctoral Izquierdo, 1993), en pacientes con indicadores de desnutrición (Kisor, 1992), en pacientes críticos (Watling, 1993; Tesis Doctoral Mateu, 1997), en pacientes con lesión espinal (Gilman, 1993); gentamicina y tobramicina en pacientes oncológicos (Ordovás, 1994); tobramicina en pacientes críticos (Tesis Doctoral Mateu, 1997); zidovudina (Mentré, 1992); ciclosporina (Mallet, 1988); vancomicina en pacientes críticos (Llopis, 1997); trimetoprim (Jelliffe, 1997); litio (Taright, 1994); 5-Fluoruracilo (Tesis Doctoral Climente, 1997) y docetaxel (Bruno, 1996).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de la variabilidad en la respuesta farmacocinética de la población, se ha dividido en tres etapas: diseño del estudio, selección del modelo farmacostatístico, estimación de los parámetros de efecto fijo y de efecto aleatorio mediante los métodos seleccionados e influencia de las covariables. Se trata en definitiva de un estudio clínico prospectivo, sin grupo control, no aleatorizado, que analiza el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con una aproximación farmacodinámica en pacientes con cáncer de mama de alto riesgo subsidiarias de quimioterapia de intensificación.

IV.1. Pacientes y Tratamiento Farmacoterapéutico

La población de estudio está compuesta por pacientes diagnosticadas de cáncer de mama de alto riesgo en tratamiento con quimioterapia a altas dosis y posterior

rescate con células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, en el Hospital Clínico Universitario y en el Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

IV.1.1.Criterios de inclusión y exclusión de pacientes

Para este estudio se han seleccionado las pacientes que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

1. Pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo:
 - pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de mama en estadio II y III, con más de 10 ganglios axilares afectados tras cirugía reglada sin resto tumoral (mastectomía radical ó mastectomía radical modificada con vaciamiento axilar) o,
 - pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de mama en estadio II y III con más de 4 ganglios axilares afectados tras quimioterapia neoadyuvante o,
 - pacientes con carcinoma inflamatorio de mama.
2. Biopsia de médula ósea sin afectación metastásica
3. Edad menor de 65 años y mayor de 18 años
4. Estado general inferior a 2 según la escala ECOG, ó superior a 60% en la escala Karnofsky. Es decir, pacientes con actividad normal, sin ningún síntoma de enfermedad, ó con restricción física de la actividad, aunque puedan desarrollar su vida de forma ambulatoria y realizar trabajo ligero.
5. Inicio del tratamiento sistémico adyuvante en las primeras 6 semanas tras la cirugía.
6. Ausencia de enfermedad neoplásica (excepto carcinoma cutáneo basocelular ó carcinoma de cervix in situ ó carcinoma de mama contralateral) ó tratamiento con quimioterapia previo.
7. Función medular normal; es decir, hemoglobina (Hb) superior a 11 g/dL, recuento de leucocitos superior a $3 \cdot 10^9$ /L y plaquetas superior a $100 \cdot 10^9$ /L.

8. Función renal conservada; es decir, creatinina sérica (Cr_s) inferior a 1.5 mg/dL.
9. Función cardíaca normal, confirmada por electrocardiograma y fracción de eyección ventricular (FEV) superior al 50%.
10. Función hepática conservada; es decir, bilirrubina, AST y ALT inferiores a 2.5 veces el límite superior de la normalidad
11. Función respiratoria normal, confirmada mediante pruebas funcionales con DLCO (difusión del pulmón para el monóxido de carbono).
12. Ausencia de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
13. Ausencia de embarazo o lactancia materna
14. Firma del consentimiento informado para el tratamiento con altas dosis y reinfusión de células precursoras hematopoyéticas de sangre periférica.

Cuando los pacientes cumplían los criterios de inclusión anteriores, el único requisito adicional necesario para su inclusión en el estudio fue la firma de su consentimiento para la monitorización de concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida, tras ser informado verbalmente y por escrito de los objetivos y metodología del estudio que evalúa la relación entre el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida y la respuesta clínica del paciente (Anexo 2).

Asimismo, se han excluido del estudio los pacientes que cumplían al menos uno de los siguientes criterios de exclusión:

1. Presencia de neoplasia o antecedentes de cáncer distinto al carcinoma cutáneo basocelular o carcinoma de cervix *in situ* ó carcinoma de mama contralateral.
2. Embarazo o lactancia materna
3. Enfermedad no oncológica significativa, incluida la infección por VIH no documentada, la hipertensión no controlada (presión diastólica superior a 115 mmHg), insuficiencia cardíaca congestiva (clase III y IV de la

clasificación funcional de la New York Heart Association –NYHA) o antecedentes de arritmia cardiaca no controlada.

4. Trastornos psiquiátricos, adictivos ó de cualquier tipo que comprometa la capacidad para otorgar el consentimiento informado verdadero para la participación en el estudio.

5. Cualquier circunstancia que impida que el tratamiento y su seguimiento se realicen según el protocolo establecido, como puede ser la progresión de la enfermedad, la aparición de cardiotoxicidad y el descenso de la FEV por debajo de los límites normales, la toxicidad pulmonar ó neurológica grado 3 ó superior (según escala de la OMS) y la presencia de cistitis hemorrágica secundaria a la administración de ciclofosfamida.

IV.1.2.Tratamiento farmacoterapéutico

Las pacientes seleccionadas recibieron como tratamiento sistémico adyuvante entre 4 y 6 ciclos de quimioterapia según el esquema FEC (fluorouracilo 600 mg/m² IV, epirrubicina 75 mg/m² IV y ciclofosfamida 600 mg/m² IV) ó AC (adriamicina 40 mg/m² IV día 1 y ciclofosfamida 200 mg/m² PO, días 3-6). Salvo en el caso en que se administró quimioterapia neoadyuvante, previa a la mastectomía radical ó mastectomía radical modificada, el número total de ciclos de quimioterapia no fue superior a 6.

El tratamiento sistémico adyuvante se inició durante las primeras 6 semanas tras la cirugía. Cada ciclo se administró con una periodicidad de 21 días, siempre que el recuento absoluto de neutrófilos (ANC) fuese superior a 1.5·10⁹ /L, las plaquetas se situaran por encima de 100·10⁹ /L y no existiese mucositis residual. Cuando el ANC era inferior a 1.5·10⁹ /L, se retrasaba la administración de la quimioterapia y se repetía la monitorización del ANC cada tres días, hasta alcanzar valores superiores 1.5·10⁹ /L, momento en el cual se administraba el 100% de las dosis de los fármacos citostáticos del esquema de quimioterapia y se iniciaba simultáneamente tratamiento con rHuG-CSF a dosis de 5 µg/kg/día, entre el día 5 y 12 después de la administración de la quimioterapia. Cuando el retraso era superior a una semana, con independencia de si se hubiese o no administrado rHuG-CSF o si apareciese neutropenia febril y/o trombopenia grave (< 25·10⁹ /L), las dosis de los fármacos citostáticos se reducían un

15%. En caso de mucositis grado III o superior, no se administraba el ciclo hasta que la paciente estuviese recuperada. En este caso se reducían las dosis de los fármacos un 15% en los ciclos sucesivos. Si persistía este problema en ciclos sucesivos, la reducción podía alcanzar hasta el 30%.

Tras la quimioterapia adyuvante, se procedió a la obtención y conservación de las células precursoras hematopoyéticas de sangre periférica. Para ello se administraron dosis comprendidas entre 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de filgrastim o 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de lenograstim, desde el día después de la administración de la quimioterapia y hasta que el recuento de neutrófilos alcanzase un nivel estable, compatible con la interrupción del tratamiento. La leucoaféresis se realizó cuando el recuento de leucocitos tras el nadir había aumentado lo suficiente como para alcanzar una elevada tasa de células CD34+ en sangre periférica.

Transcurridas entre cuatro y seis semanas desde la última leucoaféresis, las pacientes ingresaban en el hospital para la administración de altas dosis de quimioterapia y rescate hematopoyético con células precursoras de sangre periférica. La quimioterapia a altas dosis se basa en el esquema STAMP-V y consta de la administración intravenosa de ciclofosfamida 1.5 $\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$, tiotepa 125 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ y carboplatino 200 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$, en perfusión continua de 24 horas, durante cuatro días seguidos. La administración de la quimioterapia se realizaba a través de un catéter central de doble luz, mediante una bomba de perfusión. El tiotepa se administraba en Y por la misma vía que la fluidoterapia y la mezcla intravenosa binaria ciclofosfamida-MESNA se administraba en Y con el carboplatino por la otra vía (tabla IV.1). Tres días después de finalizar la quimioterapia se procedió a la reinfusión de las células precursoras de sangre periférica obtenidas mediante la aféresis.

La administración de la quimioterapia a altas dosis exige un tratamiento de soporte basado en la hidratación, alcalinización y diuresis forzada, tratamiento antiemético, profilaxis y tratamiento de infecciones oportunistas, tratamiento con factores estimulantes de colonias de granulocitos y soporte nutricional. La pauta de hidratación, alcalinización y diuresis forzada, habitualmente se realizó mediante la administración diaria de 3000 mL/m^2 de solución glucosalina 1/3 con 90 mEq/m^2 de cloruro potásico,

240 mEq de bicarbonato sódico y 20 mg de furosemida cada 12 horas. El tratamiento antiemético consistió en la administración de antagonistas 5-HT₃, ondansetrón (8 mg cada 8-12h) o tropisetron (5 mg cada 24h) o granisetron (2 mg cada 24h), junto con dexametasona 4 mg/m² cada 12 horas, durante al menos los 5 días siguientes al inicio de la quimioterapia. Asimismo, también se administró profilaxis antibiótica por vía oral, desde el inicio de la quimioterapia, mediante norfloxacin 400 mg cada 12 horas o ciprofloxacino 500 mg cada 12 horas, aciclovir 400 mg cada 8 horas y fluconazol 200 mg cada 24 horas. En caso de neutropenia febril, el tratamiento antibiótico por vía intravenosa consistió en amikacina 1 g cada 24 horas y piperacilina/tazobactam 4/0.5 g cada 6 horas. Si en 48 horas, no aparecía respuesta al tratamiento, se añadía empíricamente vancomicina 1 g cada 12 horas; y si transcurridas 72 horas desde el inicio de la fiebre la paciente continuaba sin responder al tratamiento, se iniciaba tratamiento con anfotericina B, inicialmente a dosis de 0.5 mg/kg/día que posteriormente se individualizaba en función de la situación clínica del paciente. En caso de ser necesario, el tratamiento antibiótico se ajustó a la función renal de las pacientes.

El tratamiento con factores estimulantes de colonias de granulocitos se inició el día siguiente a la reinfusión de las células precursoras de sangre periférica (día +1), o bien transcurridos 5 días desde la reinfusión (día +5). Así, se administró, vía intravenosa o subcutánea, filgrastim 300 o 480 µg/día o lenograstim 263 µg/día hasta que las cifras de neutrófilos se encontraran por encima de $1.5 \cdot 10^9$ /L durante tres días consecutivos. El soporte nutricional en los pacientes cuya ingesta calórica no cubría más del 50% de sus necesidades se basó en nutrición parenteral total y se desarrolló según los protocolos establecidos en cada hospital.

Tabla IV. 1 Tratamiento farmacoterapéutico de los pacientes (protocolo STAMP-V).

Principio activo	Pauta posológica y duración del tratamiento
Ciclofosfamida	1.5 g/m ² en 500 mL de G5%, PIV de 24 h, durante 4 días
Mesna	375 mg/m ² en 100 mL de G5%, dosis única previa al inicio de la quimioterapia, después 1.5 g/m ² junto con la ciclofosfamida, PIV de 24 h, durante 4 días
Tiotepa	125 mg/m ² en 500 mL NaCl 3%, PIV de 24 h, durante 4 días
Carboplatino	200 mg/m ² en 500 mL de G5%, PIV de 24 h, durante 4 días
Fluidoterapia	2000 mL/m ² de solución glucosalina 1/3, con 90 meq/m ² de cloruro potásico, PIV de 24 h
Bicarbonato sódico	1/6 M 1000 mL PIV de 24 h
Ondansetrón	8 mg i.v. cada 8 h, durante 5 días
Dexametasona	8 mg i.v. cada 8 h, durante 5 días
Clorhexidina	enjuagues con 10 mL VO cada 6 h
Nistatina	enjuagues con 10 mL VO cada 6 h
Anfotericina B	aerosol 4 mg cada 12 h
Norfloxacino	400 mg VO cada 12 h
Aciclovir	400 mg VO cada 8 h
Fluconazol	200 mg VO cada 24 h
Magaldrato	2000 mg VO cada 8 h
Ranitidina	300mg VO cada 24 h
Lactitol	1 sobre VO cada 24 h
Loracepam	1 comp VO cada 24 h
Alopurinol	300 mg VO cada 24 h
Furosemida	20 mg i.v. cada 12 h

PIV: Perfusión intravenosa; VO: vía oral; i.v. Intravenoso; G5%: Glucosa 5%.

IV.2. Recogida de Datos de la Historia Clínica

De todas las pacientes incluidas en el estudio se han registrado, siempre que ha sido posible y se han encontrado en la historia clínica, los datos correspondientes a las características antropométricas, parámetros bioquímicos y hematológicos, características clínicas de interés y tratamiento farmacoterapéutico desde el inicio del tratamiento con quimioterapia a altas dosis hasta el alta hospitalaria del paciente. Así

se recogieron las características antropométricas: edad (años), peso (kg), talla (cm), superficie corporal (m^2) calculada mediante el nomograma de Du Bois y Du Bois; los datos bioquímicos: glucosa sérica (mg/dL), urea (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), creatinina sérica (mg/dL), proteínas totales y albúmina (g/dL), colesterol total y triglicéridos (mg/dL), enzimas hepáticas (U/L): aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FA). También se recogieron los datos hematológicos: hemoglobina (g/dL), plaquetas (U/mm^3) y recuento de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y basófilos (U/mm^3). También las características clínicas referentes al diagnóstico, antecedentes personales, antecedentes médico-quirúrgicos, patologías asociadas, fracción de eyección ventricular, aféresis de CD34+ (U/kg), fecha de la reinfusión de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, necesidades transfusionales y otras complicaciones significativas que pudieran surgir durante el ingreso.

IV.3. Técnica Analítica

El diseño del estudio farmacocinético ha exigido disponer previamente de la técnica analítica adecuada para determinar las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida. La puesta a punto de la técnica analítica para la determinación de ciclofosfamida ha incluido el desarrollo y la validación de la misma, así como el establecimiento de su modelo de varianza, respectivamente (Tesis Doctoral Medina, 1999).

IV.3.1. Material, soluciones madre y patrones

La determinación de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida en las muestras de sangre obtenidas de los pacientes se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Se utilizó un equipo cromatográfico Hewlett-Packard® de la serie 1100, provisto de una válvula de inyección rotatoria Rheodyne® con un bucle de 20 μ l, inyector automático, bomba cuaternaria con posibilidad de realizar elución en gradiente, detector UV-visible de longitud de onda variable y un compartimento termostatizador de columna. La adquisición y tratamiento de datos se

llevó a cabo mediante un ordenador Pentium 90, HP-Vectra de Hewlett-Packard®, provisto del programa HPChemstation® (versión 1996).

Para ajustar el pH de las disoluciones y/o fases móviles se utilizó un pH-metro Hanna Instruments®, modelo HI 9017 y pH-metro Crison®, modelo micropH 2000, provisto de un electrodo de vidrio-calomelanos.

Las muestras de plasma se centrifugaron mediante una ultracentrífuga con la temperatura controlada a 4°C (Heraeus®). Para realizar la extracción en fase sólida se empleó una estación de vacío Vac Elut® 20 (Varian Sample Preparations Products®).

Los principios activos ciclofosfamida e ifosfamida han sido cedidos por los laboratorios Funk®, a través de la división ASTA médica, Prarfarma, SA. Según el informe remitido junto con los productos, la ciclofosfamida poseía una riqueza del 99.7%, la ifosfamida del 99.5%.

Los reactivos empleados fueron de calidad para análisis. En la preparación de las fases móviles se emplearon disolventes específicos para CLAE. Los reactivos utilizados fueron: monohidrógeno fosfato potásico 99%, ácido fosfórico (p.a.), acetonitrilo, metanol y 2-propanolol. Todos ellos de Carlo Erba®. Además, se utilizó hidróxido sódico de Panreac®. Como reactivo derivatizante 2,4-dinitrofenilhidracina fue obtenido E. Merck.

El agua utilizada en la preparación de las disoluciones fue de calidad ultrapura, obtenida con un desionizador E-pure Barnstead®. Las fases móviles y disoluciones, fueron filtradas a través de una membrana de 0.22 µm de poro de Osmonics®, con ayuda de un sistema de succión a vacío.

Con plasma humano "blanco" libre de otros fármacos o sustancias que pudieran interferir, obtenido de donantes.

Como fase estacionaria para la determinación de ciclofosfamida se empleó una columna kromasil C8 de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro medio y un tamaño de partícula de 5µm, cuyo relleno está formado por grupos octilo químicamente ligados a kromasil 100 Å. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y la longitud de onda de detección fue de 200 nm. A partir de éstas se prepararon soluciones de referencia de ciclofosfamida en agua desionizada.

Con plasma humano “blanco” y a partir de las soluciones de referencia anteriores, se prepararon disoluciones de ciclofosfamida en plasma a las concentraciones de 3, 5, 10, 20, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como valor cero se ha utilizado el plasma humano referido.

IV.3.2. Método analítico

Preparación de las muestras de sangre. La muestra de 2-3 mL de sangre, extraída de la paciente y recogida en tubos EDTA, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el plasma de los elementos formes de la sangre. Las muestras de plasma una vez obtenidas y procesadas se congelaron a una temperatura de -4°C y se conservaron hasta el momento de realizar el análisis en un tubo de vidrio a menos 30°C donde la estabilidad del fármaco es, al menos, de 20 días (Tesis Doctoral Medina, 1999). A 250 μL de muestra se añadían 40 μL de la disolución de ifosfamida de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (patrón interno) y 750 μL de tampón fosfato 0.025 M de $\text{pH}=4.2$. Los cartuchos de extracción en fase sólida (columnas CH, ciclohexilo) se activaron haciendo pasar metanol (2-3 mL) y se acondicionaron con 2-3 mL de tampón fosfato 0.025 M de pH 4.2. Posteriormente, 1 mL de la muestra se introdujo en el cartucho y se forzó su paso mediante la aplicación de vacío (velocidad de paso aproximada 9 mL/min). Los cartuchos se lavaron con 2-3 mL de una disolución compuesta por tampón fosfato y acetonitrilo en proporción 90:10 y se procedió a la elución de la muestra a través de los cartuchos mediante 500 μL de una disolución de tampón fosfato y acetonitrilo en proporción 60:40. Finalmente, 20 μL del eluato se inyectaron en el sistema cromatográfico.

Condiciones cromatográficas

Para la determinación de ciclofosfamida. El sistema cromatográfico utilizado fue un sistema de fase inversa, es decir, con fase estacionaria apolar y fase móvil polar. La fase estacionaria utilizada fue una columna Kromasil[®], con partículas de sílice de 5 μm de tamaño con radicales octilo químicamente ligados a kromasil 100 Å (C_8) unidos químicamente y empaquetada en una columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. Con el fin de evitar la adsorción irreversible de pequeñas partículas en la cabeza de la columna y alargar el tiempo de utilización de la columna, se utilizó una precolumna de composición similar, con un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil utilizada estaba constituida por tampón fosfato 0.025 M y

acetonitrilo en proporción 75:25 y poseía un pH = 4. Su preparación se realizaba de la siguiente forma: se disolvían 3.4 g de potasio dihidrógeno fosfato (calidad CLAE) en 1000 mL de agua desionizada y la disolución resultante se filtraba a través de un filtro de 0.22 μm (Osmonics[®]) y se desgasificaba antes de su utilización. Como patrón interno se utilizó ifosfamida a concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. En cada valoración, se han inyectado 20 μL de muestra con una velocidad de flujo 1.0 mL/min. La detección se ha realizado a la longitud de onda de 200 nm y la temperatura de la columna se ha mantenido constante a 25 °C.

Validación del método analítico

Determinación de ciclofosfamida:

Recuperación. Durante el proceso de extracción puede perderse parte del fármaco presente en las muestras de plasma. Con la finalidad de valorar cuantitativamente la recuperación del fármaco presente en las muestras de plasma, se realizaron tres ensayos de recuperación tras la técnica de extracción en fase sólida de la ciclofosfamida en plasma. Así, se preparó una recta patrón de calibrado de ciclofosfamida en disolución acuosa, en el ámbito de concentraciones comprendido entre 3 y 50 $\mu\text{g/mL}$. La determinación de la concentración de ciclofosfamida presente en las muestras se basaba en la relación lineal existente entre la concentración plasmática y la relación de áreas de los picos correspondientes a ciclofosfamida e ifosfamida en el cromatograma. Por ello, fue necesario verificar la linealidad del modelo para garantizar la extrapolación de los resultados. Asimismo, se determinó la sensibilidad, exactitud y precisión del método analítico de ciclofosfamida en disolución acuosa, a partir de una recta de calibración basada en 6 disoluciones que abarcaban el ámbito de concentraciones entre 3 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, durante tres días consecutivos, se prepararon dos disoluciones de ciclofosfamida en plasma a las concentraciones teóricas de 5 y 40 $\mu\text{g/mL}$, que se sometieron al proceso de extracción y posteriormente, se analizaron cuantitativamente. La relación de áreas de los picos cromatográficos obtenidos para la ciclofosfamida y la ifosfamida se interpoló en la recta patrón de calibrado en disolución acuosa y de esta

forma se obtuvieron las concentraciones experimentales de ciclofosfamida. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la expresión:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{C_{p \text{ exp}}}{C_{p \text{ teórica}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación IV. 1}$$

Linealidad. La capacidad del método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración plasmática de ciclofosfamida se evaluó mediante el análisis de la curva de calibrado que relacionaba la concentración de ciclofosfamida con la respuesta cromatográfica (relación entre las áreas de los picos cromatográficos de la ciclofosfamida y la ifosfamida). Para ello, se prepararon patrones en plasma de ciclofosfamida a las concentraciones de 3, 5, 10, 20, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Cada disolución se trató de la misma forma que las muestras problema y se valoraron por quintuplicado. La relación entre los pares de valores concentración plasmática y relación de áreas de los picos ciclofosfamida/ifosfamida se analizó mediante regresión lineal por mínimos cuadrados.

Exactitud y precisión. La determinación de la exactitud y la precisión del método analítico se evaluaron a las concentraciones de 3, 5, 10, 20, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentración fue procesada varias veces y se determinó su concentración como si se tratara de una muestra. Los valores obtenidos para cada patrón se promediaron y se calculó su desviación estándar y coeficiente de variación. La exactitud del método de valoración se cuantificó mediante el error relativo existente entre los valores teóricos y los obtenidos para cada patrón y la precisión se expresó mediante el coeficiente de variación de cada medida.

Límite de cuantificación. El límite más bajo que permite realizar mediciones cuantitativamente precisas de la concentración plasmática de ciclofosfamida se calculó mediante el método propuesto por Miller (1993). Este método considera el límite de cuantificación como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. En este caso, al no disponer de la desviación estándar del blanco como tal, se ha calculado el límite de

cuantificación como la concentración ciclofosfamida correspondiente a 3 veces la desviación estándar de la concentración más baja del calibrado (3 $\mu\text{g/mL}$).

Control del proceso analítico. La determinación de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida lleva implícito un error analítico que puede ocasionar una estimación sesgada de los parámetros farmacocinéticos del paciente y en consecuencia, invalidar los resultados obtenidos sobre el comportamiento farmacocinético. Para garantizar la fiabilidad de la información obtenida de las concentraciones de ciclofosfamida determinadas en el laboratorio de Farmacocinética Clínica del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia se establecieron los límites de alerta e invalidación para la determinación de las concentraciones de referencia de ciclofosfamida correspondientes a 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

Los límites de alerta se definieron a partir del intervalo central de valores que contienen el 95% de los resultados de cada concentración de referencia. Los límites de invalidación se calcularon a partir del intervalo central de valores que comprende el 99% de los resultados obtenidos. Con los valores de las determinaciones de las concentraciones de referencia se construyeron los diagramas de control de Shewart. En estos gráficos se representa en el eje de abscisas el orden cronológico de las determinaciones realizadas y en ordenadas el valor observado. El gráfico resultante informa sobre la precisión de los resultados obtenidos. Una vez establecidos estos diagramas, el procedimiento a seguir consistía en determinar la concentración de ciclofosfamida en al menos dos muestras de plasma fortificadas preparadas en el laboratorio. Cada muestra se analizaba por triplicado y se determinaba su valor medio y su desviación estándar. Si los resultados encontrados se encontraban dentro de los límites de alerta establecidos se considerará que el proceso analítico era estable y se procedía al análisis de las muestras de los pacientes de acuerdo con el protocolo descrito. Si los resultados se encuentran fuera de los límites de invalidación o fuera de los límites de alerta dos veces consecutivas, se analizaban las posibles causas que ocasionan una falta de control en el procedimiento analítico.

Modelos de varianza de la técnica analítica. Es una función explícita que relaciona el valor de una determinada concentración del fármaco (concentración de

referencia) y la variabilidad del método analítico asociada a esa concentración. En este caso, se han seleccionado 6 concentraciones de referencia, correspondientes al ámbito de valores que se obtienen tras la administración de ciclofosfamida a altas dosis, en función de las características farmacocinéticas del fármaco. Así, se realizaron medidas repetidas de las concentraciones de 3, 5, 10, 20, 40 y 50 ng/mL con el fin de caracterizar su valor medio y su variabilidad, cuantificada mediante la desviación estándar. La relación existente entre la media y la desviación estándar de las concentraciones de referencia se estudió mediante distintos modelos de varianza derivados de una ecuación polinómica de tercer orden, mediante la supresión de alguno o algunos términos del polinomio de modo secuencial. La estimación de los parámetros del modelo se realizó por regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios y mínimos cuadrados ponderados. En este último caso, el factor de ponderación fue el número de replicas realizadas para cada concentración de referencia. La selección del modelo de varianza que caracteriza la variabilidad de la técnica analítica de ciclofosfamida se realizó en base a los resultados del ajuste de los modelos en términos de suma de cuadrados de los residuales (SS), coeficiente de determinación ajustado (r^2 adj) y criterio de información de Akaike (AIC).

IV.4. Diseño del Estudio Farmacocinético

El diseño experimental farmacocinético se desarrollo a partir del establecimiento de una estrategia de monitorización de las concentraciones de ciclofosfamida que optimizara la información obtenida de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida, con la finalidad de obtener una estimación exacta y precisa de los parámetros farmacocinéticos individuales (Pérez-Ruixo, 1998).

La selección de una estrategia de monitorización de los pacientes consistió en establecer los tiempos óptimos a los cuales deben realizarse las extracciones de sangre, con el fin de optimizar la información obtenida para la estimación de los parámetros farmacocinéticos en un paciente determinado. El procedimiento utilizado para establecer esta estrategia se basa en los modelos farmacocinéticos del estudio de monitorización realizado a partir de la literatura científica para describir el

comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida (D'Argenio, 1981; Mentré; 1995; Sallas, 1995).

El resultado obtenido fue que con 50 pacientes y cinco concentraciones plasmáticas por paciente era posible caracterizar los parámetros con suficiente exactitud y precisión. Los tiempos de muestreo así obtenidos se combinaron entre sí considerando las limitaciones prácticas en la monitorización de estos pacientes (límite de cuantificación de la técnica analítica, descanso nocturno del paciente, horarios del personal de enfermería, etc.) (Pérez-Ruixo, 1998).

Una vez seleccionada la estrategia de monitorización de los pacientes y con el objetivo de facilitar el trabajo al personal de enfermería encargado de la extracción de muestras, se diseñó un impreso específico para la solicitud de la monitorización de concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida capaz de recoger la información mínima necesaria para el tratamiento farmacocinético de los datos obtenidos (Anexo 3). El personal sanitario recibió una serie de sesiones de aprendizaje sobre la extracción y preparación de las muestras de sangre y la cumplimentación del impreso de solicitud de monitorización de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida diseñado para la recogida de datos (Tesis Doctoral Pérez, 1999).

Al tiempo recomendado para cada extracción, se interrumpió la perfusión intravenosa, se extrajeron y desecharon aproximadamente 3 mL de sangre con el fin de evitar la hemodilución y a continuación se recogieron entre 2-3 mL de sangre en un tubo con EDTA (Vacutainer® tapón morado).

IV.5. Análisis Farmacocinético

A los tiempos predefinidos se obtuvieron las muestras de sangre para las pacientes. Y con las concentraciones plasmáticas obtenidas a los tiempos reales se realizó un análisis descriptivo, media, desviación estándar y coeficiente de variación. Además de una exploración gráfica de la relación concentración tiempo tanto de los valores individuales como de los valores medios con sus intervalos de confianza mediante el programa Sigmaplot.

Para el análisis farmacocinético se utilizó las concentraciones plasmáticas y el logaritmo de las concentraciones plasmáticas. El logaritmo de las concentraciones fue realizado con el programa Excel.

El método utilizado para estimar los parámetros poblacionales fue el modelo no lineal de efectos mixtos (en inglés, Nonlinear Mixed Effects Model, NONMEM) que incluye en el modelo parámetros de efecto fijo y aleatorio, tanto interindividual como intraindividual. La estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales se realizó mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados extendidos, con doble precisión estimación de primer orden (FO) y de primer orden condicional con interacción (FOCEI) implementada en el software NONMEM (Versión V, nivel 1.0). Con la subrutina ADVAN6 de NONMEM, con el objetivo de poder utilizar las ecuaciones diferenciales (Beal, 1989; Beal, 1992).

Además, la subrutina \$MIX (modelo mixture) permite caracterizar a priori diferentes subpoblaciones para uno o más parámetros en el modelo (Frame, 2003). El modelo mixture asume que en la población existen dos o más subpoblaciones con diferentes medias y puede que diferente variabilidad.

La magnitud de la variabilidad interindividual e intraindividual en los parámetros farmacocinéticos fue modelizada mediante el modelo exponencial. Cuando el análisis se ha realizado con el logaritmo las concentraciones el modelo de variabilidad intraindividual utilizado ha sido el modelo aditivo que corresponde al equivalente del exponencial.

Las covariables fueron exploradas como se describe en el apartado IV.5.4.2.

Los resultados para realizar las gráficas de la bondad del ajustado han sido obtenidos a partir de las tablas de salida del NONMEM y las gráficas se han creado mediante el programa Sigmaplot y Xpose31 (S-PLUS, versión 6).

Con objeto de simplificar las representaciones gráficas se ha simulado un individuo típico medio de la población para cada uno de los ajustados de cada modelo. La superficie corporal del individuo medio de la población fue 1.6 m^2 y por ello se administra 9600 mg ($6\text{g}/\text{m}^2$) de ciclofosfamida en perfusión continua durante 96 horas a una velocidad de $100 \text{ mg}/\text{h}$. Simulando las concentraciones plasmáticas y la cantidad de enzima.

La estadística ha sido realizada con el programa SAS Guide Enterprise (Versión 4.1).

La validación interna del modelo final ha sido realizada mediante el “visual predictive check” para el cual se ha realizado una simulación de 1040 pacientes de la población a partir de los parámetros obtenidos del modelo final. Se ha calculado los percentiles 5, 50 y 95 % de los valores simulados para ver si las observaciones se encuentran en el interior de estos límites.

Con el fin de comprobar el efecto de la concentración plasmática de ciclofosfamida sobre su autoinducción, con el modelo final se simuló un individuo tipo a diferentes dosis y se calculó el AUC y C_{max} a las diferentes dosis mediante el análisis no compartimental con el programa WinNonlin (Versión 3.3).

IV.5.1. Base de datos

El fichero de la base de datos fue confeccionado a partir de la información proveniente de la hoja de monitorización (dosis, tiempo de duración de la perfusión, tiempo reales), de la historia clínica (datos antropométricos, bioquímicas, medicación) y de las determinaciones plasmáticas de ciclofosfamida. Los datos fueron introducidos manualmente en un fichero Excel y guardado el fichero en el formato de Excel delimitado por espacios. Este fichero fue verificado por una segunda persona (control de calidad).

El fichero de datos utilizado para realizar el análisis farmacocinético contiene las siguientes variables (Anexo 6):

ID: Identificación de las pacientes, número correlativo de acuerdo al orden en que fueron reclutadas.

TIME: Tiempo de administración y de muestreo en horas.

CFA: Concentración plasmática de ciclofosfamida y el logaritmo de las concentraciones (\ln) $\mu\text{g/mL}$. En NONMEM, la concentración corresponde a la variable dependiente (DV).

AMT: Dosis administrada en mg. Esta dosis fue calculada mediante el nomograma de Du Bois y Du Bois por el oncólogo a partir de la superficie corporal de las pacientes y teniendo en cuenta que la dosis total 6 g/m^2 durante 4 días (96 horas). Se utiliza la dosis administrada por día para cada una de las perfusiones a las 0, 24, 48 y 72 horas. En un grupo de pacientes no fue posible conocer el tiempo de perfusión diaria y por ello se utilizó la dosis completa.

RATE: Velocidad de administración en mg/h. Se calculó dividiendo la dosis administrada por la duración de cada perfusión diaria a los diferentes intervalos de tiempo de 0-24, 24-48, 48-72 y 72-96 horas. En un grupo de pacientes no fue posible conocer el tiempo de perfusión diario pero se conocía la duración de la perfusión en el intervalo 0-96 horas. La velocidad fue calculada dividiendo la dosis total por la duración del intervalo.

CMT: Especifica el número del compartimento de observaciones y dosis. Donde el compartimento 1 corresponde a las observaciones y dosis de ciclofosfamida y el compartimento 2 corresponde solo a la dosis de enzima. Se asume que el enzima se encuentra en estado estacionario y el valor de dosis es 1.

MDV: La variable dependiente "missing", donde los valores MDV son:

- 0 DV es una observación (DV no es "missing").
- 1 DV no es una observación (DV es "missing"). El dato DV es ignorado.

Para el estudio de las covariables al fichero de datos se le incorporaron las distintas covariables recogidas de la historia clínica de cada paciente. Así se recogieron las características antropométricas: edad (años), peso (kg), talla (cm), superficie corporal (m^2) calculada mediante el nomograma de Du Bois y Du Bois; los datos bioquímicos: glucosa sérica (mg/dL), urea (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), creatinina sérica (mg/dL), proteínas totales (g/dL) y albúmina (g/dL), colesterol total (mg/dL) y triglicéridos (mg/dL), enzimas hepáticas (UI/L): aspartato aminotransferasa

(AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FA). También se recogieron los datos hematológicos: hemoglobina (g/dL), plaquetas (U/mm³), fracción de eyección ventricular (Anexo 9).

IV.5.2. Fichero control

Se escribió la sintaxis para todos los modelos que se encuentran descritos en el apartado siguiente (apartado IV.5.3).

Cada fichero control fue nombrado con la palabra "run" seguidos de un número correlativo según como se han ido ejecutando y con la extensión ".mod", al fichero salida se le ha dado el mismo nombre que al fichero de entrada pero con la extensión ".lst". Las diferentes tablas de salida fueron *sdtab*, *patab*, *mytab*, *cotab*, *catab* con el número correspondiente de análisis. *Sdtab* es la tabla estándar que contiene la información suficiente para poder realizar los gráficos de la bondad de ajuste: identificación (ID), tiempo (TIME), predicciones individuales (IPRED) y residuales ponderados individuales (IWRES), ya que por defecto el NONMEM incluye variable dependiente (DV), las predicciones poblacionales (PRED), residuales (RES) y residuales ponderados (WRES). *Patab* es la tabla de los parámetros (ID, ETA1, ETA2...). *Mytab* es la tabla para variables creadas en NONMEM como cantidad de enzima (ENZ) y la clasificación de la subpoblaciones (EST). *Cotab* y *Catab* son las tablas para covariables continuas y categóricas, respectivamente, utilizadas para la exploración de las covariables mediante GAM ("Generalised Additive Modeling, GAM").

IV.5.3. Modelos farmacoestadísticos

Para seleccionar el modelo farmacocinético poblacional que mejor refleja la evolución del fármaco en el organismo, los pares de valores concentración plasmática de ciclofosfamida tiempo y el logaritmo de las concentraciones tiempo, se ajustaron a los siguientes modelos farmacoestadísticos:

En el **modelo 1**, se describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con un modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante y eliminación de primer orden no inducida (Figura IV.1).

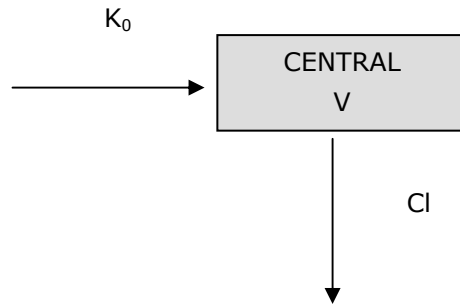


Figura IV. 1 Modelo 1. CFA: Modelo monocompartimental con administración en perfusión continua, con eliminación lineal de ciclofosfamida.

$$\frac{dCFA}{dt} = K_0 - \frac{Cl}{V} \cdot CFA \quad \text{Ecuación IV. 2}$$

La ecuación diferencial IV.2, describe el intercambio de masas respecto al tiempo para el compartimento considerado. En esta ecuación CFA representa la concentración plasmática de ciclofosfamida y se expresa en $\mu\text{g/mL}$. K_0 es la constante de orden 0, Cl es el aclaramiento plasmático en L/h y V es el volumen de distribución aparente de ciclofosfamida en litros.

Los siguientes modelos están basados en el hecho que la curva de perfusión no presenta un estado estacionario estable sino que adquiere pendiente negativa, la autoinducción de la ciclofosfamida podría ser la responsable. Existen datos en la bibliografía sobre el comportamiento tiempo dependiente de ciclofosfamida, esto hace que se considere la posibilidad de modelizar con el modelo del compartimento enzima. De esta manera, estos modelos incluyen parámetros farmacocinéticos adicionales. La autoinducción de ciclofosfamida se modeliza mediante un incremento no lineal o lineal de la velocidad de producción de la cantidad de enzima. La “enzima” responsable es considerada como un compartimento con formación enzimática a velocidad constante (orden cero) y desaparición del organismo según una cinética de orden uno. En condiciones basales, en este caso pacientes sin ciclofosfamida (tiempo 0, predosis), se asume que la cantidad de enzima se encuentra en estado estacionario (fisiológico) y

no cambia con el tiempo, es decir las velocidades de entrada y salida del compartimento del enzima son iguales. Al no conocer la cantidad real de enzima en su compartimento se considera valor 1 (fracción del valor basal igual a 100%); consecuentemente, la constante de formación (K_{ENZin}) se iguala al producto constante de eliminación enzimática (K_{ENZout}) por la cantidad de enzima (Enz basal). (Ecuación IV.3. y V.4.).

$$\frac{dEnz}{dt} = K_{ENZin} - K_{ENZout} \cdot Enz \quad \text{Ecuación IV. 3}$$

$$K_{ENZin} = K_{ENZout} \cdot Enz_{basal} \quad \text{Ecuación IV. 4}$$

Al considerar el valor basal de $Enz=1$ resulta que $K_{ENZin}=K_{ENZout}$.

El **modelo 2**, describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con un modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante y la eliminación de primer orden inducible. En este modelo se considera un compartimento adicional, que mimetiza la evolución temporal de la actividad enzimática y el modelo E_{max} representa la función no lineal que incrementa la producción de actividad enzimática (factor de autoinducción de ciclofosfamida). Se asume que la actividad enzimática inicial es estacionaria, se produce mediante un mecanismo de orden 0 y se elimina mediante un proceso de primer orden (Figura IV.2). Este modelo corresponde a una modificación del modelo de E_{max} que fue testado por Hassan y Huitema (Hassan, 1999; Huitema, 2001), pero no fue reportado como modelo final.

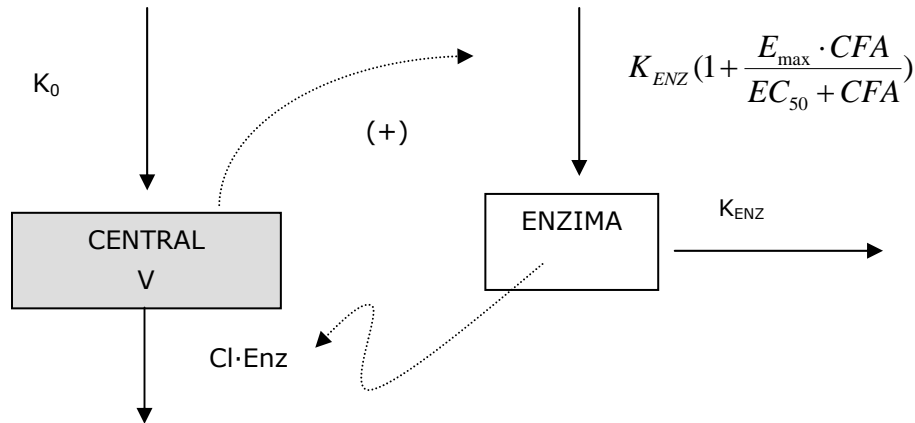


Figura IV. 2 MODELO 2. CFA: Modelo monocompartimental con administración en perfusión continua, con eliminación lineal de ciclofosfamida con autoinducción. ENZIMA: Modelo monocompartimental con formación enzimática de orden 0 e inducción no lineal por ciclofosfamida (modelo E_{max}) y eliminación enzimática lineal.

$$\frac{dCFA}{dt} = K_0 - \frac{Cl}{V} \cdot Enz \cdot CFA \quad \text{Ecuación IV. 5}$$

$$\frac{dEnz}{dt} = K_{ENZ} \left(1 + \frac{E_{max} \cdot CFA}{EC_{50} + CFA}\right) - K_{ENZ} \cdot Enz \quad \text{Ecuación IV. 6}$$

En las ecuaciones diferenciales IV.5 y IV.6, describen el intercambio de masas respecto al tiempo para cada uno de los compartimentos considerados. En esta ecuación CFA representa la concentración plasmática de ciclofosfamida y se expresa en $\mu\text{g/mL}$. K_0 es la constante de orden 0, Cl es el aclaramiento plasmático en L/h y V es el volumen de distribución aparente de ciclofosfamida en litros. Enz representa la actividad enzimática. K_{ENZ} representa la constante de producción y de eliminación de la actividad enzimática en h^{-1} . El modelo E_{max} representa la función no lineal que incrementa la producción de actividad enzimática (factor de autoinducción de ciclofosfamida). Donde E_{max} corresponde al efecto máximo de inducción y EC_{50}

corresponde a la concentración de ciclofosfamida que produce la mitad del efecto máximo de inducción.

En el **modelo 3**, describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con un modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante y la eliminación de primer orden inducible. En este modelo se considera un compartimento adicional, que mimetiza la evolución temporal de la actividad enzimática y su autoinducción por ciclofosfamida. Se asume que la actividad enzimática inicial es estacionaria, se produce mediante una velocidad de orden 0. Se prueba el modelo Huitema modificado, se considera únicamente la formación del enzima monocompartimental, sin tener en cuenta la inhibición de tiotepa ya que no se conoce la concentración de la misma en las pacientes (el modelo de Huitema asume que el enzima activo esta en equilibrio con el enzima inactivo y la tiotepa favorece el paso de enzima activo a inactivo) (Huitema, 2001) (Figura IV.3).

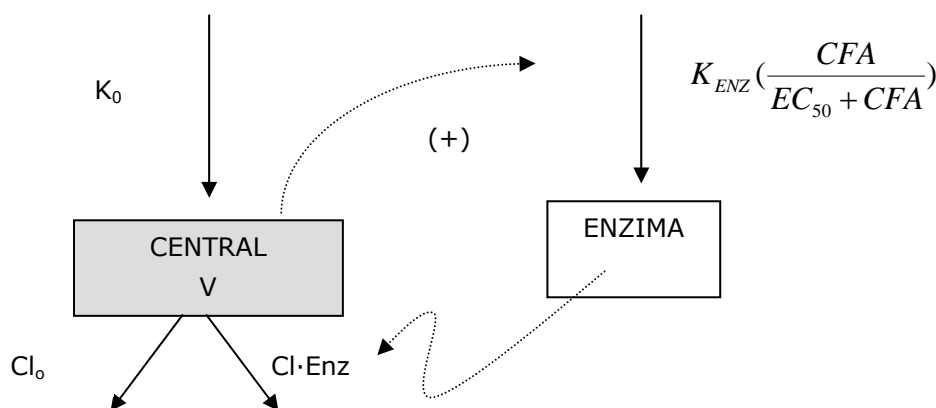


Figura IV. 3 MODELO 3. CFA: Modelo monocompartimental con administración en perfusión continua, con eliminación lineal de ciclofosfamida con autoinducción. ENZIMA: Modelo monocompartimental con formación enzimática de orden 0 e inducible por ciclofosfamida (modelo E_{max}).

$$\frac{dCFA}{dt} = K_0 - \frac{Cl}{V} \cdot Enz \cdot CFA - \frac{Cl_o}{V} \cdot CFA \quad \text{Ecuación IV. 7}$$

$$\frac{dEnz}{dt} = K_{ENZ} \left(\frac{CFA}{EC_{50} + CFA} \right) \quad \text{Ecuación IV. 8}$$

En las ecuaciones diferenciales IV.7. y IV.8., describen el intercambio de masas respecto al tiempo para cada uno de los compartimentos considerados. En esta ecuación CFA representa la concentración plasmática de ciclofosfamida y se expresa en µg/mL. K_0 es la constante de orden 0, Cl es el aclaramiento plasmático inducible en L/h y V es el volumen de distribución aparente de ciclofosfamida en litros. Cl_0 es el aclaramiento plasmático no inducible en L/h y Enz representa la actividad enzimática. K_{ENZ} representa la constante de producción de la actividad enzimática en h^{-1} . La inducción fue modelada con el mecanismo “on-off”. Este mecanismo “interruptor” es descrito mediante una función E_{max} . Antes del tratamiento, cuando la ciclofosfamida no esta presente y la inducción esta en “off” por tanto los niveles de enzima están en estado estacionario, al no conocer la cantidad real de enzima en su compartimento se considera valor 1 (fracción del valor basal igual a 100%). Cuando ciclofosfamida esta presente y la concentración es considerablemente mayor que la concentración de ciclofosfamida que produce la mitad del efecto máximo de inhibición (IC50), el resultado es la autoinducción máxima (E_{max}). La eliminación de la actividad enzimática después del tratamiento con ciclofosfamida no pudo ser cuantificable (Huitema, 2001).

En el **modelo 4**, describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con un modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante y la eliminación de primer orden inducible. En este modelo se considera un compartimento adicional, que mimetiza la evolución temporal de la actividad enzimática y su autoinducción por ciclofosfamida. Se asume que la actividad enzimática inicial es estacionaria, se produce mediante un mecanismo de orden 0 y se elimina mediante un proceso de primer orden (Figura IV.4).

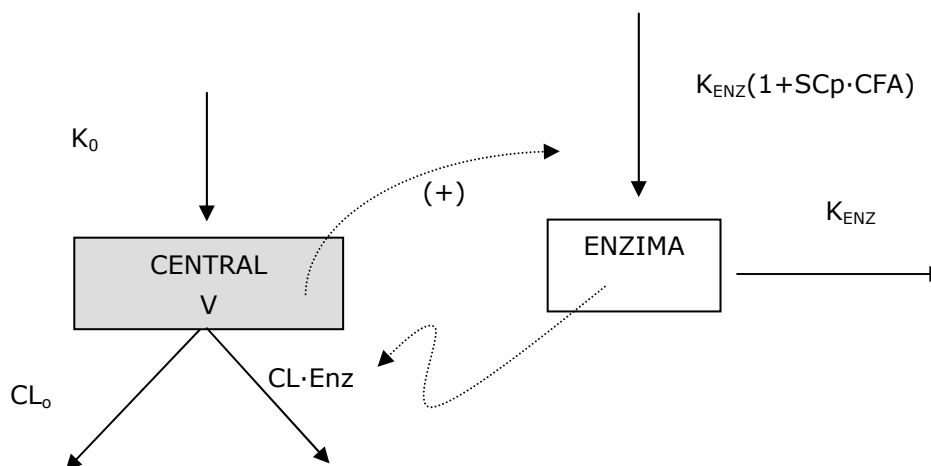


Figura IV. 4 MODELO 4. CFA: Modelo monocompartimental con administración en perfusión continua, con eliminación lineal de ciclofosfamida con autoinducción. ENZIMA: Modelo monocompartimental con formación enzimática de orden 0 e inducible por ciclofosfamida y eliminación enzimática lineal.

$$\frac{dCFA}{dt} = K_0 - \frac{Cl}{V} \cdot Enz \cdot CFA - \frac{Cl_0}{V} \cdot CFA \quad \text{Ecuación IV. 9}$$

$$\frac{dEnz}{dt} = K_{ENZ} (1 + SCp \cdot CFA) - K_{ENZ} \cdot Enz \quad \text{Ecuación IV. 10}$$

En las ecuaciones diferenciales IV.9. y IV.10., describen el intercambio de masas respecto al tiempo para cada uno de los compartimentos considerados. En esta ecuación CFA representa la concentración plasmática de ciclofosfamida y se expresa en mg/mL. K_0 es la constante de orden 0, Cl es el aclaramiento plasmático inducible en L/h y V es el volumen de distribución aparente de ciclofosfamida en L. Cl_0 es el aclaramiento plasmático no inducible en L/h. Enz representa la actividad enzimática. K_{ENZ} representa la constante de producción y de eliminación de la actividad enzimática en h^{-1} . SCp representa la pendiente de la función lineal que incrementa la producción de actividad enzimática (factor de autoinducción de ciclofosfamida). Este modelo es el modelo de Hassan modificado (Hassan, 1999), ya que Hassan modeliza la ciclofosfamida como bicompartimental. No se dispone de información suficiente en la

fase terminal de eliminación de ciclofosfamida para modelizar la ciclofosfamida como bicompartimental.

El **modelo 5**, describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con un modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante. La eliminación de primer orden inducible puede ser diferente teniendo en cuenta 2 subpoblaciones con inductores rápidos y lentos. En este modelo se considera un compartimento adicional, que mimetiza la evolución temporal de la actividad enzimática y su autoinducción por ciclofosfamida. Se asume que la actividad enzimática inicial es estacionaria, se produce mediante un mecanismo de orden 0 y se elimina mediante un proceso de primer orden (Figura IV.5).

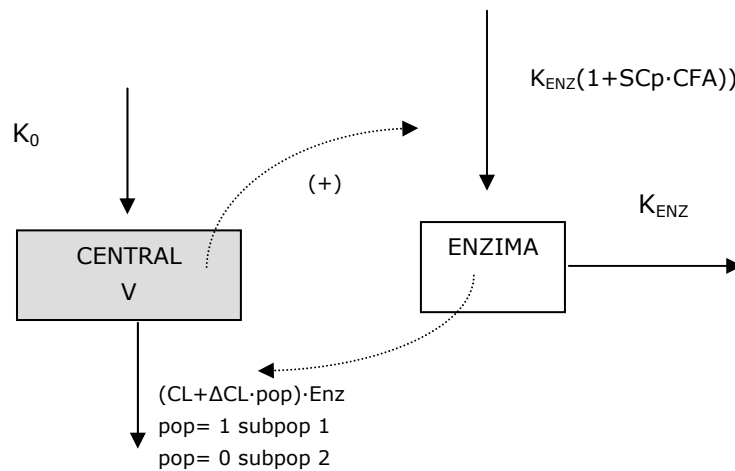


Figura IV. 5 MODELO 5. CFA: Modelo monocompartimental con administración en perfusión continua, con eliminación lineal de ciclofosfamida con autoinducción dos subpoblaciones. ENZIMA: Modelo monocompartimental con formación enzimática de orden 0 e inducible por ciclofosfamida y eliminación enzimática lineal.

Las ecuaciones diferenciales IV.11. y IV.12., describen el intercambio de masas respecto al tiempo para cada uno de los compartimentos considerados. En esta ecuación CFA representa la concentración plasmática de ciclofosfamida y se expresa en $\mu\text{g/mL}$. K_0 es la constante de orden 0, Cl corresponde al aclaramiento plasmático,

ΔCl es el incremento de aclaramiento en L/h, "pop" clasifica las subpoblaciones de manera que para metabolizadores lentos $pop = 0$ por lo tanto no hay incremento del aclaramiento y para los metabolizadores rápidos $pop = 1$ por lo tanto el aclaramiento se incrementa ($Cl = Cl + \Delta Cl$). V es el volumen de distribución aparente de ciclofosfamida en L. Enz representa la actividad enzimática. K_{ENZ} representa la constante de producción y de eliminación de la actividad enzimática. SCp representa la pendiente de la función lineal que incrementa la producción de actividad enzimática para cada una de las subpoblaciones.

$$\frac{dCFA}{dt} = K_0 - \frac{Cl + \Delta Cl \cdot pop}{V} \cdot Enz \cdot CFA \quad \text{Ecuación IV. 11}$$

$$\frac{dEnz}{dt} = K_{ENZ} (1 + SCp \cdot CFA) - K_{ENZ} \cdot Enz \quad \text{Ecuación IV. 12}$$

IV.5.4. Desarrollo de los modelos farmacoestadísticos

El desarrollo del modelo se realizó mediante la aplicación simplificada del procedimiento general descrito por Mandema (1992). En primer lugar se selecciona el modelo farmacoestadístico. En segundo se procede a evaluar la influencia de diferentes covariables sobre cada uno de los parámetros farmacocinéticos del modelo.

IV.5.4.1. Selección del modelo farmacoestadístico

La concentración y el logaritmo de la concentración plasmática de ciclofosfamida de la población de estudio se utilizaron para caracterizar el modelo farmacoestadístico que describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida. Mediante el modelo no lineal de efectos mixtos a través de la regresión no lineal por mínimos cuadrados extendidos, con doble precisión estimación de primer orden (FO) y estimación de primer orden condicional con interacción (FOCEI), implementada en el software NONMEM (Versión V, nivel 1.0). Se utilizó la subrutina ADVAN6 de NONMEM

con el objetivo de poder utilizar las ecuaciones diferenciales (Beal, 1989; Beal, 1992). Este modelo asume que los parámetros farmacocinéticos individuales proceden aleatoriamente de una función de distribución de probabilidad, cuyos primeros dos primeros momentos estadísticos son directamente estimados del conjunto de concentraciones plasmáticas existentes en la muestra a estudio. Cuando el número de concentraciones plasmáticas por paciente es superior a 1, la regresión por mínimos cuadrados extendidos, implementada en NONMEM, puede estimar la variabilidad interindividual no explicada por los modelos de regresión basados en covariables predictoras y la variabilidad residual en las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida. Esta variabilidad es debida al error existente en las dosis administradas, la velocidad de administración, el tiempo de extracción de las concentraciones plasmáticas, la preparación de la muestra, la técnica analítica, e incluso el propio modelo farmacocinético seleccionado.

La magnitud de la variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos fue modelizada mediante el modelo de varianza exponencial. A modo de ejemplo se representa la ecuación del modelo de variabilidad interindividual para cualquier parámetro de los modelos: V el volumen de distribución, Cl aclaramiento plasmático, K_{ENZ} constante enzimática, E_{max} corresponde al efecto máximo de inducción y EC_{50} corresponde a la concentración de ciclofosfamida que produce la mitad del efecto máximo de inducción, SCp representa la pendiente de la función lineal que incrementa la producción de actividad enzimática o Cl_o el aclaramiento plasmático no inducible

$$P_j = P^* \cdot \exp(\eta_{P,j}) \quad \text{Ecuación IV. 13}$$

donde P_j es la estimación del parámetro del individuo j-ésimo realizada por el modelo de regresión, P^* representa el valor medio poblacional del parámetro y $\eta_{P,j}$ representa la diferencia entre el parámetro en el individuo j-ésimo y la media poblacional del parámetro y se asume que es una variable aleatoria independiente con media 0 y varianza ω^2 .

La magnitud de la variabilidad residual en las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida y se modelizó mediante un modelo de varianza exponencial (ecuación

IV.14). La magnitud de la variabilidad residual al utilizar los logaritmos de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida se modelizó mediante un modelo de varianza aditivo que equivale al modelo de varianza exponencial en escala lineal (ecuación IV.15).

$$C_{ij}^* = C_{ij} \cdot \exp(\varepsilon_{ij}) \quad \text{Ecuación IV. 14}$$

$$\ln C_{ij}^* = \ln C_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ecuación IV. 15}$$

donde C_{ij}^* es la i -ésima concentración de ciclofosfamida en el paciente j -ésimo, C_{ij} es la predicción de la concentración plasmática de ciclofosfamida realizada por el modelo farmacoestadístico y ε_{ij} representa la diferencia entre la i -ésima concentración de ciclofosfamida en el paciente j -ésimo y la predicción realizada por el modelo farmacoestadístico y se asume que es una variable aleatoria independiente con media 0 y varianza σ^2 . La magnitud de la variabilidad residual, σ , esta expresada, aproximadamente, como coeficiente de variación puesto que procede de un modelo de varianza exponencial.

Se obtuvieron las estimaciones bayesianas de los parámetros farmacocinéticos individuales mediante la opción POSTHOC del software NONMEM cuando fue utilizado el método de estimación FO.

El **modelo farmacoestadístico básico** de ciclofosfamida se describió mediante un modelo estructural basado en el modelo farmacocinético monocompartimental abierto con administración intravenosa a velocidad constante y eliminación de primer orden. A partir de este modelo se estableció las condiciones de referencia. Donde la selección de la utilización de la concentración o el logaritmo de la concentración plasmática de ciclofosfamida se realizo teniendo en cuenta el cambio de función mínima objetiva, errores estándar de estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y el análisis gráfico de la dispersión de los residuales ponderados frente a las predicciones. La selección del método de estimación, de primer orden (FO) o de primer orden condicional con interacción (FOCEI) teniendo en cuenta las diferencias en la variabilidad interindividual y residual, además de la precisión de los parámetros.

Un vez fijadas las condiciones de referencia con el modelo farmacostatístico básico, se desarrollan modelos más complejos. Estos modelos tienen en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV presenta un aspecto atípico ya que no se observa un estado estacionario estable. Además existen en la bibliografía datos sobre el comportamiento tiempo dependiente de ciclofosfamida.

En esta Memoria se aborda de una manera más fisiología el fenómeno de autoinducción mediante la existencia de un “compartimento del enzima”. Este se fundamenta en que la ciclofosfamida es un profármaco que es metabolizado vía hepática a través de diferentes microsomas del citocromo P-450. La inducción del citocromo P-450 es conocida por ser genéticamente regulable, así pues la variación en la incidencia de la autoinducción puede resultar de las diferencias en el genotipo (Nebert, 1986). Estos modelos son descritos en el apartado IV.5.3., incluyen parámetros farmacocinéticos adicionales con respecto al modelo farmacostatístico básico.

La **selección del modelo farmacostatístico final a partir del básico** se realiza mediante la integración de los siguientes criterios: cambio de la función mínima objetiva, error estándar de la estimación de los parámetros farmacocinéticos, correlaciones entre los distintos parámetros y dispersión de los residuales ponderados en función del tiempo (Beal, 1992). El cambio en la función mínima objetiva (ΔFMO) se evaluó para aplicar la prueba de razón de verosimilitud (RV). El ΔFMO representa un estadístico que es proporcional a menos dos veces el logaritmo neperiano de la verosimilitud de los datos (-2LL) y se distribuye asintóticamente como una distribución de χ^2 con tantos grados de libertad como número de parámetros añadidos al modelo (Sheiner, 1977; Beal, 1989). Siempre que los modelos al comparar sean anidados. De esta forma, se necesita un ΔFMO superior a 7.88 y 10.6 para alcanzar la significación estadística de $p < 0.005$ para la inclusión de 1 y 2 parámetros de efecto fijo o aleatorio, respectivamente cuando el método de estimación usado sea FO. En el caso de FOCE y FOCEI un valor menos conservativo de 3.84 debería ser considerado significativo (<0.05).

Sin embargo, para modelos no anidados ΔFMO no puede ser usado como test, en esta situación el criterio de Akaike puede ser usado (Akaike, 1974).

$$AIC = \text{Función mínima objetiva} + 2 \cdot \text{par} \quad \text{Ecuación IV. 16}$$

donde par= número total de parámetros en el modelo. El modelo con el AIC más bajo es el mejor.

Se realizó la detección de subpoblaciones de pacientes a través de parámetros de eliminación de ciclofosfamida. Para poder caracterizar las subpoblaciones se graficaron los histogramas de los valores de las variabilidades individuales de los parámetros para detectar una distribución bimodal que nos indicara la posible existencia de subpoblaciones con diferente autoinducción de la ciclofosfamida, metabolizadoras rápidas y lentas. Se utilizó la subrutina \$MIX (modelo mixture) que permite caracterizar a priori diferentes subpoblaciones para uno o más parámetros en el modelo (Frame, 2003). El modelo mixture asume que en la población existen dos o más subpoblaciones con diferentes medias y puede que diferente variabilidad. Cuando se ajusta con el "mixture model" además de la media y la variabilidad también estima la proporción de pacientes que pertenece a cada subpoblación para un parámetro.

Una vez se disponía del modelo farmacoestadístico final. Se realizó un análisis exploratorio de las covariables.

IV.5.4.2. Exploración de las covariables.

Para el estudio de las covariables al fichero de datos se le incorporaron las distintas covariables recogidas de la historia clínica de cada paciente. Así se recogieron las características antropométricas: edad (años), peso (kg), talla (cm), superficie corporal (m^2) calculada mediante el nomograma de Du Bois y Du Bois; los datos bioquímicos: glucosa sérica (mg/dL), urea (mg/dL), ácido úrico (mg/dL), creatinina sérica (mg/dL), proteínas totales (g/dL) y albúmina (g/dL), colesterol total (mg/dL) y triglicéridos (mg/dL), enzimas hepáticas (UI/L): aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (FA). También se recogieron los datos

hematológicos: hemoglobina (g/dL), plaquetas (U/mm³), fracción de eyección ventricular (Anexo 9).

La influencia de las variables predictoras de carácter continuo y categórico sobre los parámetros farmacocinéticos de ciclofosfamida se analizó mediante el análisis exploratorio de los datos obtenidos en la muestra de pacientes a estudio. La selección del modelo de covariables examina la adición de las diferentes covariables disponibles en el modelo estructural básico mediante la utilización de modelos generalizados aditivos ("Generalised Additive Modeling, GAM").

Para encontrar que covariables pueden ser susceptibles de ser incluidas en el modelo se dispone principalmente de:

- La distribución de los valores individuales de variabilidad interindividual (ETA) vs las covariables identificadas como posible influencia de variables predictoras
- GAM ("Generalised Additive Modelling"): identifica las covariables susceptibles de ser incluidas en el modelo (Mandema, 1992)

El GAM es similar a la regresión lineal múltiple pero no estrictamente lineal.

El GAM se ejecuta con el programa Xpose31 (S-PLUS, versión 6), asumiendo la siguiente función general:

$$p_i = \alpha + \int_1(z_{i1}) + \int_2(z_{i2}) + \dots + \int_n(z_{in}) \quad \text{Ecuación IV. 17}$$

Donde p_i es el i -ésimo valor de los parámetros individuales, α es la constante de intersección, z_{in} es el i -ésimo valor de los individuales del n -ésimo covariable y $f(C)$ s son funciones lineales o no lineales que relacionan la influencia de la covariables con los parámetros.

El proceso de identificación de covariables significativas mediante el GAM, se realiza mediante un proceso por etapas. En este proceso, se examinan distintas combinaciones de diferentes modelos con las covariables. La discriminación entre modelos se lleva a cabo mediante la comparación del criterio de información de Akaike (Akaike information criterion, AIC). La búsqueda por etapas se lleva a cabo de acuerdo con una jerarquía definida de posibles relaciones funcionales (una para cada covariable), las cuales por defecto son: la covariable no es incluida en el modelo, la covariable es incluida de forma lineal en el modelo y la covariable es incluida de forma no lineal. En cada paso y para cada covariable, se aplican los distintos modelos dentro de la jerarquía establecida y el modelo que disminuye más el AIC es retenido en el

siguiente paso. La búsqueda termina cuando ningún otro modelo puede disminuir más el valor de AIC (Jonsson, 1999).

Mediante este proceso, cada vez que se ejecuta el GAM sobre un parámetro farmacocinético, se analiza el posible efecto de las covariables sobre dicho parámetro. Antes de utilizar estos modelos es conveniente examinar las correlaciones entre covariables. Si algunas covariables están altamente correlacionadas, como por ejemplo el peso y la altura, se tenderá a utilizar la covariable con mayor significado clínico.

La Xpose31 es una interfase que se ejecuta bajo el programa estadístico S-PLUS y permite realizar el análisis exploratorio de los datos en estudio.

El programa Xpose toma las tablas de salida (patab, cotab, catab) del NONMEM y mediante sistema de menús, se puede seleccionar la creación de diferentes tipos de análisis y gráficas. Entre ellos destacar el GAM, que permite evaluar las covariables relevantes susceptibles de ser incluidas en el modelo poblacional y gráficas que ayudan en el desarrollo del modelo de covariables.

IV.5.4.3. Efecto de la concentración de ciclofosfamida sobre su autoinducción.

Con el fin de comprobar el efecto de la concentración de ciclofosfamida sobre su autoinducción con el modelo final, se comparó sobre un individuo tipo, el efecto de las diferentes dosis sobre la cinética de ciclofosfamida. Se simuló (en base a los parámetros obtenidos en el modelo final) el perfil cinético de un individuo tipo administrado con una perfusión continua durante 96 horas en un rango de dosis desde 2000 mg a 20000 mg.

Se realizó el análisis no compartimental para los pares de valores concentración tiempo obtenidos mediante el programa WinNonlin (versión 3.3.). Con los parámetros obtenidos, el área bajo la curva (AUC y AUC_t) y la concentración máxima obtenida (C_{max}) en el rango de dosis se estudio la linealidad mediante la regresión potencial aplicando la siguiente ecuación (Smith, 2000):

$$\text{Parámetro} = a \cdot \text{Dose}^b \quad \text{Ecuación IV. 18}$$

Consiste en realizar la regresión para la estimación del coeficiente (a) y el exponente (b) con su intervalo de confianza del 95% con el programa SAS Guide Enterprise (versión 4.1).

IV.5.4.4. Validación del modelo

La validación del modelo poblacional puede realizarse mediante una validación interna o externa. La validación del modelo poblacional puede ser analizada mediante la medida de las predicciones que provienen de los mismos datos utilizados para construir el modelo (exploración interna) o de datos diferentes (exploración externa).

En la presente memoria ha sido utilizada la validación interna, hace referencia a diferentes técnicas de analizar los datos utilizados para construir el modelo. La comprobación visual predictiva (“Visual Predictive Check”) es una de estas técnicas donde se simulan 1000 pacientes utilizando las estimas del modelo final y se compara la distribución de los valores observados con los simulados. Se representa gráficamente la mediana y los intervalos de predicción del 90%. De manera que el modelo puede razonablemente predecir las concentraciones en el tiempo, si el 90% del intervalo de confianza cubre las concentraciones observadas y las observaciones deberían estar distribuidas alrededor del perfil típico (Nick y Mats, 2008).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Pacientes y Tratamiento Farmacoterapéutico

La presente Memoria se ha realizado con una muestra de 52 pacientes, mujeres, diagnosticadas de cáncer de mama de alto riesgo, que han sido tratadas con un régimen de quimioterapia a altas dosis (STAMP-V) y posterior rescate con células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica.

De estas 52 pacientes, 46 pertenecen al Hospital Clínico Universitario y 6 al Hospital Universitario Dr Peset de Valencia. Aunque el tamaño inicial de la muestra era de 60 pacientes, finalmente se decidió excluir del estudio a 8 pacientes por no cumplir los criterios de selección predefinidos.

Las características antropométricas de los pacientes estudiados se encuentran resumidas en la tabla V.1. y de forma detallada en el Anexo 4. La aplicación de las

pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks establece que tanto la edad, como el peso, la talla y la superficie corporal, presentan distribuciones de probabilidad que no difieren significativamente de una distribución normal ($p > 0.05$).

Tabla V. 1 Estadística descriptiva de las características antropométricas de las pacientes.

Población	Media	Desviación estándar	CV(%)	Ámbito
Edad (años)	46.17	9.17	19.86	29.00 – 62.00
Peso (kg)	69.20	11.81	17.07	45.50 - 99.30
Talla (cm)	157.82	6.08	3.85	148.00 – 181.00
SC (m ²)	1.71	0.14	8.05	1.37 - 2.05

SC: superficie corporal; CV: Coeficiente de variación.

En la figura V.1. Se muestran los histogramas de estas cuatro variables antropométricas.

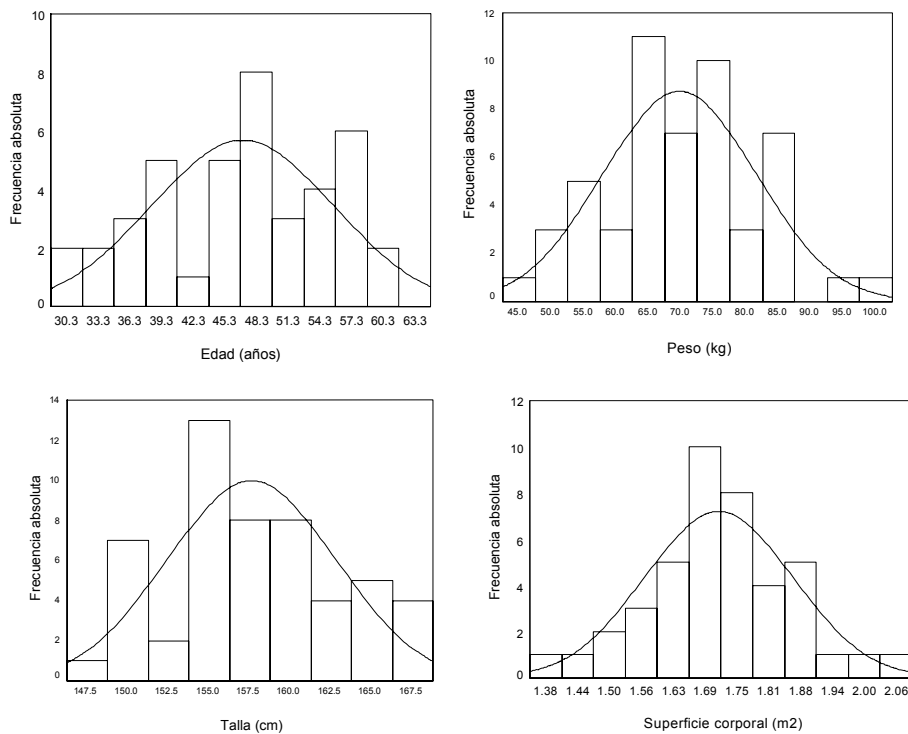


Figura V. 1 Histogramas de las variables antropométricas: edad, peso, talla, superficie corporal, respectivamente.

En la figura V.2 se muestra la distribución de frecuencias relativas referentes al diagnóstico de las pacientes, con carcinoma de mama de alto riesgo, incluidas en este estudio. El diagnóstico individual de cada una de las pacientes estudiadas se encuentra en el Anexo 5. Así, se distinguen los pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de mama en estadio II y III con más de 10 ganglios axilares afectados tras cirugía reglada sin resto tumoral (59.6%), los pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de mama en estadio II y III con más de 4 ganglios axilares afectados tras quimioterapia neoadyuvante (28.8%) y los pacientes con carcinoma inflamatorio de mama (11.5%).

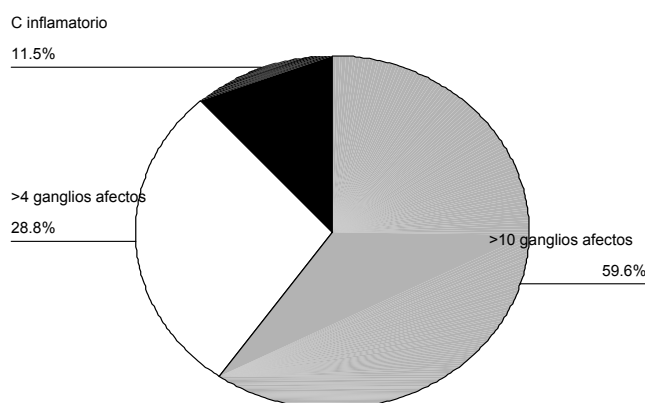


Figura V. 2 Diagrama de sectores de la frecuencia relativa del diagnóstico del cáncer de mama.

Durante el ingreso hospitalario requerido para la administración de quimioterapia a altas dosis en estas pacientes se originaron un total de 943 estancias. La mediana de la estancia fue de 22 días por paciente. Ninguna paciente fue dada de alta antes de transcurrir 18 días desde su ingreso y en una paciente la estancia se prolongó durante 54 días debido a la lenta recuperación de la plaquetopenia ocasionada. En la tabla V.2., se muestra la estadística descriptiva (media y desviación estándar) de los parámetros bioquímicos monitorizados en la muestra de pacientes estudiadas a lo

largo del ingreso hospitalario: ácido úrico, ALAT, albúmina, ASAT, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, creatinina sérica, fosfatasa alcalina, glucosa, γ -glutamyl transferasa, lactato deshidrogenasa, proteínas totales y urea.

Tabla V. 2 Evolución de los parámetros bioquímicos de los pacientes durante su ingreso. Los resultados se presentan como media (desviación estándar).

	Ingreso	Fin CT	RCPH	Alta
Acido úrico (mg/dL)	4.2 (1.1)	2.9 (0.7)	2.3 (0.7)	2.2 (1.3)
ALAT (UI)	32.3 (28.1)	39.3 (45.0)	80.0 (57.0)	17.7 (28.0)
Albúmina (g/dL)	4.2 (0.4)	3.8 (0.7)	4.6 (0.3)	4.5 (0.6)
ASAT (UI)	20.2 (15.3)	22.2(21.6)	51.4 (30.0)	43.7 (83.0)
Bilirrubina directa (mg/Dl)	0.15 (0.08)	0.19 (0.13)	0.16 (0.07)	0.178 (0.48)
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	0.30 (0.12)	0.41 (0.14)	0.40 (0.30)	0.37 (0.30)
Creatinina sérica (mg/dL)	0.9 (1.0)	0.7 (0.13)	0.7 (0.2)	0.7 (0.2)
Fosfatasa alcalina (UI)	148 (139)	136 (87)	226 (444)	311 (307)
Glucosa (mg/dL)	114 (35)	119 (48)	116(48.0)	107 (29)
γ-Glutamyl transferasa (UI)	24.4 (19.8)	29.6 (31.4)	62.5 (50.0)	85.6 (62.7)
Lactato deshidrogenasa (UI)	226 (107)	237 (104)	834 (651)	300 (83)
Proteínas totales (g/dL)	6.7 (0.6)	6.2 (0.6)	6.6 (0.63)	6.6 (0.9)
Urea (mg/dL)	26.9 (7.1)	23.9 (8.0)	32.0 (12.0)	38.09 (25.3)

CT: quimioterapia; RCPH: reinfusión de células precursoras hematopoyéticas.

Estos mismos estadísticos se muestran en la tabla V.3 para los parámetros hematológicos: recuento de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, fibrinógeno y hemoglobina. La evolución temporal de estos parámetros se describe mediante cuatro cortes realizados al ingreso hospitalario (día -7), tras la finalización de la quimioterapia a altas dosis (día -4), en la reinfusión de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica (día 0) y al alta hospitalaria de la paciente.

La comparación de las medias de los parámetros bioquímicos y hematológicos al ingreso y al alta hospitalaria evidenció diferencias estadísticamente significativas para las plaquetas y la hemoglobina, posiblemente debido a que la recuperación de estos parámetros hasta los niveles previos al tratamiento con quimioterapia a altas dosis todavía no se ha alcanzado en el momento del alta hospitalaria. Asimismo, se evidenció un incremento significativo de parámetros de funcionalidad hepática como la fosfatasa alcalina, la γ -glutamil transferasa y el fibrinógeno, atribuible a la toxicidad hepática secundaria a la administración del tratamiento antineoplásico. La disminución del ácido úrico respecto a los valores al ingreso hospitalario se debe a la administración mantenida del alopurinol durante el ingreso.

Tabla V. 3 Evolución de los parámetros hematológicos de los pacientes durante su ingreso. Los resultados se presentan como media (desviación estándar).

	Ingreso	Fin CT	RCPH	Alta
Leucocitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5.4 (3.4)	5.8 (2.4)	1.0 (0.7)	5.1 (4.5)
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	4.5 (3.1)	5.7 (2.6)	0.9 (0.7)	4.9 (3.8)
Linfocitos ($10^3/\text{mm}^3$)	1.2 (0.6)	0.5 (0.98)	0.26 (0.1)	0.6 (0.8)
Monocitos ($/\text{mm}^3$)	527(327)	372 (234)	9 (27)	534 (391)
Eosinófilos ($/\text{mm}^3$)	161(161)	35 (73)	1 (2)	21(54)
Basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	31.3 (42.9)	6 (17)	4 (16)	17.7 (29)
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	212 (109)	194 (96)	129 (66)	216 (14)
Tiempo de protrombina (seg)	15.1 (18.6)	12.1 (0.7)	11.2 (0.5)	12.0 (0.6)
Tiempo de tromboplastina parcial activada (seg)	40.0(42.0)	31.4(10)	32.9 (9.6)	65 (57)
Fibrinógeno	3.1 (0.6)	2.7 (0.95)	3.2 (0.8)	5.7 (2.0)
Hemoglobina (g/dL)	11.1 (1.3)	10.1 (1.0)	10.4 (1.1)	9.2 (1.3)

CT: quimioterapia; RCPH: reinfusión de células precursoras hematopoyéticas.

V.2. Técnica Analítica

Con el método cromatográfico puesto a punto para determinar ciclofosfamida en muestras biológicas los tiempos de retención de la ciclofosfamida e ifosfamida fueron 11.64 min y 12.81 min, respectivamente. En la *figura V.3*, se muestran los cromatogramas correspondientes a las concentraciones plasmáticas de 5 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

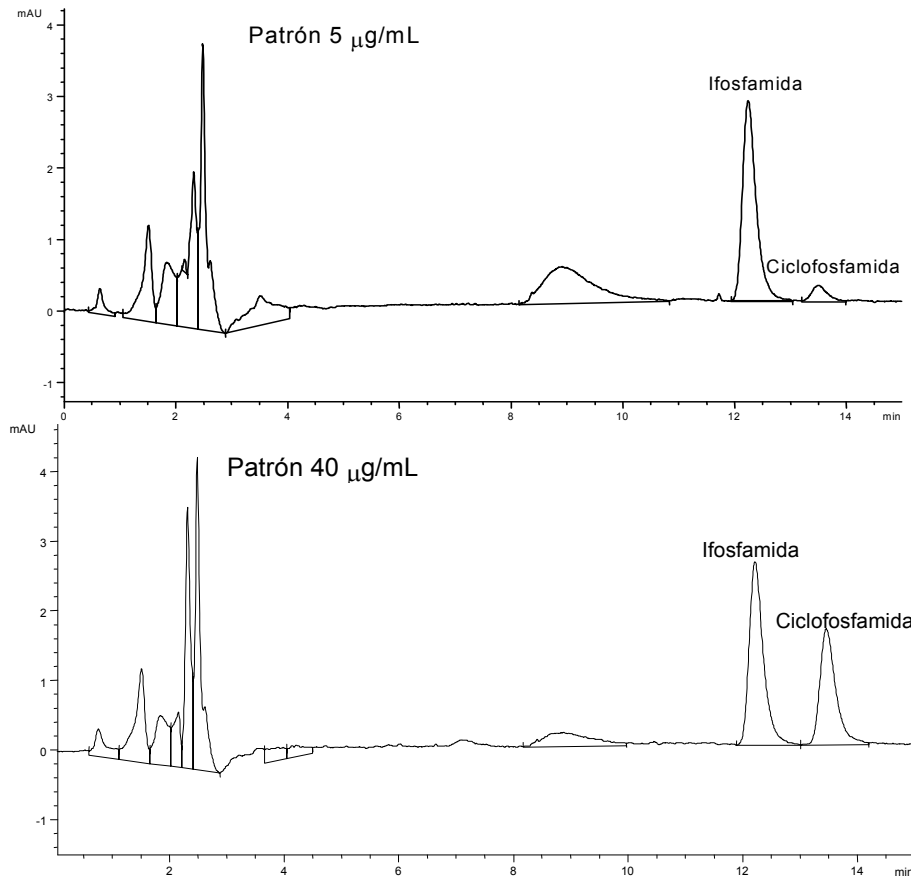


Figura V. 3 Cromatogramas correspondientes a las concentraciones plasmáticas de 5 y 40 µg/mL de ciclofosfamida.

V.3. Análisis Farmacocinético

El cumplimiento del diseño experimental se extrae de la información recogida en las tablas V.4. y V.5 donde se puede ver la estadística descriptiva de los tiempos de muestreo y de las concentraciones plasmáticas.

Tabla V. 4 Tiempo de muestreo de ciclofosfamida.

Tiempo de muestreo (h)				
Predefinido	N	Media (DE)	CV%	IC 95%
6	35	6.0 (1.0)	16.7	5.8 – 6.2
24	59	22.2 (3.8)	17.1	21.5 – 22.9
48	55	47.3(4.4)	9.3	46.5 - 48.2
72	45	72.1(2.2)	3.1	71.6 - 72.5
96	77	95.4 (1.6)	1.7	95.1 - 95.6
98	27	98.3(0.6)	0.6	98.1 - 98.4
100	16	101.2 (1.8)	1.8	100.5 - 101.8

DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; IC: Intervalo de confianza.

Tabla V. 5 Concentración plasmática de ciclofosfamida.

Concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$)				
Tiempo Predefinido(h)	N	Media (DE)	CV %	IC 95%
6	35	20.6 (8.7)	42.2	18.5 – 22.7
24	59	39.2 (12.5)	31.9	36.9 – 41.5
48	55	38.6 (12.8)	33.2	36.2 – 41.0
72	45	34.6(10.9)	31.5	32.3 – 36.8
96	77	29.2 (9.5)	32.5	27.7 – 30.7
98	27	26.1 (11.7)	44.8	22.8 – 29.3
100	16	24.2 (13.6)	56.2	19.4 – 29.1

DE: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; IC: Intervalo de confianza.

El diseño del estudio farmacocinético de ciclofosfamida ha supuesto la monitorización de 314 concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida correspondientes a 52 pacientes (6.04 muestras por paciente), que ocasionaron 622 determinaciones, es decir, en promedio cada muestra se replicó 1.98 veces. En el 38.5% de los pacientes se tomaron 7 muestras, 6, 5 y 4 muestras fueron tomadas en el 34.6%, 9.6% y 17.3% de los pacientes, respectivamente. En 82.7% de pacientes

fueron tomadas de 5 o más muestras. Los valores individuales de los tiempos de extracción de las muestras y de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida se muestran en el Anexo 6.

Los coeficientes de variación (CV%) de los tiempo de muestreo de ciclofosfamida fueron más elevados durante la primeras 48 horas, siendo para 6, 24 y 48 horas de 16.7, 17.1 y 9.3 %, respectivamente. A partir de las 72 h los coeficientes de variación son inferiores, para 72, 96, 98 y 100 horas de 3.1, 1.7, 0.6 y 1.8 %, respectivamente.

Los coeficientes de variación (CV%) de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida fueron por debajo del 50 % excepto para las 100 h donde el valor fue 56.2%. A los demás tiempos el rango de los coeficientes de variación de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida fue de 31.5 a 44.8 %.

El número de pacientes y el número de muestras tomadas fueron las suficientes teniendo en cuenta el diseño experimental previo donde, el diseño con 50 pacientes y cinco concentraciones plasmáticas por paciente caracteriza los parámetros con suficiente exactitud y precisión. Queda demostrado que un estudio de simulación previo al experimental, facilita su diseño y puede incrementar significativamente la eficacia de la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales (Pérez-Ruixo, 1998).

Se han considerado diferentes intervalos de tiempo alrededor de cada horario de extracción, con el fin de poder estimar los valores medios de las concentraciones plasmáticas asociadas a cada tiempo de muestreo.

En la Figura V.4 se representa la media y los intervalos de confianza del 95% (IC95%) de las concentraciones plasmáticas y de los tiempos de muestreo correspondientes a las tablas V.4. y V.5. En la figura se puede observar la disminución de las concentraciones plasmáticas. En el Anexo 7, se puede observar la relación concentración plasmática tiempo para cada una de las pacientes.

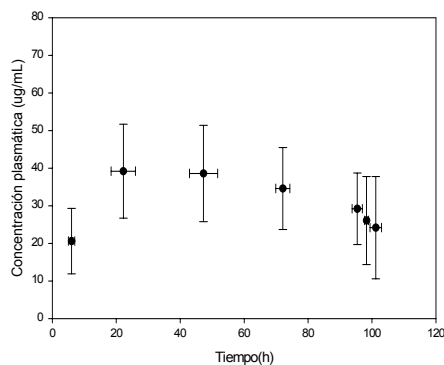


Figura V. 4 Media e intervalo de confianza del 95% de las concentraciones plasmáticas y de los tiempos de muestreo.

El **análisis farmacocinético** de ciclofosfamida ha sido posible realizarlo, sin grandes sesgos en la recogida de la información, por la elevada adherencia al protocolo de tratamiento establecido; este aspecto se resalta por la dificultad inherente a este tipo de estudios, en el ámbito asistencial y también por tratarse de una estrategia de monitorización de ciclofosfamida compleja que se ha incorporado a la práctica del hospital de forma voluntaria. No obstante, la variabilidad en los tiempos reales a los que se realizaron las extracciones de muestras de sangre, ponen de manifiesto como una importante fuente de la variabilidad residual en el modelo farmacostatístico (Schumacher, 1985) (tabla V.4) y la variabilidad obtenida en los valores medios de concentraciones plasmáticas obtenidos para los siete tiempos de muestreo (tabla V.5) para ciclofosfamida. Además, la exactitud y la precisión de algunos parámetros farmacocinéticos pueden verse modificada. Es decir, la información que aportaran las concentraciones plasmáticas extraídas alrededor de las 6 y las 100 horas desde el inicio de la perfusión es menor de la establecida por cuanto que estos dos tiempos de monitorización son los más afectados ante la falta de adherencia al protocolo establecido. Por estos motivos, la caracterización del volumen de distribución y su variabilidad puede verse sensiblemente afectada por la calidad de las muestras de las 6 horas postperfusión intravenosa.

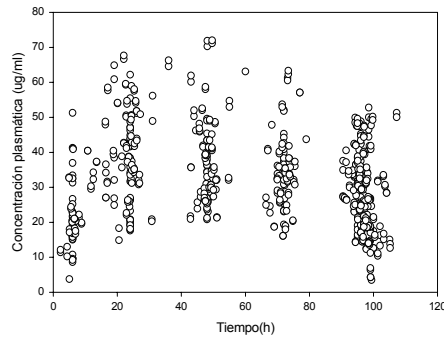


Figura V. 5 Concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida en función del tiempo

La curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV presenta un aspecto atípico ya que no se observa un estado estacionario estable; se observa un incremento de las concentraciones plasmáticas durante las primeras 24 horas, las concentraciones obtenidas a las 48 horas fueron menores que las obtenidas a las 24 horas, de modo que se observa una disminución de las concentraciones plasmáticas, aunque en valor medio son del mismo orden, las concentraciones medias fueron de 39.2 y 38.6 $\mu\text{g/mL}$. La concentración plasmática media a las 72h fue de 34.6 $\mu\text{g/mL}$, valor menor que el obtenido a las 48h. A 96 h, la concentración plasmática media fue 29.2 $\mu\text{g/mL}$, la concentración disminuye respecto al tiempo anterior (tabla V.5. y Figura V.5.). Este comportamiento no característico de las perfusiones continuas hace que en la mayoría de las pacientes adquieran una pendiente negativa. En este punto cabe plantearse ciertos supuestos respecto a la linealidad de los procesos cinéticos de la ciclofosfamida, en los que participa y en particular su aclaramiento en el tiempo.

Dado que la ciclofosfamida se distribuye en el agua corporal total, uniéndose en un 20% a proteínas plasmáticas, es previsible que esta unión no experimente cambios dosis dependientes. En cambio, sus metabolitos se unen en mayor porcentaje a las proteínas (67%), pero este extremo no ha sido considerado (Edwards, 1980; Moore, 1991).

En cuanto a la linealidad o no linealidad de los procesos cinéticos en los que participa la ciclofosfamida, señalar hasta un 20% de la dosis de ciclofosfamida se elimina de forma inalterada en la orina (Fasola, 1991; Bailey, 1991; Boddy, 2000), por lo que se asume que este proceso cinético es lineal, tal y como se considera en la bibliografía (Chen, 1995; Hassan, 1999). Solo 4% es excretado por la bilis (Dooley, 1982). La eliminación mayoritaria de ciclofosfamida ocurre por transformación metabólica. Aunque esto puede ocurrir predominantemente en el hígado, la activación o inactivación metabólica puede ocurrir en otros lugares del organismo, incluyendo los eritrocitos (Dockham, 1997) y el mismo tumor.

La ciclofosfamida es un profármaco que requiere una biotransformación para generar especies alcalinas activas. El paso de ciclofosfamida a 4hidroxiciclofosfamida, ha sido estudiado *in vitro* por Anderson L.W. y cols (Anderson, 1996), a las concentraciones plasmáticas alcanzadas cuando se administran 6 g/m^2 de ciclofosfamida, en pacientes que reciben en combinación con tiotepa, tal y como sucede en el esquema STAMP-V, confirmando que se trata de un proceso no saturable, es decir, serían necesarias concentraciones mucho más elevadas para su saturación. En este mismo sentido, Chen y Cols (Chen, 1995) exponen diferentes razones en el marco de la disposición de ciclofosfamida administrada a altas dosis, que permiten asumir como el proceso de eliminación no puede no parecer saturable a las dosis convencionales. No obstante en estas condiciones Grochow, (Grochow, 1983), Chang (Chang, 1993) y cols detectaron cinética saturable en algunos pacientes que recibían dosis de 1 g/m^2 de ciclofosfamida. Esta situación también puede presentarse durante la administración de inductores e inhibidores enzimáticos ya que pueden alterar la cinética de ciclofosfamida y por ello su respuesta terapéutica o tóxica (Ayash, 1992; Bagley, 1973).

Las concentraciones plasmáticas obtenidas (tabla V.5.) confirman que no parecen existir procesos cinéticos saturados. Además, incluso si la ciclofosfamida tuviera eliminación saturable, este efecto sería perceptible sólo en la fase inicial de la perfusión intravenosa debido a que posteriormente se solaparía con los cambios más grandes, causados por la inducción (Hassan, 1999).

Con relación a los procesos de metabolización de ciclofosfamida, varios estudios clínicos han observado el incremento del aclaramiento de ciclofosfamida, disminución de su semivida biológica y área bajo la curva (AUC), tras repetidas administraciones, debido a que ciclofosfamida induce su propio metabolismo (Kritz, 1993; Graham, 1983; Sladek, 1984; D'Inacalci, 1979). Esta disminución de la concentración de ciclofosfamida también se observa en los pacientes incluidos en la presente Memoria, en la figuras V.4. y V.5.

Yule y cols describen una alteración del metabolismo de ciclofosfamida al incrementar el tiempo de perfusión de ciclofosfamida y apuntan al hecho como ventaja terapéutica potencial (Yule, 2001). Esto es explicable mediante una cinética tiempo dependiente (autoinducción) donde hay un cambio gradual del aclaramiento de ciclofosfamida en el tiempo después de un periodo de latencia (Chen, 1995; Tesis Doctoral Pérez-Ruixo, 1999). En ambos casos se intenta explicar el cambio producido en la concentración de ciclofosfamida mediante un mecanismo no fisiológico en el cambio del aclaramiento, sin indagar en cual es el proceso responsable.

En esta Memoria se aborda de una manera más fisiología el fenómeno de autoinducción mediante la existencia de un "compartimento del enzima". Este se fundamenta, la ciclofosfamida es un profármaco que es metabolizado vía hepática a través de diferentes microsomas del citocromo P-450. La inducción del citocromo P-450 es conocida por ser genéticamente regulable, así pues la variación en la incidencia de la autoinducción puede resultar de los diferencias en el genotipo (Nebert, 1986).

La "enzima" responsable es considerada como monocompartimental con formación enzimática a velocidad constante (orden cero) y desaparición del organismo según una cinética de orden uno. En condiciones basales, en este caso pacientes sin ciclofosfamida (tiempo 0, predosis), se asume que la cantidad de enzima se encuentra en estado estacionario (fisiológico) y no cambia con el tiempo, es decir, las velocidades de entrada y salida del compartimento del enzima son iguales. Al no conocer la cantidad real de enzima en su compartimento se considera valor 1 (fracción del valor basal igual a 100%); consecuentemente, la constante de formación (K_{ENZIN}) se iguala al

producto constante de eliminación enzimática (K_{ENZout}) por la cantidad de enzima (Enz basal).

Desde el momento en que se inicia la administración de ciclofosfamida se rompe el equilibrio anterior porque se supone que se incrementa la constante de formación del enzima, pudiendo ser este incremento lineal o no lineal. Como consecuencia del mismo la cantidad de enzima cambia respecto a su valor inicial (basal) actuando como un compartimento del enzima y aumentando la eliminación de ciclofosfamida. Este modelo es semejante en su diseño y planteamiento a los “modelos de efecto indirecto” establecidos (Hassan, 1999; Huitema, 2000b, E. de Jonge, 2004b; E de Jonge, 2005a; E de Jonge, 2005b). Este diseño es la base de desarrollo de los diferentes modelos estructurales descritos en la presente Memoria.

Las pacientes han recibido quimioterapia a altas dosis basada en el esquema STAMP-V que consta de la administración intravenosa de ciclofosfamida $1.5 \text{ g/m}^2/\text{día}$, tiotepa $125 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ y carboplatino $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, en perfusión continua de 24 horas, durante cuatro días seguidos. No se ha podido tener en cuenta las interacciones posibles con la administración de los fármacos concomitantes. En especial aquellos fármacos que son metabolizados por el citocromo P-450 y en especial por los isoenzimas CYP2B6, CYP2C9 y CYP3A4 (Ren, 1997; Chang, 1993 y 1997; Hassan, 1999). Además el glutatión S transferasa (GST) y aldehído deshidrogenasa (ALDH). El polimorfismo de estas enzimas puede afectar a la farmacocinética de ciclofosfamida por lo tanto a su toxicidad o efectividad. En el estudio realizado por Ekhart, la evaluación de la variante de los alelos en CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP2A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 y ALDH3A1 no explica la variabilidad interindividual en la farmacocinética de la ciclofosfamida y 4hidroxiciclofosfamida, probablemente no son la causa de la variabilidad en la toxicidad observada (Ekhart, 2008a). Es conocida la interacción de ciclofosfamida y tiotepa utilizadas en este esquema, sin embargo no se pudo cuantificar esta interacción debido a no conocer los niveles plasmáticos de la misma. En 1996, la relevancia clínica de esta observación no había sido establecida; sin embargo, en un estudio en *in vitro* se vio que la tiotepa inhibía el metabolismo de ciclofosfamida (Anderson, 1996). En 2001, Huitema y cols estudian esta interacción *in vivo*, describiéndola como una fuerte y reversible inhibición

de la conversión de ciclofosfamida en 4hidroxiciclofosfamida. El valor IC₅₀, inhibición de la formación de 4hidroxiciclofosfamida por tiotepa fue 23µM. Este valor estaba en concordancia con el obtenido por Anderson, IC₅₀ entre 1 y 40 µM (Huitema, 2000b; Huitema, 2001). Esto prueba la hipótesis de la inhibición por tiotepa de los enzimas del citocromo P450 responsable de la metabolización de ciclofosfamida. La ciclofosfamida y tiotepa son ambos metabolizados por los enzimas de clase 2B y 2C (Chang, 1993 y 1997). La ciclofosfamida muestra una autoinducción que como consecuencia disminuye su exposición e incrementa la exposición de 4hidroxiciclofosfamida durante el tratamiento (Huitema, 1999; Ren, 1998). El AUC y C_{max} de 4hidroxiciclofosfamida fueron fuertemente reducidos cuando es administrada la tiotepa antes que ciclofosfamida, ya que estas pacientes reciben perfusiones de ciclofosfamida, carboplatino y tiotepa de aproximadamente de 1 hora durante 4 días, una infusión detrás de otra en un mismo día.

El incremento del AUC 4hidroxiciclofosfamida fue acompañado con una disminución del AUC de ciclofosfamida, ya que la mayor vía de eliminación de la ciclofosfamida es la formación de 4hidroxiciclofosfamida. Sin embargo, también es metabolizada a 2-decloroetilciclofosfamida. Una cantidad (17-29%) considerable de ciclofosfamida es eliminada por la orina de forma inalterada (Ren, 1998; Chen 1995). La eliminación vía 2-decloroetilciclofosfamida es aproximadamente del 5 % (Ren, 1998; Busse, 1999). Chen y cols no han encontrado una diferencia significativa en la eliminación de ciclofosfamida inalterada en la orina cuando esta combinada con tiotepa (Chen, 1995; Huitema, 2001). Sin embargo, Busse y Huitema han encontrado un incremento del aclaramiento renal (ciclofosfamida inalterada) y la formación de 2-decloroetilciclofosfamida en tratamientos con altas dosis de ciclofosfamida en comparación con dosis convencionales (Busse, 1999, Huitema, 2000). Tanto ciclofosfamida como 2-decloroetilciclofosfamida no tiene actividad antitumoral. Recientemente, Ekhart estudió la alteración de la farmacocinética de ciclofosfamida y tiotepa en pacientes con insuficiencia renal moderada; los resultados sugieren que no es necesario ajustar la dosis de ciclofosfamida en estos pacientes. Sin embargo, hay que tener precaución con la tiotepa pues existe una correlación entre exposición y toxicidad (Ekhart, 2008b).

En suma, el estudio de Huitema mostró que la bioactivación de ciclofosfamida es fuertemente reducida por tiotepa tanto in vitro como en pacientes con cáncer. Para una perfusión de 24 horas se reduce aproximadamente 3 veces la semivida de ciclofosfamida. En la presente Memoria al no poder cuantificar la inhibición de tiotepa en combinación con ciclofosfamida se intentara modelar esta interacción mediante el compartimento enzima.

En esta Memoria se plantean dos vías de eliminación para la ciclofosfamida, una vía de eliminación no inducida y otra vía inducida por la cantidad de enzima, esta inducción puede ser lineal pero también puede ser no lineal. Dentro de todos los modelos no lineales el modelo de efecto máximo es el utilizado en esta memoria. De esta manera se parte de modelos más sencillos, hasta llegar a modelos más complicados con inducción enzimática.

V.3.1. Desarrollo de los modelos farmacoestadísticos

Los resultados del análisis farmacocinético poblacional por el modelo no lineal de efectos mixtos considerando un modelo de varianza interindividual exponencial son descritos mediante los parámetros de efecto fijo, parámetros de efecto aleatorio, variabilidad interindividual e intraindividual con sus correspondientes errores estándares. También la función mínima objetiva (FMO) correspondiente a cada ajustado.

Se comprueban los gráficos más significativos para valorar la bondad de los ajustados para cada uno de los modelos descritos:

- La gráfica superior izquierda muestra las predicciones típicas de la población vs. la variable dependiente (concentración plasmática de ciclofosfamida observada). La línea de identidad de regresión cruza por el medio de los datos.
- La gráfica superior derecha muestra las predicciones individuales vs. la variable dependiente (concentración plasmática de ciclofosfamida observada). La línea de identidad cruza por el medio de los datos.
- La gráfica inferior izquierda muestra las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida respecto al tiempo con la superposición de la simulación de las

concentraciones plasmáticas asumiendo un individuo medio de la población utilizando el ajuste correspondiente.

-La gráfica inferior derecha muestra la cantidad de enzima respecto al tiempo con la superposición de la simulación de la cantidad de enzima asumiendo un individuo medio de la población utilizando el ajuste correspondiente (en modelos del 2 al 5).

Las gráficas de los residuales:

-La gráfica superior izquierda se muestra los residuales vs. la variable tiempo.

-La gráfica superior derecha se muestra los residuales ponderados vs. la variable tiempo. Esta gráfica da información acerca del modelo de error residual y permite diagnosticar el ajustado, indicando que el modelo estructural es adecuado al no mostrar tendencias relevantes.

-La gráfica central izquierda se muestra los residuales vs. las predicciones individuales.

-La gráfica central derecha se muestra los residuales ponderados vs. las predicciones individuales.

-La gráfica inferior izquierda se muestra los residuales ponderados individuales vs. la variable tiempo.

-La gráfica inferior derecha se muestra los residuales ponderados individuales vs. las predicciones individuales.

Se comprueban los histogramas de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros para valorar la distribución alrededor de cero.

Los diferentes ajustados de cada modelo se nombran con las siglas "EE" seguidos de número correlativo.

Los modelos estudiados con **método no lineal de efectos mixtos** (NONMEM) son el **modelo 1** con una vía de eliminación sin inducción enzimática (EE-1, EE-2 y EE-3), el **modelo 2** con inducción enzimática no lineal (EE-4 y EE-5), el **modelo 3** con inducción no lineal con el mecanismo "on-off" con una o dos vías de eliminación (EE-6, EE-7 y EE-8), el **modelo 4** con inducción lineal con una o dos vías de eliminación (EE-

9, EE-10, EE-11 y EE-12) y finalmente el **modelo 5** con inducción enzimática lineal teniendo en cuenta los metabolizadores rápidos y lentos, asumiendo dos subpoblaciones de aclaramiento (EE-13). Las estimas iniciales de los parámetros farmacocinéticos obtenidas son utilizadas para los tratamientos cinéticos posteriores.

El **modelo de varianza interindividual y residual** seleccionado para el análisis farmacocinético ha sido el exponencial. Esta decisión se basa en que es el que mejor describe los datos experimentales para la ciclofosfamida (Peck, 1992; Mandema, 1995; Rodríguez, 1996a).

El **método no lineal de efectos mixtos**, dada su amplia utilización en el campo de la farmacocinética poblacional, ha sido elegido para definir el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama.

V.3.1.1. Selección del modelo farmacoestadístico

El **modelo farmacoestadístico básico (modelo 1)**, que describe la evolución temporal de la concentración plasmática de ciclofosfamida mediante el modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante y eliminación de primer orden no inducida representado en la figura IV.1.

La magnitud de la variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos fue modelizada mediante el modelo exponencial.

Con este modelo se ha tratado de seleccionar las condiciones de referencia con respecto a las concentraciones o el logaritmo de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida, así como el método de estimación más adecuado primer orden (FO) o primer orden condicional con interacción (FOCEI).

Los parámetros obtenidos con el **modelo 1** ajustados EE-1, EE-2 y EE-3 son descritos en la tabla V.6. El ajustado EE-1 se realizó a partir de las concentraciones plasmáticas y el método de estimación FO. El ajustado EE-2 se realizó con el logaritmo de las concentraciones plasmáticas y el método de estimación FO. A partir de los resultados obtenidos en el ajustado EE-1 en comparación con EE-2, se decidió el

realizar la transformación logarítmica de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida por varias razones:

- Asimetría en residuales ponderados (WRES)
- La relación las predicciones a poblacional (PRED) vs concentraciones de ciclofosfamida (DV) muestra una desviación que no la muestra las predicciones individuales (IPRED) vs. DV. Esto indica que la media geométrica es una mejor medida de tendencia central cuando los datos tienen un desplazamiento (skewness) a la derecha (Carroll&Ruppert, 1998).
- La transformación logarítmica mejora las estimas de la matriz de omega. Además, hace que el análisis sea más estable y el tiempo de análisis es más corto en comparación con el análisis con las concentraciones no transformadas.

El ajustado EE-3 se realizó con el logaritmo de las concentraciones plasmáticas y el método de estimación FOCEI. Cuando fue comparado con el ajustado EE-2, se observó que la estimación FOCEI producía una disminución de la variabilidad interindividual, un incremento de la variabilidad residual y una mayor precisión en la estimación de estos parámetros, fundamentalmente cuando no existía interacción entre la variabilidad interindividual y la variabilidad residual. Estos resultados coinciden con las propiedades de los algoritmos utilizados (Beal, 1992).

Tabla V. 6 Parámetros farmacocinéticos estimados (error estándar) mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, con un modelo de varianza interindividual exponencial. **Modelo 1** sin inducción.

Parámetros	Modelo 1		
	EE-1(run11) ^a	EE-2(run12) ^{a, b}	EE-3(run13) ^{b, c}
CL(L/h)	2.90(0.115)	3.16(0.130)	3.05(0.097)
V (L)	17.3(1.67)	16.7(1.79)	18.2(1.26)
ω_{CL}(%)	26.4(12.4)	26.0(11.6)	25.8(3.00)
ω_V(%)	81.2(57.9)	60.5(34.6)	51.4(8.29)
σ_{CFA}(%)	26.9 (1.58)	50.7(2.15)	51.5(2.35)
FMO	1739.946	-361.667	-356.955
MPE (%)	9.60 (3.75)	0.530 (7.61)	0.695 (7.84)

^aFO.

^b Transformación logarítmica de las concentraciones plasmáticas de los parámetros.

^c FOCEI.

MPE: media del error de predicción (desviación estándar).

El **modelo 1** corresponde a los 3 ajustados EE-1, EE-2 y EE-3, con modelos de varianza interindividual y residual exponencial, donde se alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual del aclaramiento y del volumen de distribución estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) inferiores a los umbrales del 20% y 50%, respectivamente (Ette, 1993). Además, no existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales. Los modelos estructurales y las estimas de las variabilidades de los ajustados EE-1, EE-2 y EE-3 son consideradas exactos porque media de los errores de predicción (MPE) es menor al 15%. La precisión de los ajustes ha sido determinada como la desviación estándar de la media de los errores de predicción (Sheiner, 1981b; Fadiran, 2000). Los

valores de la variabilidad interindividual de los parámetros se distribuyen alrededor de cero (Figuras V. 12).

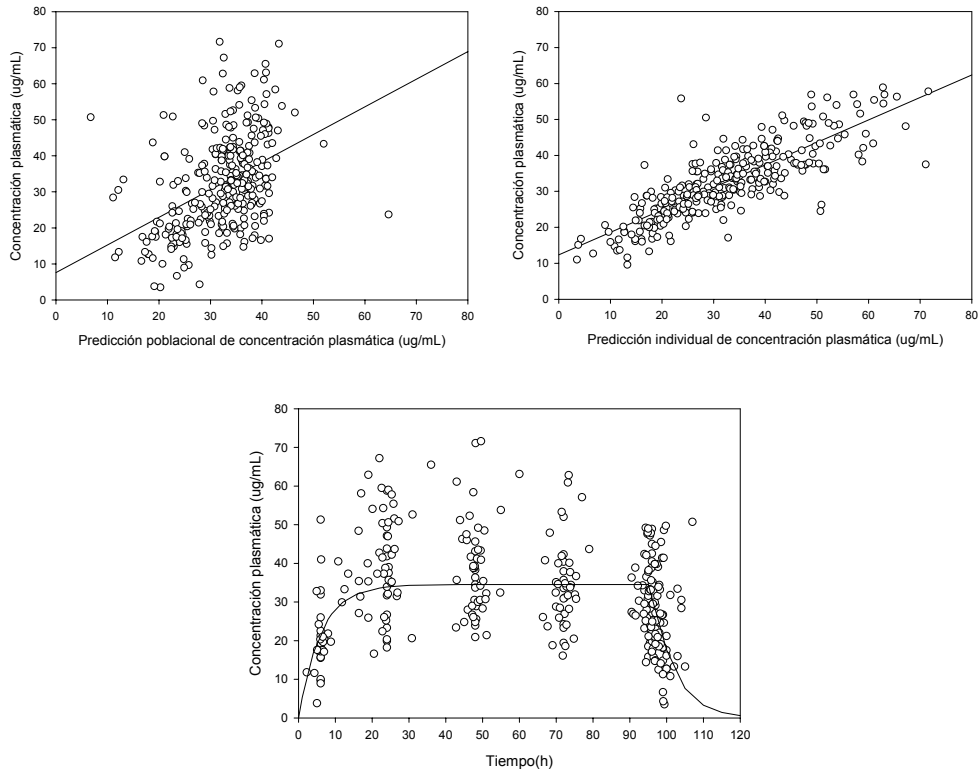


Figura V. 6 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 1 (EE-1). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 1 (run11.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de la población obtenido con el ajustado EE-1 no describe las concentraciones de ciclofosfamida observadas, ya que no tiene en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV no alcanza el estado estacionario estable debido a la

autoinducción de la ciclofosfamida. El perfil medio que describe este ajustado es un perfil plano típico de una perfusión continua IV.

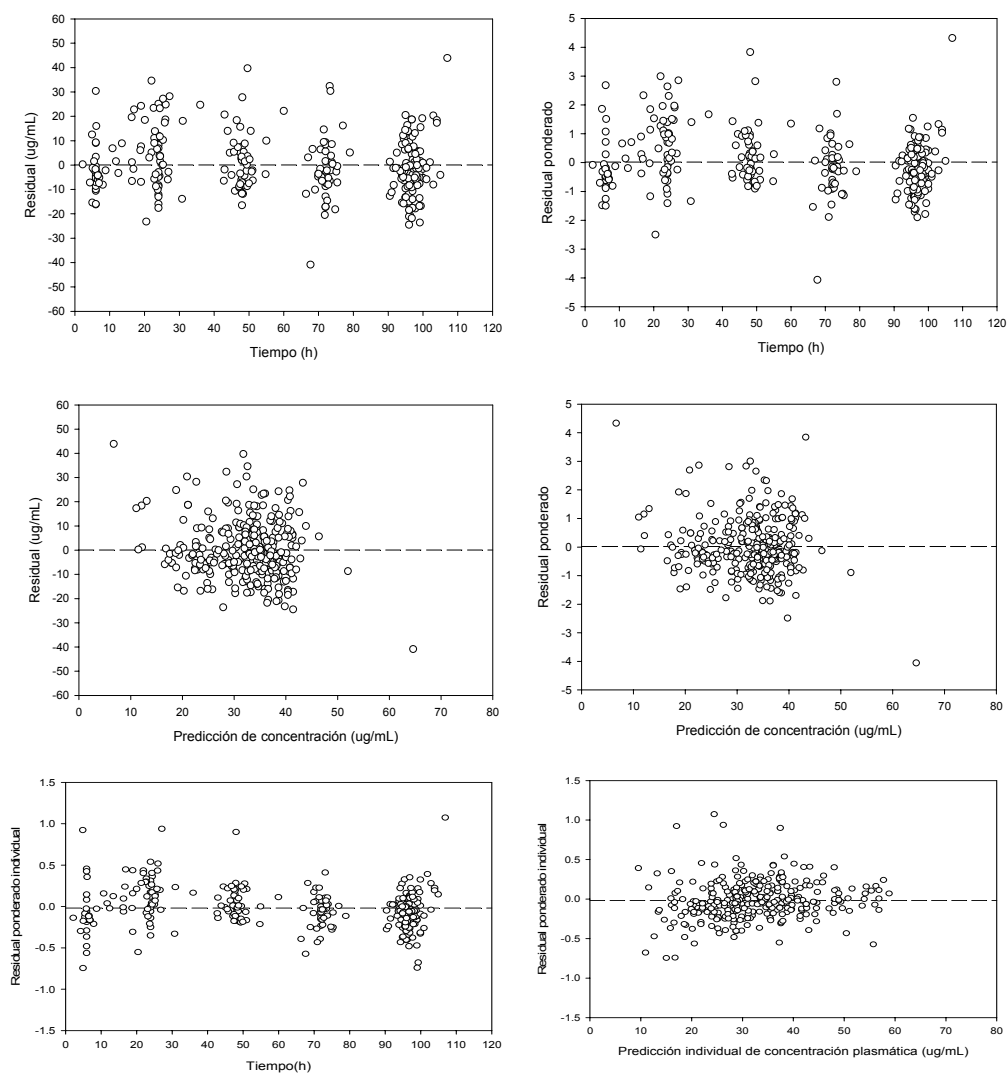


Figura V. 7 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 1 (EE-1) (Run11.mod).

Se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.7.).

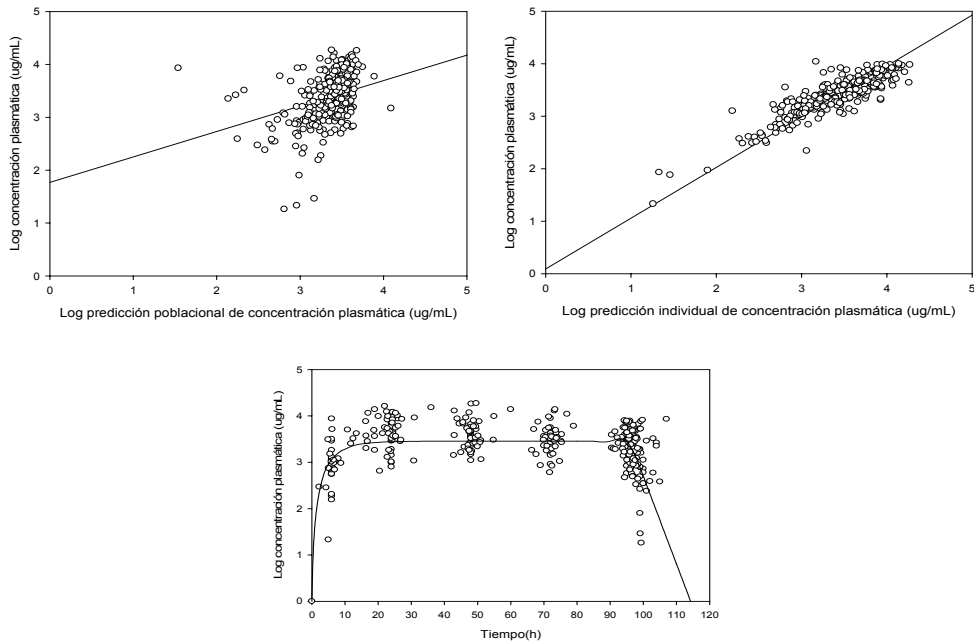


Figura V. 8 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 1 (EE-2). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo (run12.mod).

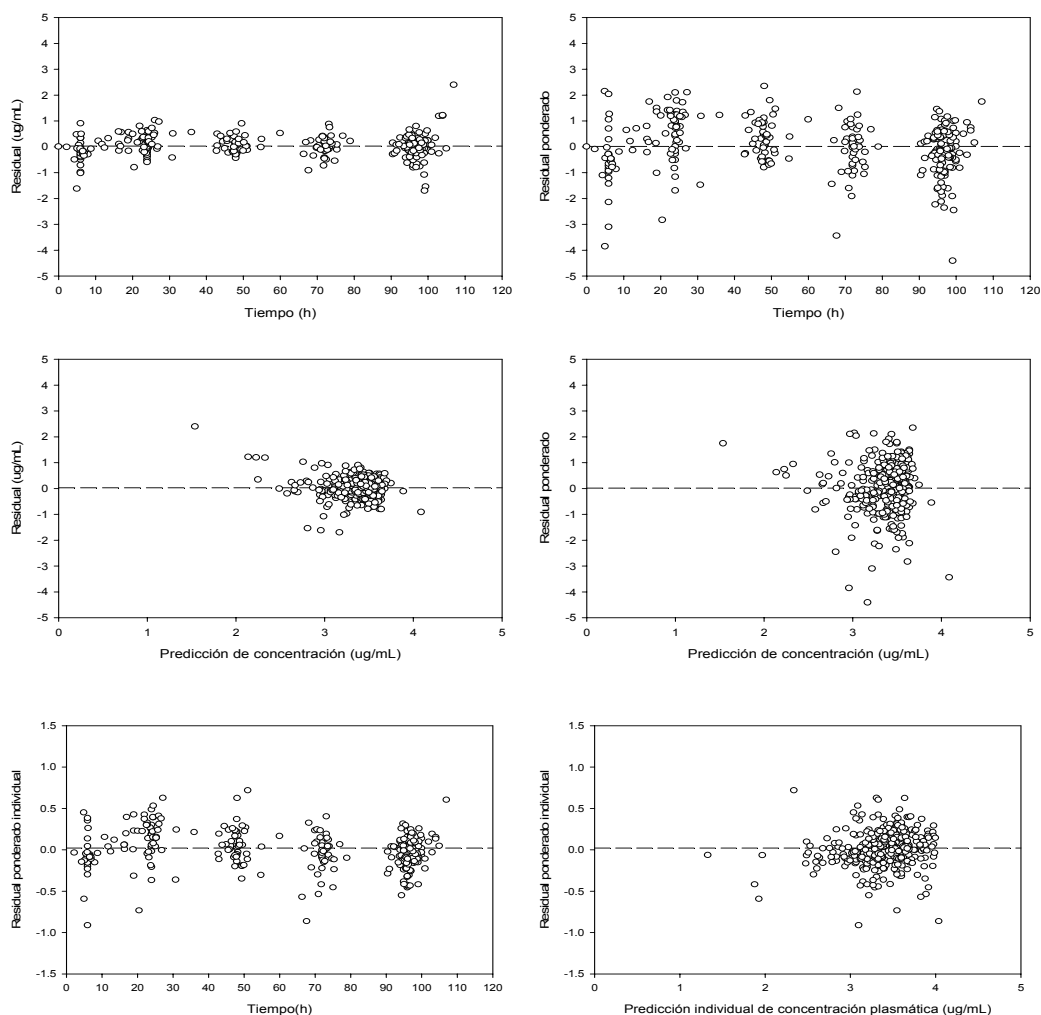


Figura V. 9 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 1 (EE-2). (Run12.mod).

Se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida de manera que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.9.).

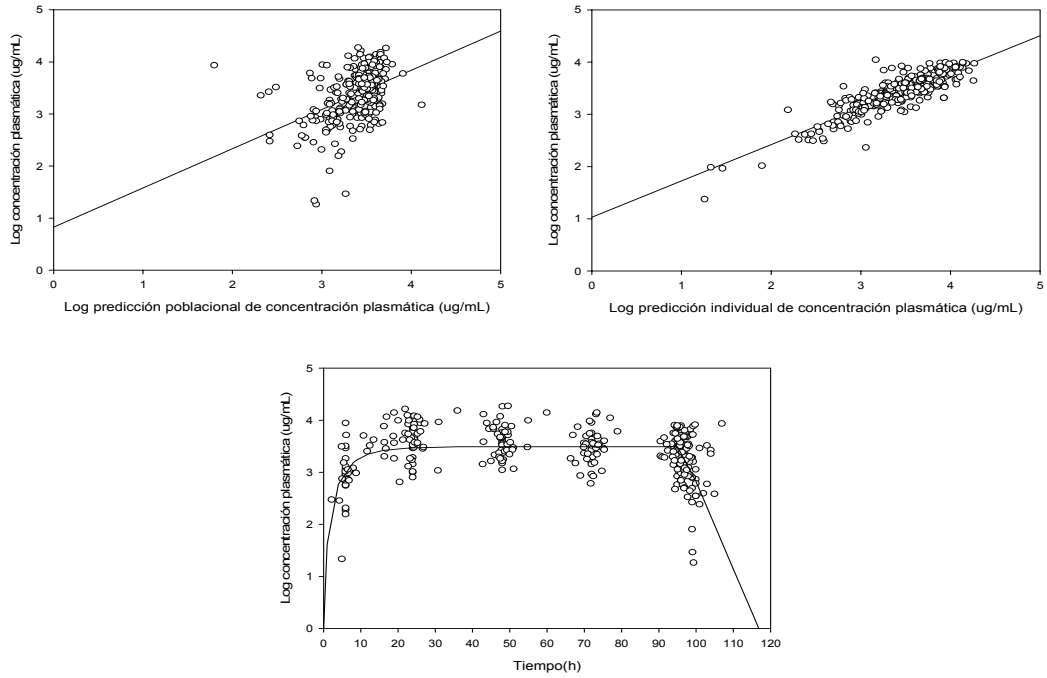


Figura V. 10 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 1 (EE-3). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2 (run13.mod).

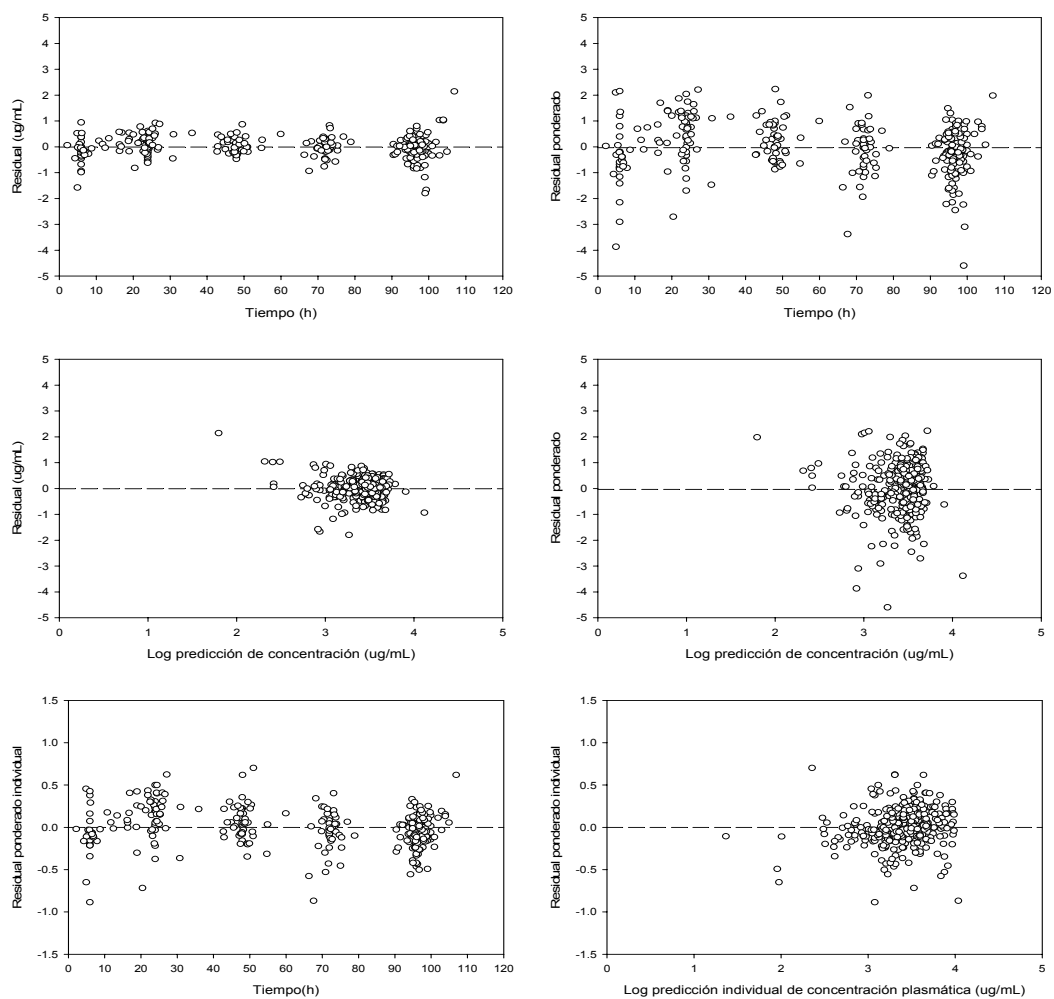


Figura V. 11 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 1 (EE-3)(Run13.mod).

Se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida de manera que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.11.).

Las distribuciones de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros, CL (ETA_{CL}), V (ETA_{V}) para el modelo 1, ajustados EE-1, EE-2 y EE-3 se pueden observar en la siguiente figura V.12. revelando una distribución alrededor de cero en los estimados de estos parámetros.

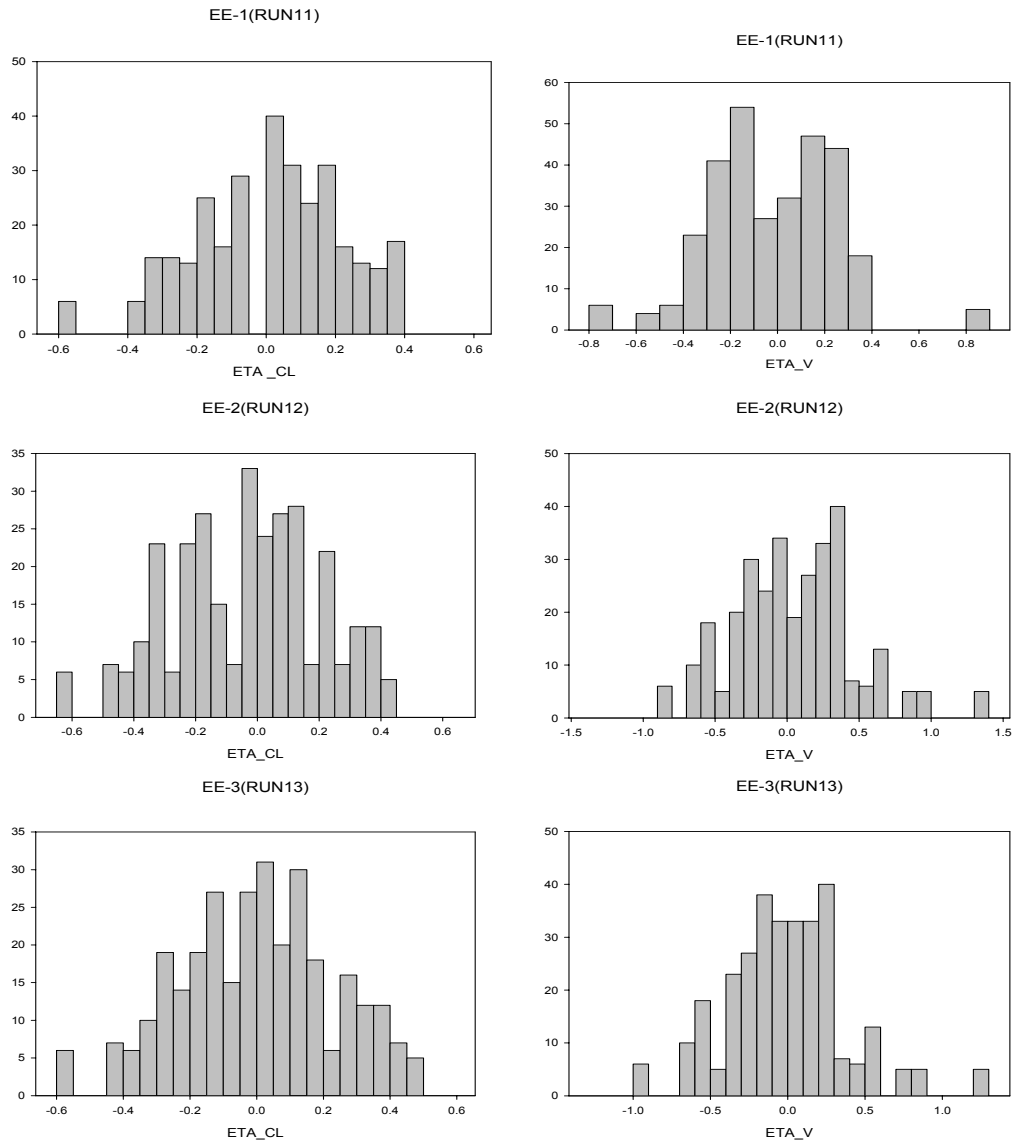


Figura V. 12 Distribución de los valores individuales de variabilidad interindividual de los parámetros CL (ETA_{CL}) V (ETA_{V}) para el modelo 1, ajustados EE-1, EE-2 y EE-3.

Tabla V. 7 Shrinkage_ETA

		Shrinkage_ETA (%)	
		Sh_ETA _{CL}	Sh_ETA _V
Modelo 1	EE-1	3.9	40.4
	EE-2	7.9	26.8
	EE-3	8.1	23.0

Los valores de shrinkage son inferiores al 30% para el aclaramiento para los ajustados EE-1, EE-2 y EE-3. Los valores de shrinkage para el volumen de distribución son inferiores 30% excepto para el ajustado EE-1 donde son superiores a 30%. Por encima de 30%, significa que no hay suficiente número de muestras por paciente para caracterizar de forma individual el parámetro del volumen de distribución en el ajustado EE-1 (Karlsson, 2007; Savic, 2008).

Tabla V. 8 Parámetros estadísticos de la recta de regresión entre las concentraciones plasmáticas observadas y la predicción poblacional de los modelos para ciclofosfamida, modelo de varianza interindividual exponencial.

EE-1 (RUN11)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	12.3262	0.8681	10.6179-14.0345	14.1983	<0.0001
Pendiente	0.6255	0.0249	0.5764-0.6745	25.1055	<0.0001
r^2	0.8205	5.7154	0.7802-0.8540	20.1964	<0.0001
EE-2 (RUN12)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.0911	0.1407	-0.1858-0.30798	0.6475	0.5178
Pendiente	0.9669	0.0413	0.8856-1.44817	23.4052	<0.0001
r^2	0.8010	0.3650	0.7569-0.8378	19.2035	<0.0001
EE-3 (RUN13)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	1.0299	0.0765	0.8794-1.1804	13.4661	<0.0001
Pendiente	0.6951	0.0224	0.6597-0.7392	31.0130	<0.0001
r^2	0.8710	-	0.8411-0.8956	23.3150	<0.0001

*En este caso el estadístico de contraste es "z" no "t"

En la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones realizadas, el intervalo de confianza del 95% de la ordenada en el origen y la pendiente incluyen el 0 y 1 en el ajustado EE-2, sin embargo en los ajustados EE-1 y EE-3 no incluyen el 0 y 1, respectivamente (tabla V. 8).

Por razones expuestas, las condiciones de referencia de aquí en adelante son: transformación logarítmica de las concentraciones plasmáticas y el método de estimación FOCEI. E. de Jonge en su artículo también utiliza el logaritmo de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida (E. de Jonge, 2004b).

Un vez fijadas las condiciones de referencia con el **modelo farmacostatístico básico**, se desarrollan modelos más complejos donde se tiene en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV presenta un aspecto atípico ya que no se alcanza un estado estacionario estable. Los datos existentes en la bibliografía sobre el comportamiento tiempo dependiente de ciclofosfamida es la base de los siguientes modelos.

Los **modelos del 2 al 5**, abordan de una manera más fisiología el fenómeno de autoinducción mediante la existencia de un “compartimento del enzima”. Estos modelos están descritos en las figuras IV.2 a la IV.5 con sus correspondientes ecuaciones diferenciales (Ecuaciones IV.3. a IV.12)

La farmacocinética de la ciclofosfamida esta caracterizada por bajo aclaramiento total clasificada como un fármaco con una tasa de extracción baja (Moore, 1991). Administraciones repetidas o continuas infusiones de ciclofosfamida en pacientes de cáncer durante un periodo de varios días producen un incremento del aclaramiento total de ciclofosfamida pero no existe una alteración en el volumen de distribución o aclaramiento renal y por ello la disminución de la semivida es debido a la tasa de extracción hepática (Graham, 1983; Moore, 1991; Fasola, 1991).

Como se puede observar en la figura V.5, las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida no presentan un estado estacionario estable sino que adquiere una pendiente negativa tanto en la población como en determinados pacientes. En los siguientes modelos, el desarrollo de la autoinducción fue modelado usando un (hipotético) compartimento enzima descrito por diferentes autores Hassan, Kerbusch, Huitema, E de Jonge (Hassan, 1999; Kerbusch, 2000; Huitema, 2001; E de Jonge, 2004b; E de Jonge, 2005a; E de Jonge, 2005b). El aclaramiento de ciclofosfamida es directamente proporcional a la cantidad de enzima en este compartimento.

En el **modelo 2**, describe el comportamiento farmacocinético de ciclofosfamida con un modelo monocompartimental con administración en perfusión intravenosa continua a velocidad constante y la eliminación de primer orden inducible. En este modelo se considera un compartimento adicional, que mimetiza la evolución temporal de la actividad enzimática y su autoinducción por ciclofosfamida se modela mediante un modelo no lineal de efecto máximo (E_{max}). El modelo E_{max} representa la función no lineal que incrementa la producción de actividad enzimática (factor de autoinducción de ciclofosfamida). Donde E_{max} corresponde al efecto máximo de inducción y EC_{50} corresponde a la concentración de ciclofosfamida que produce la mitad del efecto máximo de inducción. Se asume que la actividad enzimática inicial es estacionaria y se produce mediante una velocidad de orden 0 y se elimina mediante una velocidad de primer orden.

Los parámetros obtenidos con el **modelo 2** (con inducción enzimática no lineal) ajustados EE-4 y EE-5 son descritos en la tabla V.9.

El **modelo 2** que corresponde a los ajustados EE-4 y EE-5, con modelos de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual, estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) inferiores en el ajustado EE-5 a los umbrales del 20% y 50%, respectivamente (Ette, 1993). Sin embargo, para el ajustado EE-4 las estimaciones no son precisas con errores estándares relativos (ERR) superiores al umbral del 20% para la varianza interindividual y en el caso de la varianza residual los EER son inferiores al umbral 50%. Además, no existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales. Los modelos estructurales de los ajustados EE-4 y EE-5 son considerados exactos porque MPE es menor que 15%, además las estimas de las variabilidades son consideradas exactas porque MPE es menor. La precisión de los ajustados ha sido determinada por la desviación estándar de la media del error de predicción (Sheiner, 1981b; Fadiran, 2000). Los valores de la variabilidad interindividual de los parámetros se distribuyen alrededor de cero (Figuras V. 17).

Tabla V. 9 Parámetros farmacocinéticos estimados (error estándar) mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, con un modelo de varianza interindividual exponencial. Modelo 2 con inducción no lineal (modelo E_{max}).

Parámetros	Modelo 2	
	EE-4(run41a)	EE-5(run41b)
CL(L/h)	2.39(0.168)	2.40(0.165)
K_{ENZ} (h^{-1})	$1.29 \cdot 10^{-4}$ ($8.34 \cdot 10^{-5}$)	$9.05 \cdot 10^{-5}$ ($1.84 \cdot 10^{-5}$)
V(L)	22.9(2.27)	22.8(2.26)
E_{max}	33.9(23.0)	49.5(12.1)
EC_{50} ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	0.011(0.010) ^a	1.26FIXED ^b
ω_{Cl} (%)	22.4(11.5)	24.3(11.5)
ω_{KENZ} (%)	-	-
ω_V (%)	48.5(25.2)	48.5(25.3)
$\omega_{E_{max}}$ (%)	69.9(49.1)	71.3(49.7)
ω_{EC50} (%)	-	-
σ_{CFA} (%)	48.7(1.99)	48.7(1.99)
FMO(FOCEI)	-391.186	-391.124
MPE (%)	0.478(6.89)	0.482(6.89)

^a valor por debajo del límite de cuantificación ($0.2 \mu g \cdot mL^{-1}$).

^b fijado a la concentración más baja de ciclofosfamida según artículo de Huitema (Huitema, 2001).

MPE: media del error de predicción (desviación estándar).

La inclusión del compartimento enzima (**modelo 2, EE-4 y EE-5**) mejora de forma significativa el ajustado de los datos experimentales, respecto al **modelo 1** ajustado EE-3.

Este **modelo 2** es una modificación de los modelos de efecto máximo testados por Hassan y Huitema, tal y como explica en sus artículos en ningún caso fue el modelo final (Hassan, 1999; Huitema, 2001). Para Hassan, el modelo E_{max} es más complejo y no describe mejor los datos. La autoinducción de ciclofosfamida en el tiempo provoca una disminución de la concentración plasmática que podría ser explicada mediante un

modelo de inducción no lineal donde ciclofosfamida estimula la formación del enzima que a su vez metaboliza a la ciclofosfamida, la inducción enzimática (K_{ENZ}) viene representada por una formación enzimática no lineal y una eliminación enzimática de primer orden. En el ajustado EE-4, se ha estimado EC_{50} pero el valor obtenido fue $0.011 \mu\text{g/mL}$, valor por debajo del límite de cuantificación de la técnica analítica ($0.2 \mu\text{g/mL}$). Por ello se decidió fijar EC_{50} al valor más bajo de concentración plasmática de ciclofosfamida determinado que corresponde $1.26 \mu\text{g/mL}$ (logaritmo de $3.52 \mu\text{g/mL}$) en el ajustado EE-5. El ajustado EE-5 disminuye AIC con respecto al ajustado EE-3 (AIC (EE-5):-377.151; AIC (EE-3):-346.955) sin embargo la estimación de la constante de eliminación del enzima (K_{ENZ}) era muy pequeña de manera que la semivida del enzima era muy grande. El valor del parámetro no era fisiológico si comparamos con la semivida de los enzimas (tabla V.9).

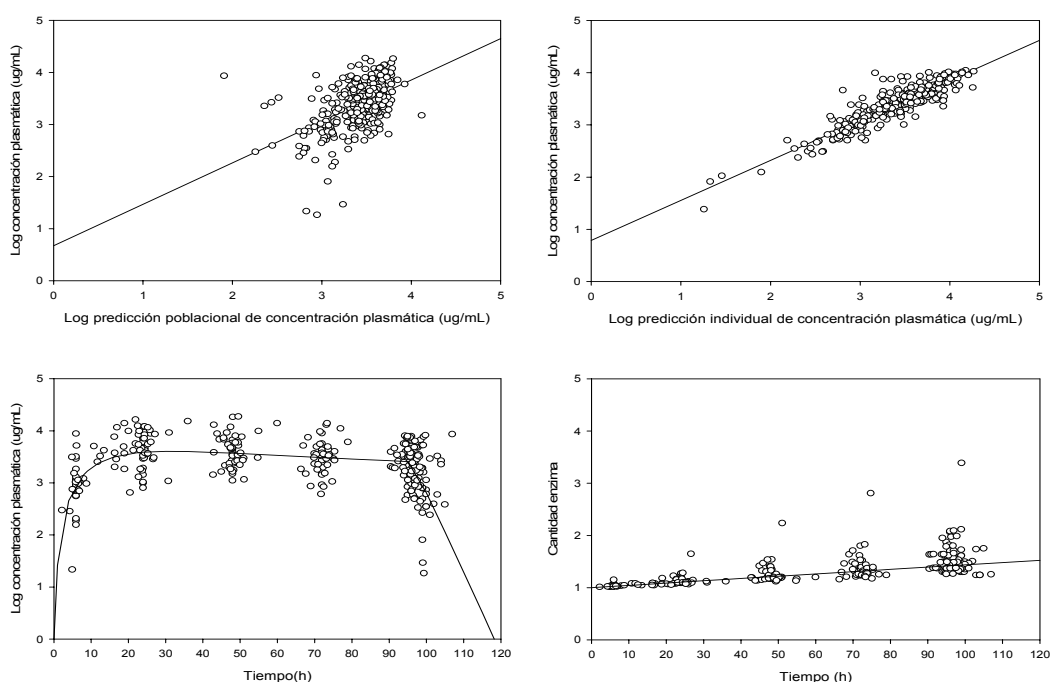


Figura V. 13 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 2 (EE-4). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run41a.mod).

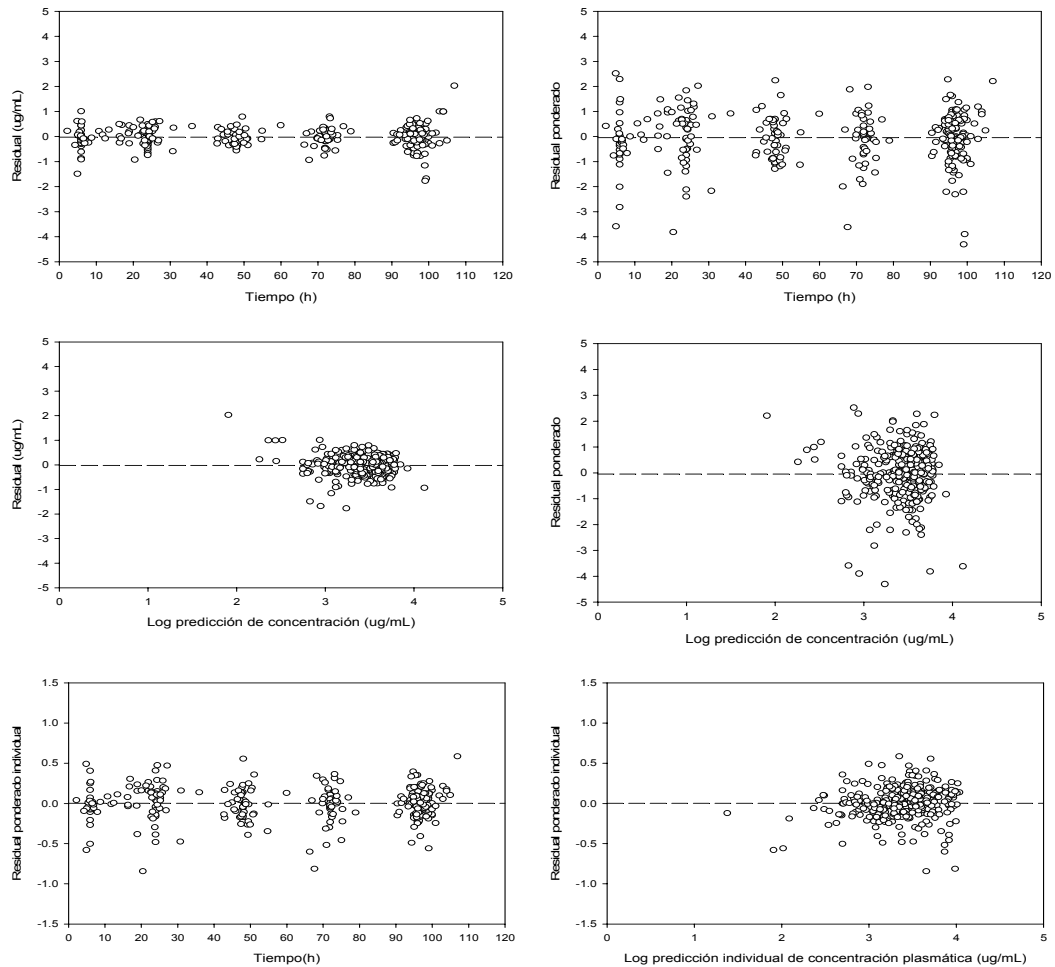


Figura V. 14 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 2 (EE-4) (Run41a.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de la población obtenido con el ajustado EE-4 describe mejor las concentraciones de ciclofosfamida observadas, tiene en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV no alcanza el estado estacionario estable debido a la autoinducción de la ciclofosfamida. La cantidad de enzima ha sido obtenida a partir del ajustado. Vemos que inicialmente tiene un valor 1 (Enz basal), el enzima se encuentra en estado estacionario, la ciclofosfamida no se encuentra circulando por organismo. Cuando la

ciclofosfamida esta presente estimula la producción de enzima. El perfil medio de la población al principio describe bien la cantidad de enzima pero a partir de las 48 horas esta infraestimado.

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.14).

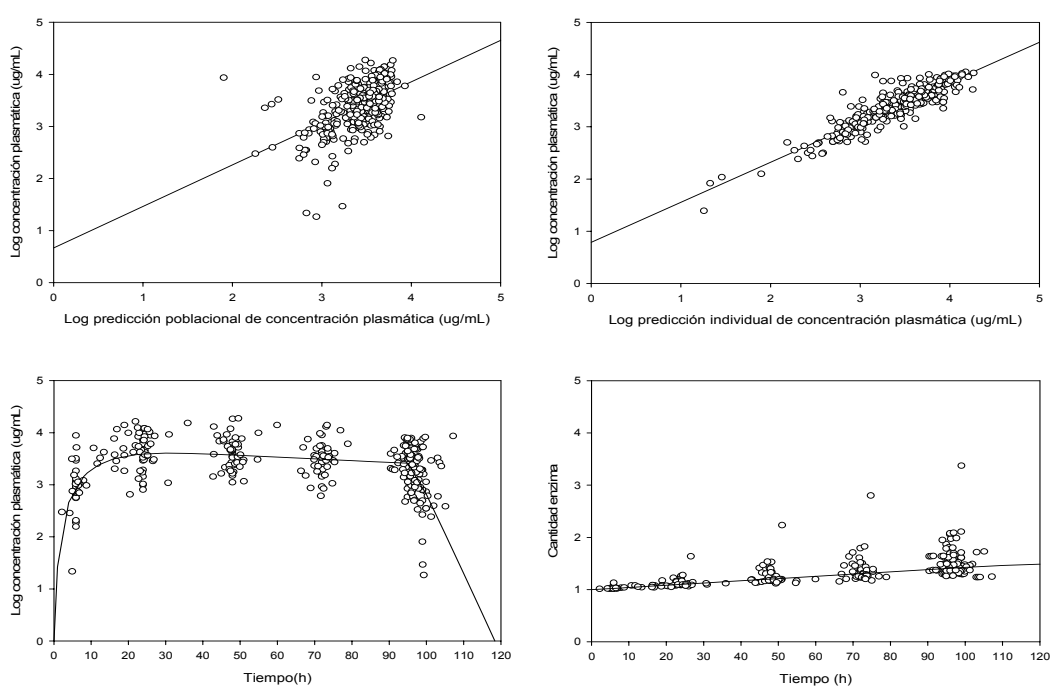


Figura V. 15 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 2 (EE-5). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run41b.mod).

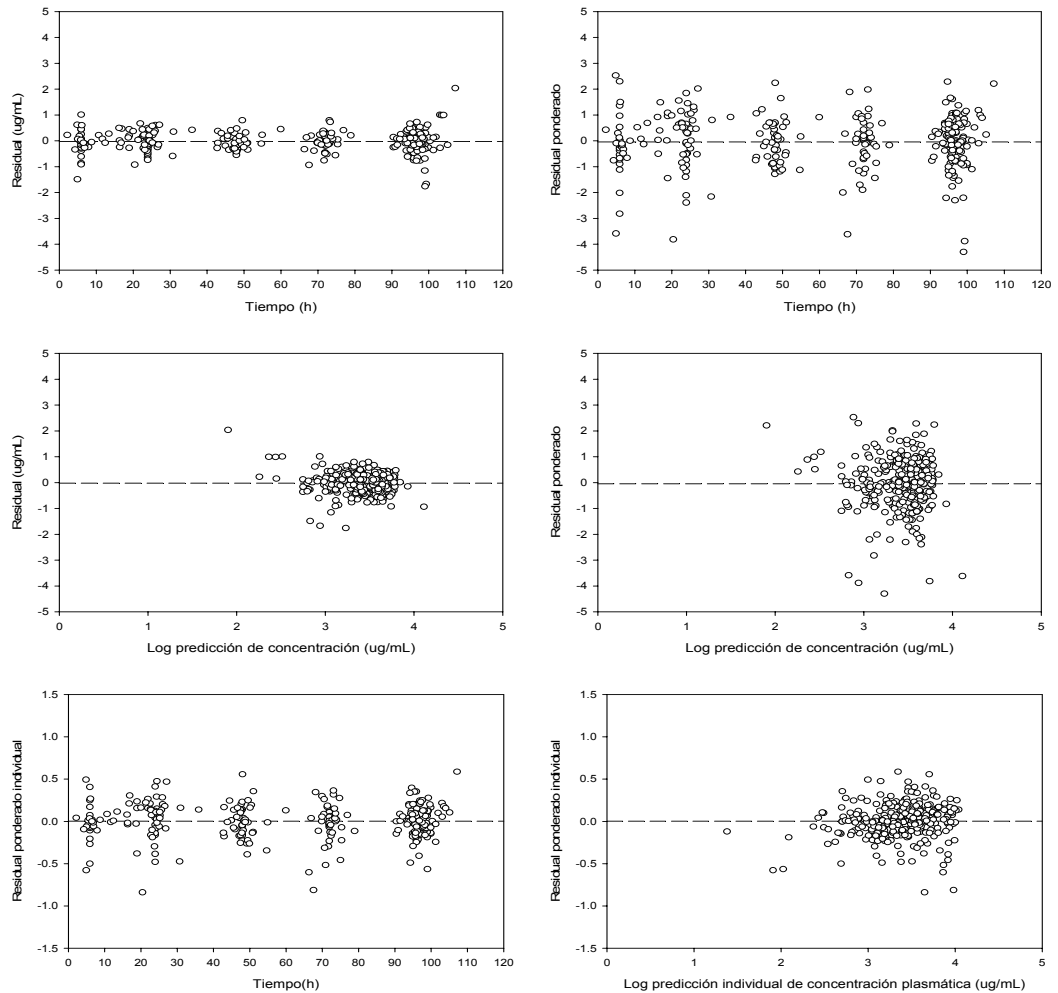


Figura V. 16 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 2 (EE-5) (Run41bmod).

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.16).

Las distribuciones de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros CL (ETA_{CL}), V (ETA_V) y E_{max} ($ETA_{E_{max}}$) para el modelo 2, ajustados EE-4 y EE-5 se pueden observar en la siguiente figura V.17. revelando una distribución alrededor de cero en los estimados de estos parámetros.

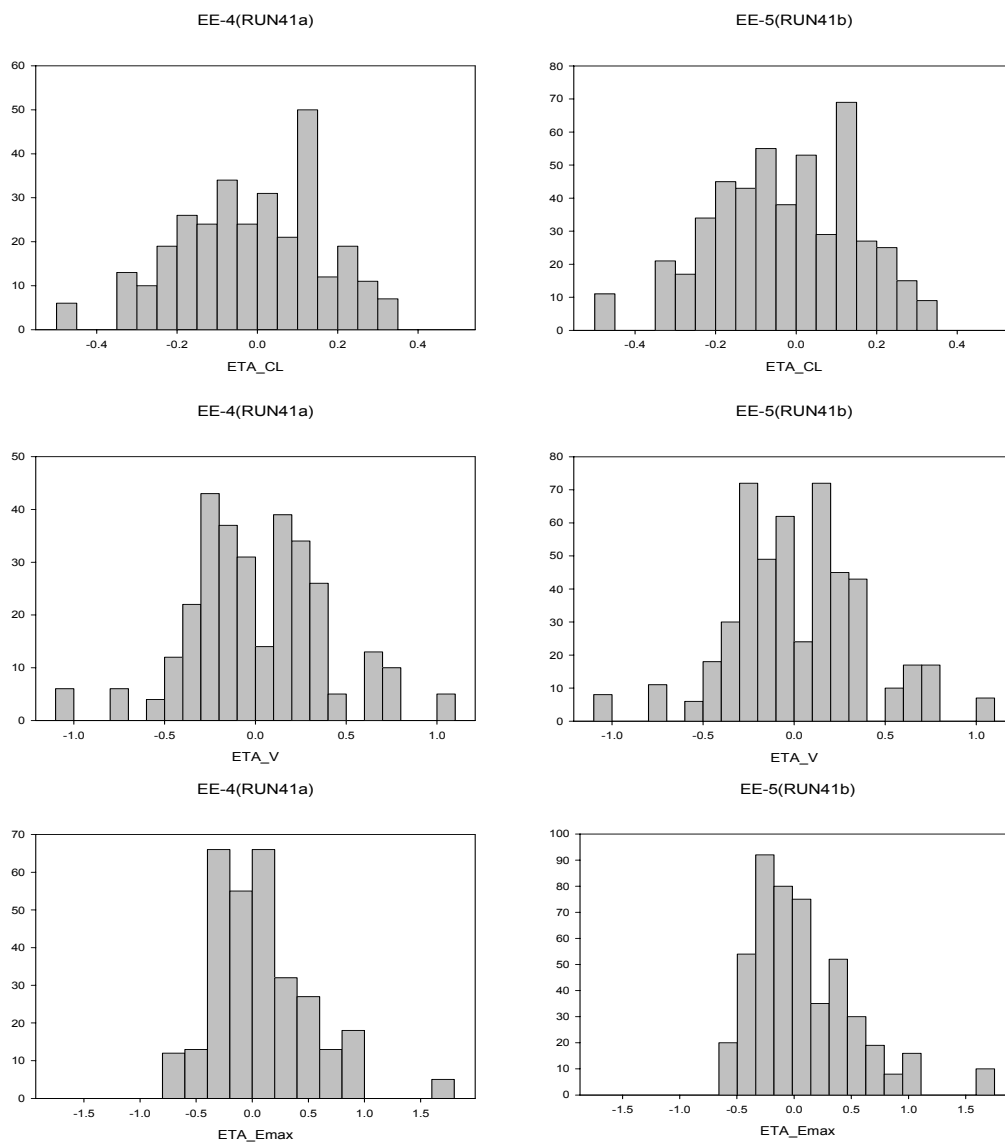


Figura V. 17 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros (ETA_{CL} , ETA_V y $ETA_{E_{max}}$) para el modelo 2, ajustados EE-4 y EE-5.

Tabla V. 10 Shrinkage_ETA

Shrinkage_ETA (%)				
		Sh_ETA _{CL}	Sh_ETA _V	Sh_ETA _{E_{max}}
Modelo 2	EE-4	22.5	19.5	36.2
	EE-5	22.3	19.6	35.4

Los valores de shrinkage son inferiores 30% para el aclaramiento y el volumen de distribución en los ajustados EE-4 y EE-5. Sin embargo para E_{max} el valor es superior a 30% en ambos ajustados EE-4 y EE-5, esto significa que no hay suficiente número de muestras por paciente para caracterizar de forma individual este parámetro (Karlsson, 2007; Savic, 2008).

Tabla V. 11 Parámetros estadísticos de la recta de regresión entre las concentraciones plasmáticas observadas y la predicción poblacional de los modelos para ciclofosfamida, modelo de varianza interindividual exponencial.

EE-4 (RUN41a)	Coficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7877	0.0710	0.6469-0.9263	11.0962	<0.0001
Pendiente	0.7661	0.0208	0.7256-0.8075	36.8162	<0.0001
r	0.9035	0.1699	0.8806-0.9222	25.9957	<0.0001
EE-5 (RUN41b)	Coficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7882	0.0708	0.6488-0.9276	11.1272	<0.0001
Pendiente	0.7659	0.0208	0.7251-0.8068	36.8890	<0.0001
r	0.9038	0.1696	0.8810-0.9224	26.0242	<0.0001

*En este caso el estadístico de contraste es "z" no "t"

El ajustado EE-4 y EE-5 del modelo 2, los intervalos de confianza del 95% de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones individuales, no incluyen el valor 0 y 1, por tanto la relación entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones poblacionales e individuales difieren significativamente de la línea identidad (tabla V.11).

Los parámetros obtenidos con el **modelo 3** (con inducción no lineal con el mecanismo “on-off” con una o dos vías de eliminación) ajustados EE-6, EE-7 y EE-8 son descritos en la tabla V.12. Donde el ajustado EE-6 y EE-7 se considera una vía de eliminación inducible y para el ajustado EE-8 se consideran dos vías de eliminación una inducible y otra no inducible.

Tabla V. 12 Parámetros farmacocinéticos estimados (error estándar) mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, con un modelo de varianza interindividual exponencial modelo 3 con inducción no lineal. Modelo de Huitema

Parámetros	Modelo 3		
	EE-6(run49)	EE-7(run49B)	EE-8(run49c2)
CL(L/h)	2.39(0.167)	2.40(0.164)	1.08(0.620)
CLo(L/h)	-	-	1.24(0.719)
K_{ENZ} (h^{-1}) ^a	$4.34 \cdot 10^{-3}$ ($1.38 \cdot 10^{-3}$)	0.0045(0.0014)	0.0101(0.006)
V(L)	22.8(2.27)	22.8(2.26)	23.0(2.22)
IC ₅₀ ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	0.0109 (0.0513) ^b	1.26 FIXED ^c	1.26 FIXED ^c
ω_{Cl} (%)	22.4(11.5)	22.6(11.5)	-
ω_{ClO} (%)	-	-	49.8 (48.8)
ω_{kenz} (%)	70.1(49.0)	71.3(49.7)	81.4(49.4)
ω_v (%)	48.47(25.22)	48.5(25.4)	48.5(25.3)
ω_{IC50} (%)	52.0(57.0)	-	-
σ_{CFA} (%)	48.7(1.99)	48.7(1.99)	48.2(2.04)
FMO(FOCEI)	-391.225	-391.151	-393.762
MPE(%)	0.478(6.89)	0.478(6.89)	0.388(6.67)

^a K_{ENZ} corresponde a la formación enzimática.

^b Valor por debajo del límite de cuantificación ($0.2 \mu g \cdot mL^{-1}$).

^c El valor IC₅₀ se ha fijado a la concentración más baja de ciclofosfamida según artículo de Huitema (Huitema, 2001).

MPE: Media de error de predicción (desviación estándar)

El **modelo 3** que corresponde a los 3 ajustados EE-6, EE-7 y EE-8, con el modelos de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual, el grado de precisión de la estimación de los parámetros es inferior en los ajustados EE-6 y EE-8, con errores estándares relativos (ERR) superiores en el ajustado los umbrales del 20% y 50%, respectivamente (Ette, 1993). Sin embargo, los EER en el ajustado EE-7 de los parámetros son inferiores los umbrales del 20% y 50%, respectivamente, excepto para EER de K_{ENZ} (31.6%). Además, no existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales. Los modelos estructurales de los ajustados EE-6, EE-7 y EE-8 son considerados exactos porque MPE es menor que 15%, además las estimas de las variabilidades son consideradas exactas porque MPE es menor. La precisión de los ajustados ha sido determinada por la desviación estándar de la media del error de predicción (Sheiner, 1981b; Fadiran, 2000).

La inclusión del compartimento enzima (**modelo 3, EE-6, EE-7 y EE-8**) mejora de forma significativa el ajustado de los datos experimentales, respecto al modelo 1 ajustado EE-3.

En el **modelo 3**, la inducción enzimática es no lineal como el modelo descrito Huitema y cols, es capaz de estimar la formación enzimática pero no es capaz de estimar su eliminación. Además, Huitema fija el parámetro IC50 al valor más bajo de concentración de ciclofosfamida (Huitema, 2001). En el ajustado EE-6, se ha estimado IC50, el valor obtenido fue 0.0109 $\mu\text{g/mL}$ concentración por debajo del límite de cuantificación (0.2 $\mu\text{g/mL}$). Por ello se decidió fijar IC50 al valor más bajo de concentración plasmática de ciclofosfamida que corresponde 1.26 $\mu\text{g/mL}$ (logaritmo de 3.52 $\mu\text{g/mL}$) en el ajustado EE-7. En el ajustado EE-8, se estimó dos vías de eliminación una vía inducible y otra no inducible, incrementando la constante de formación enzimática. El ajustado EE-7 disminuye AIC con respecto al ajustado EE-3 pero no respecto al ajustado EE-5 (AIC (EE-7): -377.151; AIC (EE-5): -377.151; AIC (EE-3): -346.955). La K_{ENZ} fue únicamente estimada para la formación enzimática. No se pudo estimar la eliminación enzimática con este modelo tal y como había sido descrito por Huitema (Huitema, 2001).

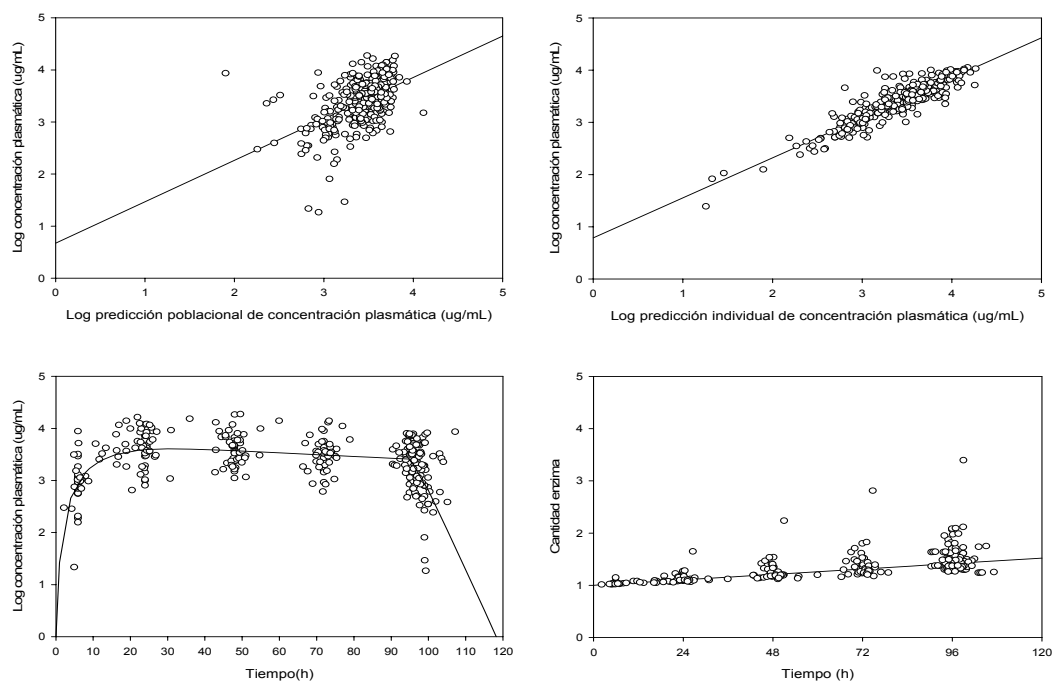


Figura V. 18 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 3 (EE-6). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run49.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de la población obtenido con el ajustado EE-6 describe las concentraciones de ciclofosfamida observadas, teniendo en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV no alcanza el estado estacionario estable debido a la autoinducción de la ciclofosfamida.

La cantidad de enzima que ha sido obtenida a partir del ajustado vemos que inicialmente tiene un valor 1 (Enz basal), cuando el enzima se encuentra en estado estacionario y no hay ciclofosfamida circulando en el organismo. Vemos como cuando la ciclofosfamida esta presente en el organismo estimula la producción de enzima. El

perfil medio de la población al principio pasa por en medio de los valores pero a las 48 horas vemos que queda por debajo.

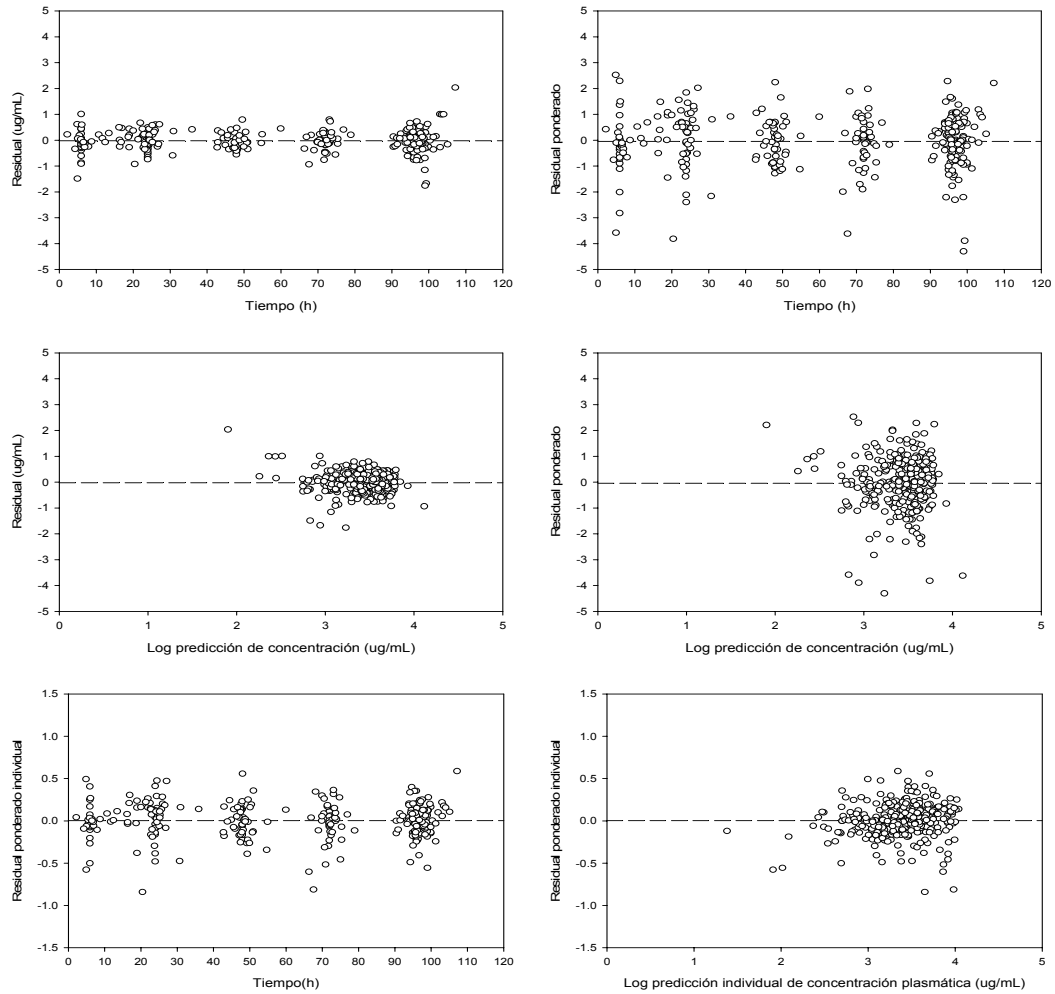


Figura V. 19 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 3 (EE-6) (Run49.mod).

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.19).

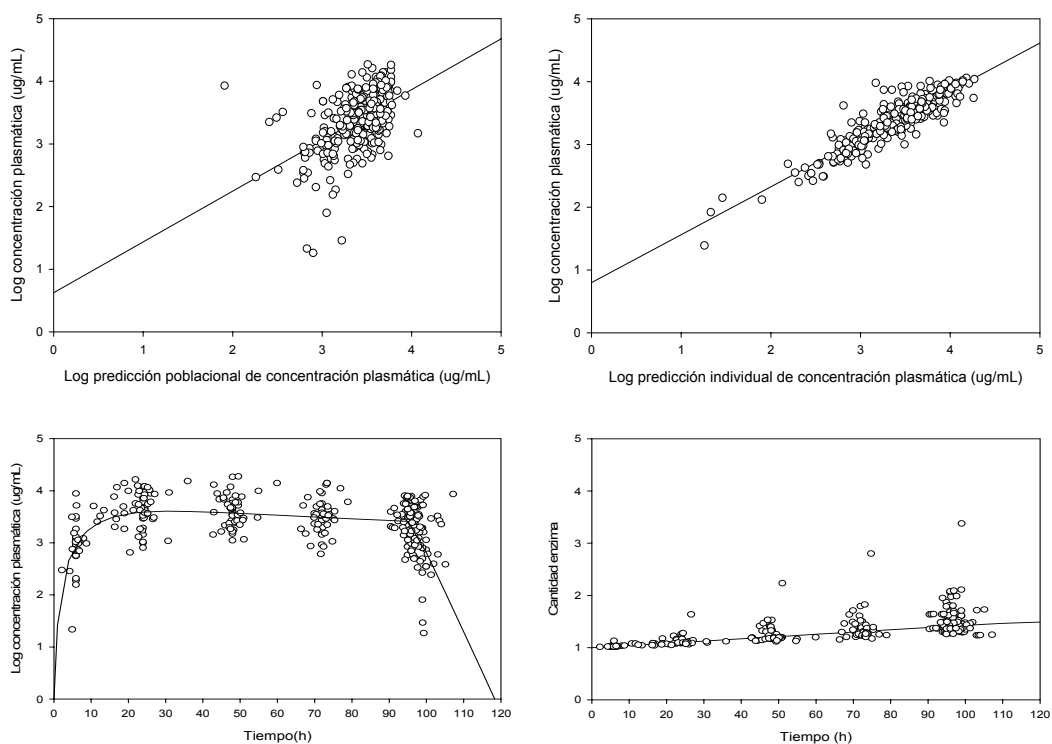


Figura V. 20 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 3 (EE-7). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run49b.mod)

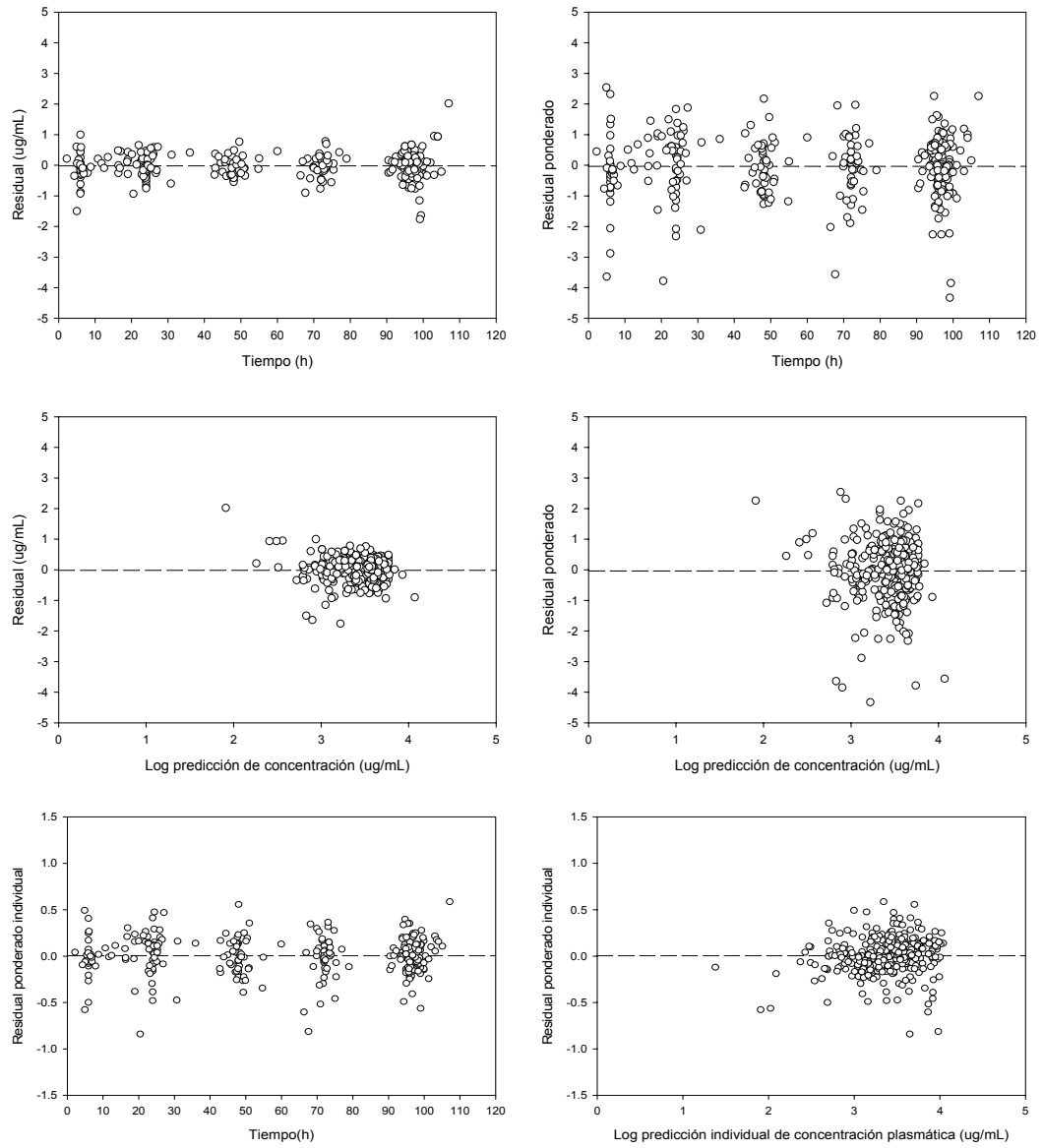


Figura V. 21 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 3 (EE-7) (Run49b.mod).

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.21).

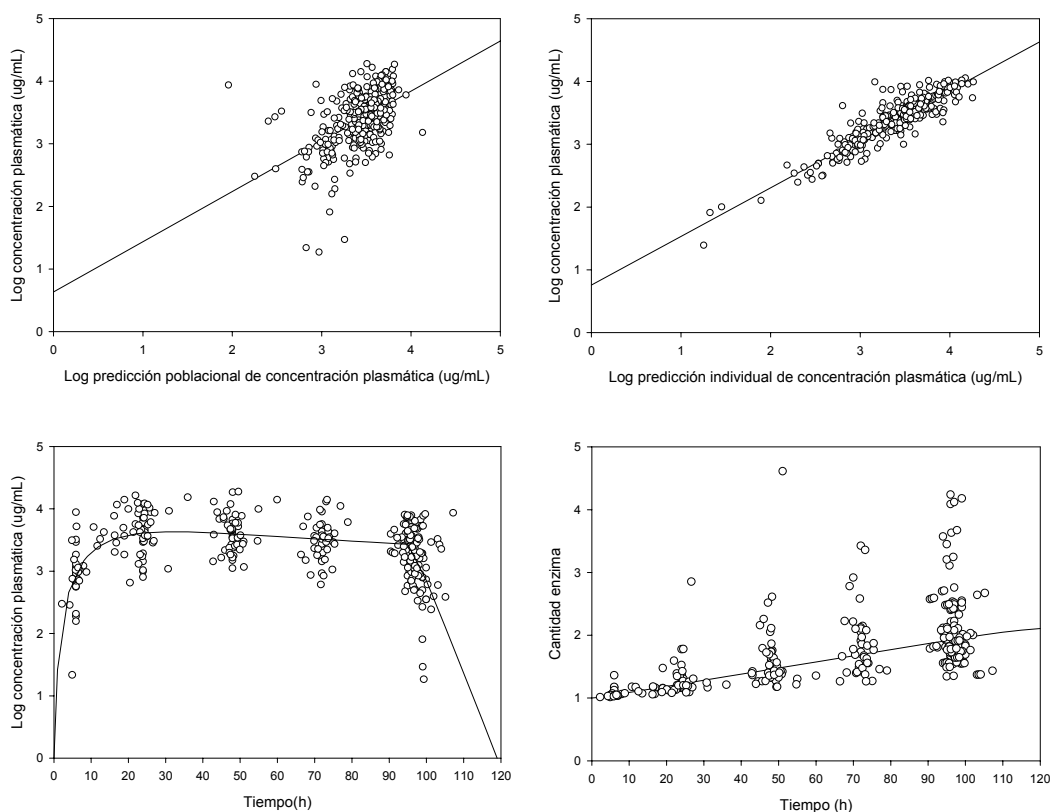


Figura V. 22 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 3 (EE-8). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 3. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run49c2.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de la población obtenido con el ajustado EE-7 describe las concentraciones de ciclofosfamida observadas, teniendo en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV no alcanza el estado estacionario estable debido a la autoinducción de la ciclofosfamida.

La cantidad de enzima que ha sido obtenida a partir del ajustado vemos que inicialmente tiene un valor 1 (Enz basal) cuando el enzima se encuentra en estado estacionario y no hay ciclofosfamida circulando en el organismo. Vemos como cuando la ciclofosfamida esta presente en el organismo estimula la producción de enzima. La cantidad de enzima en este ajustado EE-7 es superior a los ajustados y modelos anteriores pues los niveles más altos hasta el momento eran alrededor de 2 excepto una paciente valores estimados de 3.5, pero en este ajustado el máximo valor esta alrededor de 4.5. Esto podría ser debido a que este ajustado tiene 2 vías de eliminación una inducible y otra no inducible. El perfil medio de la población al principio pasa por en medio de los valores pero a las 48 horas vemos que queda por debajo.

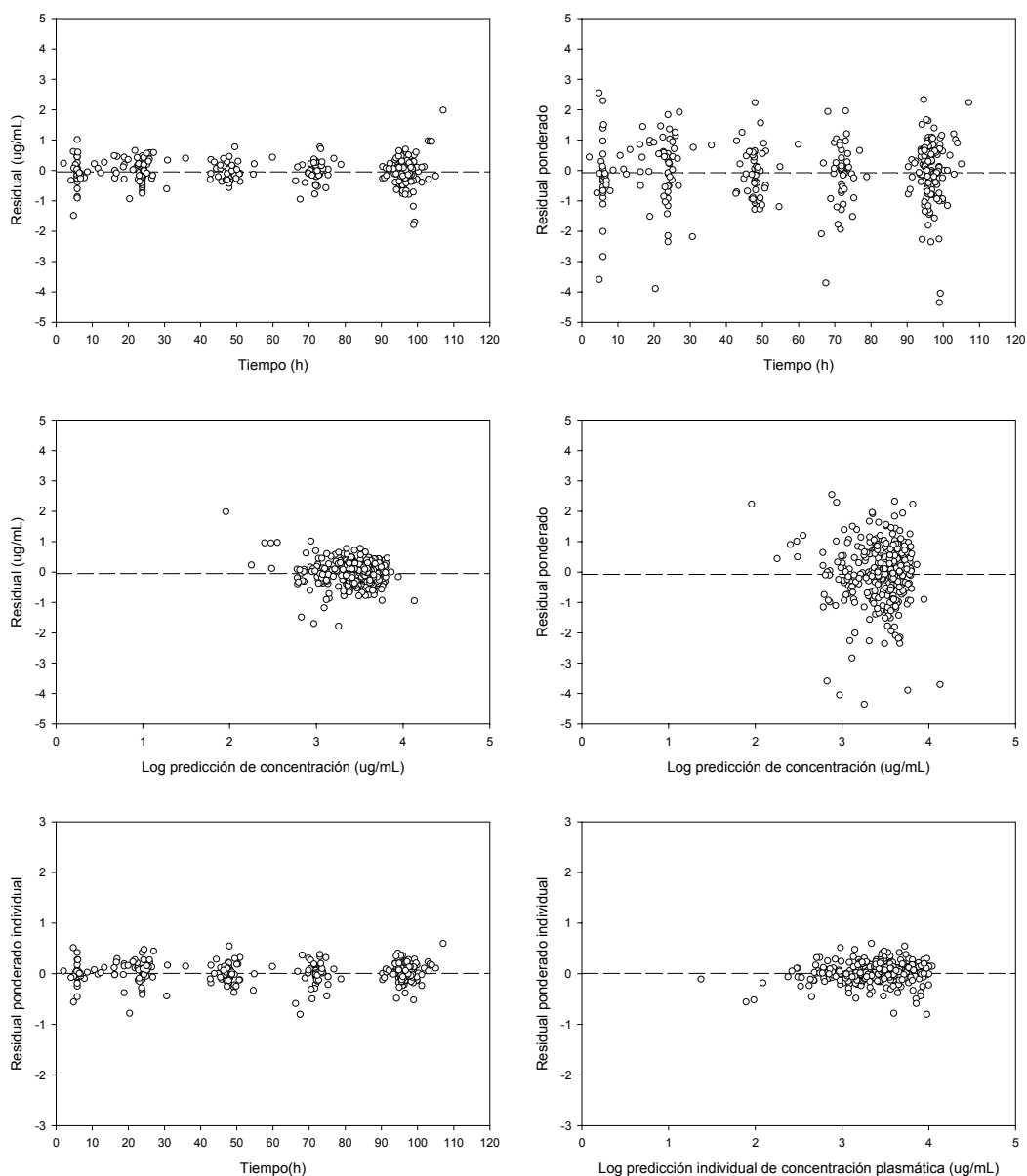


Figura V. 23 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 3 (EE-8). (Run49c2.mod).

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.23).

Las distribuciones de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros, CL (ETA_CL), V (ETA_V), K_{ENZ} (ETA_K_{ENZ}), IC₅₀ (ETA_IC₅₀) y Cl_o (ETA_Cl_o) para el modelo 3, ajustados EE-6, EE-7 y EE-8 se pueden observar en las siguientes figuras V.25. y V.25. revelando una distribución alrededor de cero en los estimados de estos parámetros, excepto para K_{ENZ} e IC₅₀.

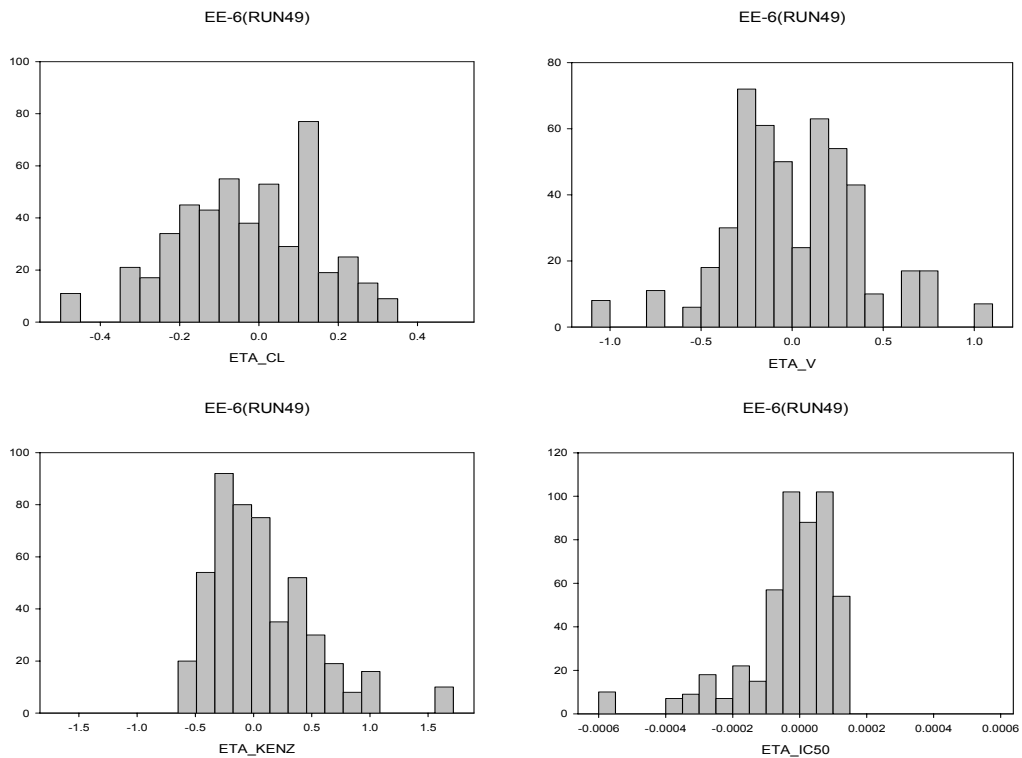


Figura V. 24 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros (ETA_CL, ETA_V, ETA_KENZ y ETA_IC₅₀) para el modelo 3, ajustado EE-6.

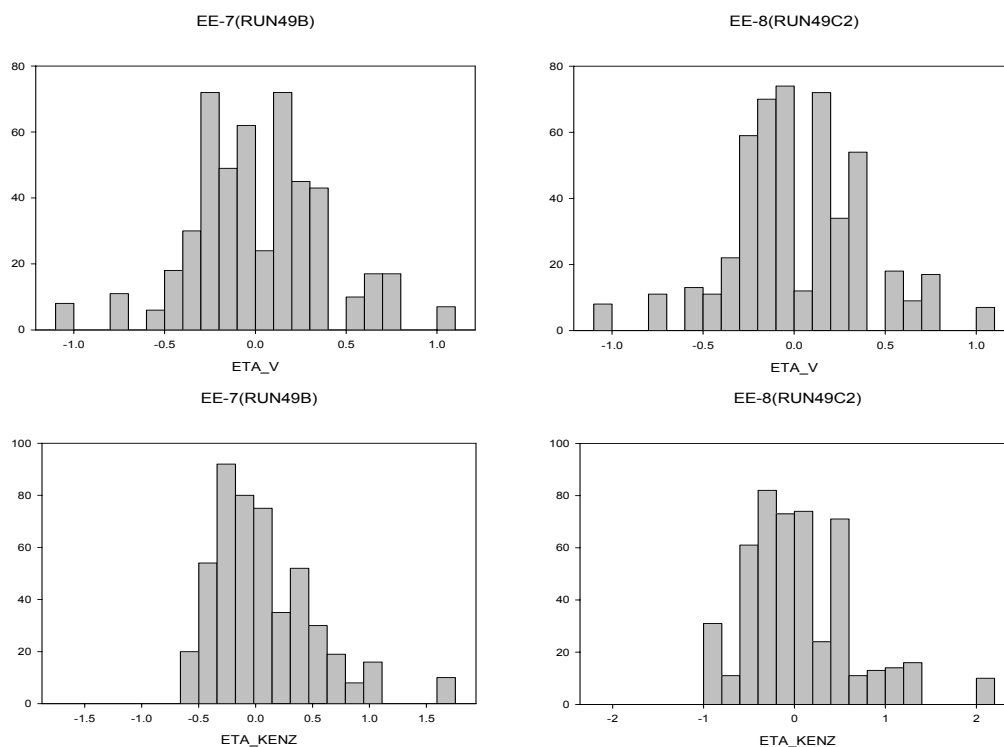


Figura V. 25 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros (ETA_{CL} , ETA_V , ETA_{KENZ} y ETA_{CL_0}) para el modelo 3, ajustados EE-7 y EE-8.

Tabla V. 13 Shrinkage_ETA

		Shrinkage_ETA (%)			
		Sh ETA_{CL}	Sh ETA_V	Sh ETA_{IC50}	Sh ETA_{KENZ}
Modelo 3	EE-6	22.5	19.5	100	35.6
	EE-7	22.3	19.6	-	35.4
	EE-8	25.6	19.9	-	2.61

Los valores de shrinkage son inferiores 30% para el aclaramiento y el volumen de distribución en los ajustados EE-6, EE-7 y EE-8 y K_{ENZ} en el ajustado EE-8. Sin embargo para IC_{50} en el ajustado EE-6 y K_{ENZ} en ajustado EE-6 y EE-7, el valor es superior a 30% esto significa que no hay suficiente número de muestras por paciente para caracterizar de forma individual estos parámetros (Karlsson, 2007; Savic, 2008).

Tabla V. 14 Parámetros estadísticos de la recta de regresión entre las concentraciones plasmáticas observadas y la predicción individual de los modelos para ciclofosfamida modelo de varianza interindividual exponencial.

EE-6 (RUN49)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7874	0.0709	0.6478-0.9269	11.1000	<0.0001
Pendiente	0.7661	0.0208	0.7252-0.8071	36.8485	<0.0001
r*	0.8166	0.1698	0.7756-0.8508	19.9904	<0.0001
EE-7 (RUN49b)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7833	0.0268	0.9149-1.0199	11.1623	<0.0001
Pendiente	0.7676	0.9104	-1.0571-2.5117	37.3702	<0.0001
r*	0.8193	0.1689	0.7788-0.8530	20.1326	<0.0001
EE-8 (RUN49c2)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7565	0.0693	0.6202-0.8528	10.9222	<0.0001
Pendiente	0.7746	0.0203	0.7346-0.8145	38.1497	<0.0001
r*	0.9093	0.1658	0.8878-0.9269	26.6062	<0.0001

En este caso el estadístico de contraste es "z" no "t"

Los ajustados EE-6 y EE-8 del modelo 3, los intervalos de confianza del 95% de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones individuales, no incluyen el valor 0 y 1, por tanto la relación entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones poblacionales e individuales difieren significativamente de la línea identidad.

Con el ajustado EE-7 los intervalos de confianza del 95% de la ordenada en el origen no incluye el 0 y la pendiente de la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones individuales incluyen 1 por tanto la relación entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones poblacionales e individuales no difiere significativamente de la línea identidad.

Los parámetros obtenidos con el **modelo 4** (con inducción lineal con una o dos vías de eliminación) ajustados EE-9, EE-10, EE-11 y EE-12 son descritos en la tabla V.15. En los ajustados del EE-9 al EE-11 solo se tiene en cuenta una vía de

eliminación inducible y el ajustado EE-12 se tiene en cuenta dos vías una inducible y otra no inducible.

Tabla V. 15 Parámetros farmacocinéticos estimados (error estándar) mediante el modelo lineal de efectos mixtos, con un modelo de varianza interindividual exponencial modelo 4 con inducción lineal. Modelo de Hassan modificado.

Parámetros	Modelo 4	
	EE-9(run22b)	EE-10(run27)
CL(L/h)	2.44(0.153)	2.44(0.153)
CL ₀ (L/h)	-	-
K _{ENZ} (h ⁻¹)	5.46·10 ⁻⁶ (1.44·10 ⁻⁶)	0.00005(0.000013)
V(L)	22.8(2.21)	22.8(2.21)
SCp(mL/μg·h ⁻¹)	21.4(4.61)	2.35(0.748)
ω _C (%)	25.3(12.7)	25.3(12.7)
ω _{Cl₀} (%)	-	-
ω _{KENZ} (%) ^a	18.4(4.31) ^b	-
ω _V (%)	47.5(25.3)	47.5(25.3)
ω _{SCp} (%)	89.4(58.8) ^b	89.6(58.8)
σ _{CFA} (%)	48.7(2.03)	48.8(2.03)
FMO(FOCEI)	-389.476	-389.459
MPE(%)	0.542(0.702)	0.541(0.703)

^a La variabilidad interindividual es estimada tanto para la formación como para la eliminación.

^b Correlación entre K_{ENZ} y SCp: -0.844

MPE: media del error de predicción (desviación estándar).

Tabla V.15.(Cont) Parámetros farmacocinéticos estimados mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, con un modelo de varianza interindividual exponencial modelo 4 con inducción lineal. Modelo de Hassan modificado.

Parámetros	Modelo 4	
	EE-11(run28b)	EE-12(run46a2)
CL(L/h)	2.25(0.281)	1.19(0.439)
CL ₀ (L/h)	-	1.16(0.520)
K _{ENZ} (h ⁻¹)	0.0134(0.0083)	6.19·10 ⁻⁵ (2.69·10 ⁻⁵)
V(L)	23.5(2.71)	22.9(2.19)
SCp (mL/μg· h ⁻¹)	0.0213(0.0073)	3.79(0.896)
ω _{CL} (%)	28.1(13.8)	-
ω _{CL0} (%)	-	57.5(47.9)
ω _{KENZ} (%) ^a	38.0(31.4)	-
ω _V (%)	46.2(25.9)	48.0(25.3)
ω _{SCp} (%)	-	103.0(58.8)
σ _{CFA} (%)	49.2(2.12)	48.3(2.07)
FMO(FOCEI)	-389.982	-391.422
MPE(%)	0.618(7.38)	0.412(6.84)

^ala variabilidad interindividual es estimada únicamente en la eliminación enzimática.
MPE: media del error de predicción (desviación estándar).

El modelo 4, ajustado EE-9 con el modelo de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual, estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) inferiores a los umbrales del 20% y 50%, respectivamente, excepto para los parámetros K_{ENZ} y SCp y la variabilidad interindividual de K_{ENZ} donde los errores son superiores a los umbrales (26.28, 21.54 y 55.20 %, respectivamente) (Ette, 1993). Además, existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado (-0.844). Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la

predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales.

El ajustado EE-10 con el modelo de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual, estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) inferiores a los umbrales del 20% y 50%, respectivamente, excepto para los parámetros K_{ENZ} y SCp donde los errores son superiores a los umbrales (26.60 y 31.83 %, respectivamente) (Ette, 1993). Además, no existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales.

El ajustado EE-11 con el modelo de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual, estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) inferiores a los umbrales del 20% y 50%, respectivamente, excepto para los parámetros K_{ENZ} y SCP , la variabilidad interindividual de K_{ENZ} donde los errores son superiores a los umbrales (61.34, 34.18 y 68.40 %, respectivamente) (Ette, 1993). Además, no existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales.

El ajustado EE-12 con el modelo de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, para la varianza interindividual y residual, estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) para los parámetros son superiores al umbral del 20% excepto para el volumen de distribución y ERR para la varianza interindividual es inferior al umbral del 50% excepto para el Cl_o (69.39%) (Ette, 1993). Además, no existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que no proporciona una distribución aleatoria de los residuales.

Los modelos estructurales de los ajustados EE-9, EE-10, EE-11 y EE-12 son considerados exactos porque MPE es menor que 15%, además las estimas de las

variabilidades son consideradas exactas porque MPE es menor que 15%. La precisión de los ajustados ha sido determinada por la desviación estándar de la media del error de predicción (Sheiner, 1981b; Faridan, 2000).

La inclusión del compartimento enzima (**modelo 4, EE-9, EE-10, EE-11 y EE-12**) mejora por tener un menor AIC respecto al modelo 1 ajustado EE-3 (AIC (EE-11):-373.459; AIC (EE-3):-346.955).

Los resultados obtenidos por Hassan y cols que demostraron como la autoinducción de ciclofosfamida en tiempo que provoca una disminución de la concentración plasmática podría ser explicada mediante un modelo de inducción lineal donde ciclofosfamida estimula la formación del enzima que a su vez metaboliza a ciclofosfamida (Hassan, 1999). En el modelo 4, se asume que la ciclofosfamida es monocompartimental ya que el número de puntos que tenemos en fase terminal es relativamente pequeño para poder definir 2 compartimentos. En el ajustado EE-9, la constante de inducción estimada es muy pequeña y además existe una correlación entre la variabilidad interindividual de K_{ENZ} y SCp ($r=-0.844$). En el ajustado EE-10, se elimina la variabilidad de K_{ENZ} porque parece que no se pueden estimar ambas variabilidades por una sobreparametrización del modelo. Sin embargo, vemos que la K_{ENZ} estimada sigue siendo muy pequeña. En el ajustado EE-11, se estima la variabilidad interindividual únicamente en la constante de inducción en la eliminación enzimática y sin variabilidad interindividual en la formación enzimática, ya que al intentar estimar diferente variabilidad interindividual para la formación y eliminación enzimática, el valor obtenido para variabilidad interindividual para la formación era extremadamente pequeño muy cercano a cero. De este modo el valor obtenido de K_{ENZ} es un valor parecido al valor obtenido por Hassan. La semivida de ciclofosfamida es menor que la semivida de enzimática de modo que la ciclofosfamida no es un factor limitante de la actividad enzimática. En el ajustado EE-12 se intenta estimar dos vías de eliminación una vía inducible y otra no inducible. Sin embargo esto no mejora la estima de la K_{ENZ} .

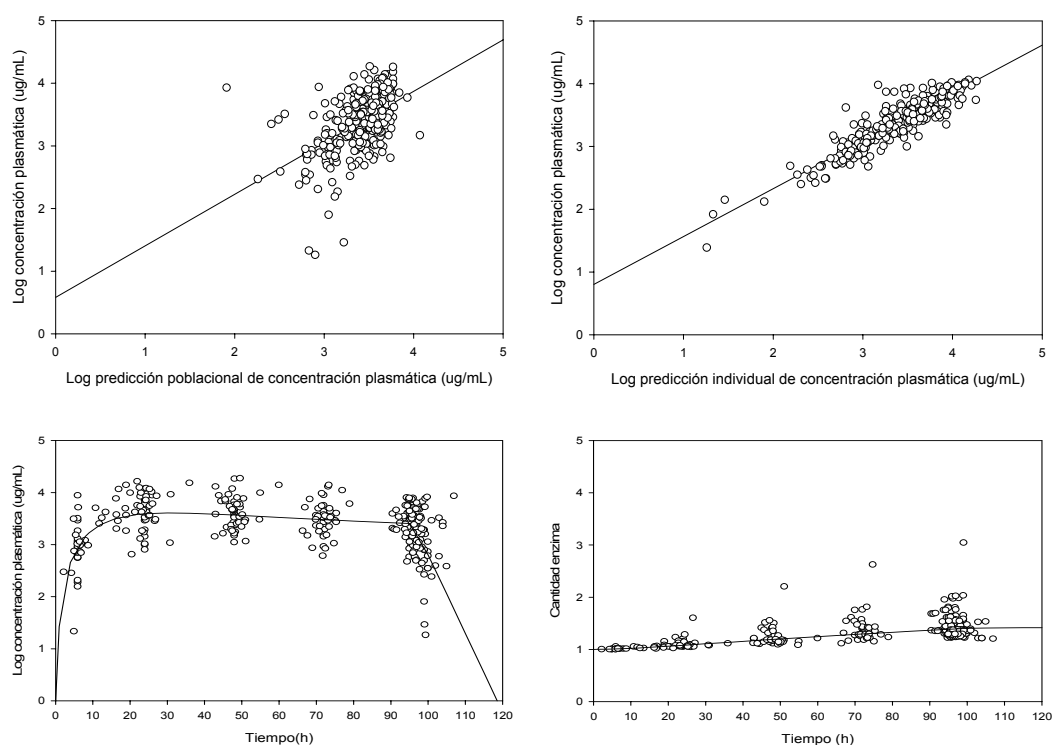


Figura V. 26 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 4 (EE-9). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run22b.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de la población obtenido con el ajustado EE-9 describe las concentraciones de ciclofosfamida observadas, teniendo en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV no alcanza un estado estacionario estable debido a la autoinducción de la ciclofosfamida.

La cantidad de enzima que ha sido obtenida a partir del ajustado vemos que inicialmente tiene un valor 1 (Enz basal), cuando el enzima se encuentra en estado estacionario y no hay ciclofosfamida circulando en el organismo. Vemos como cuando la ciclofosfamida esta presente en el organismo estimula la producción de enzima. El

perfil medio de la población al principio se pasa por en medio de los valores pero a las 48 horas vemos que queda por debajo.

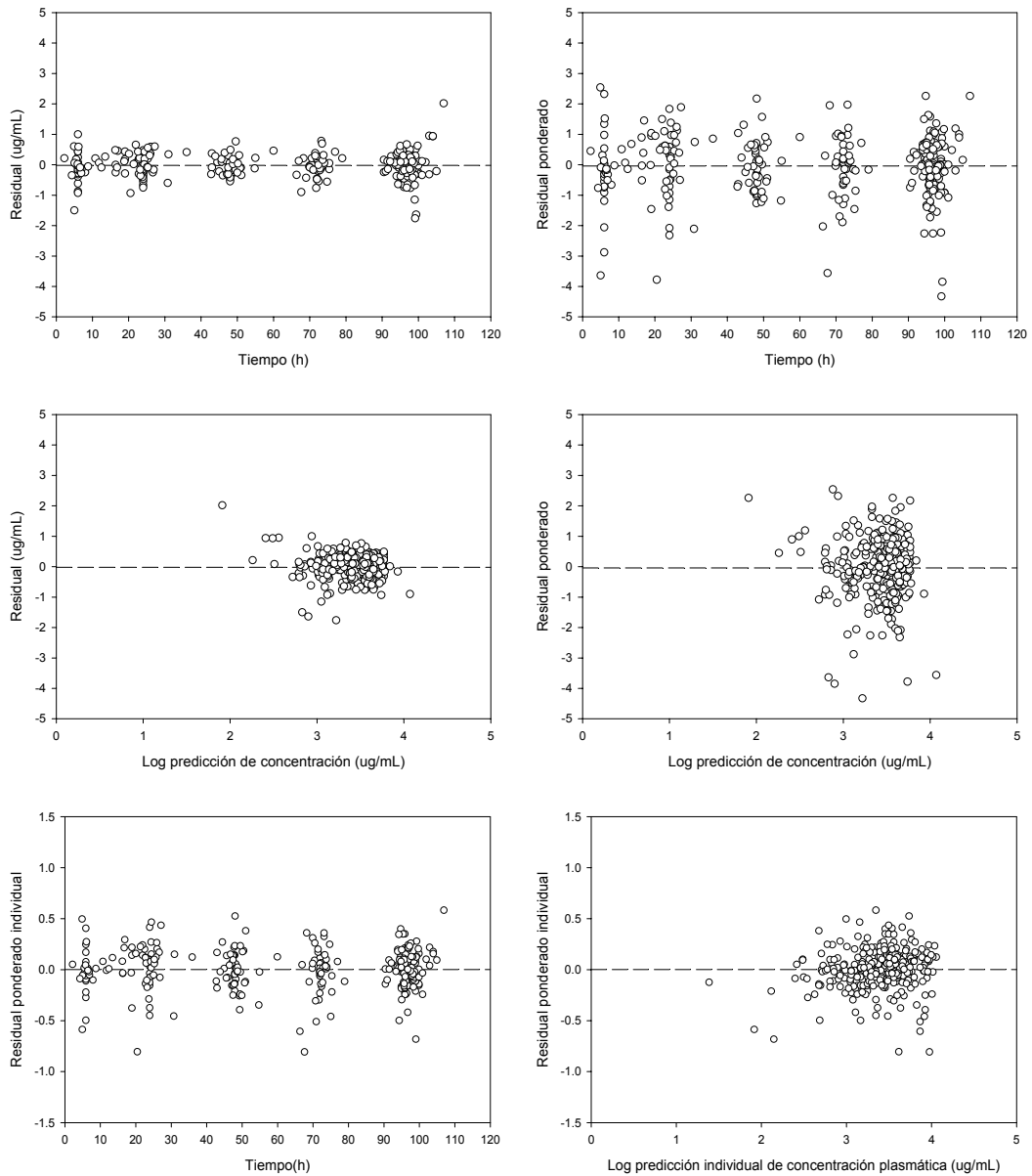


Figura V. 27 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 4 (EE-9) (Run22b.mod).

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.27).

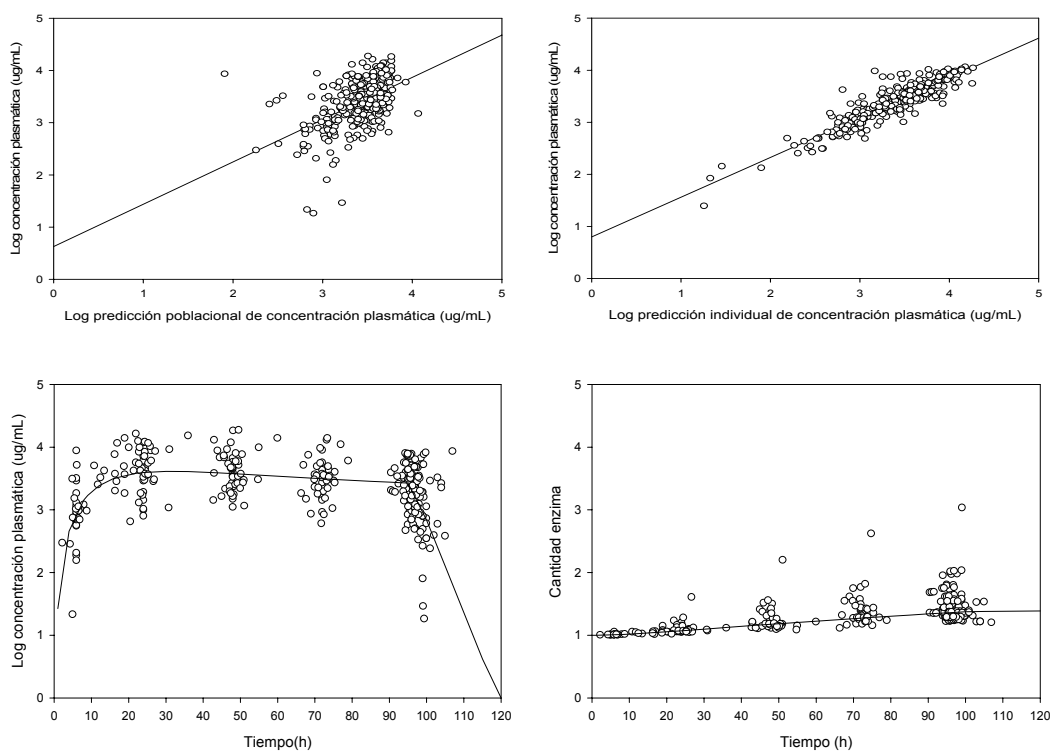


Figura V. 28 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 4 (EE-10). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run27.mod)

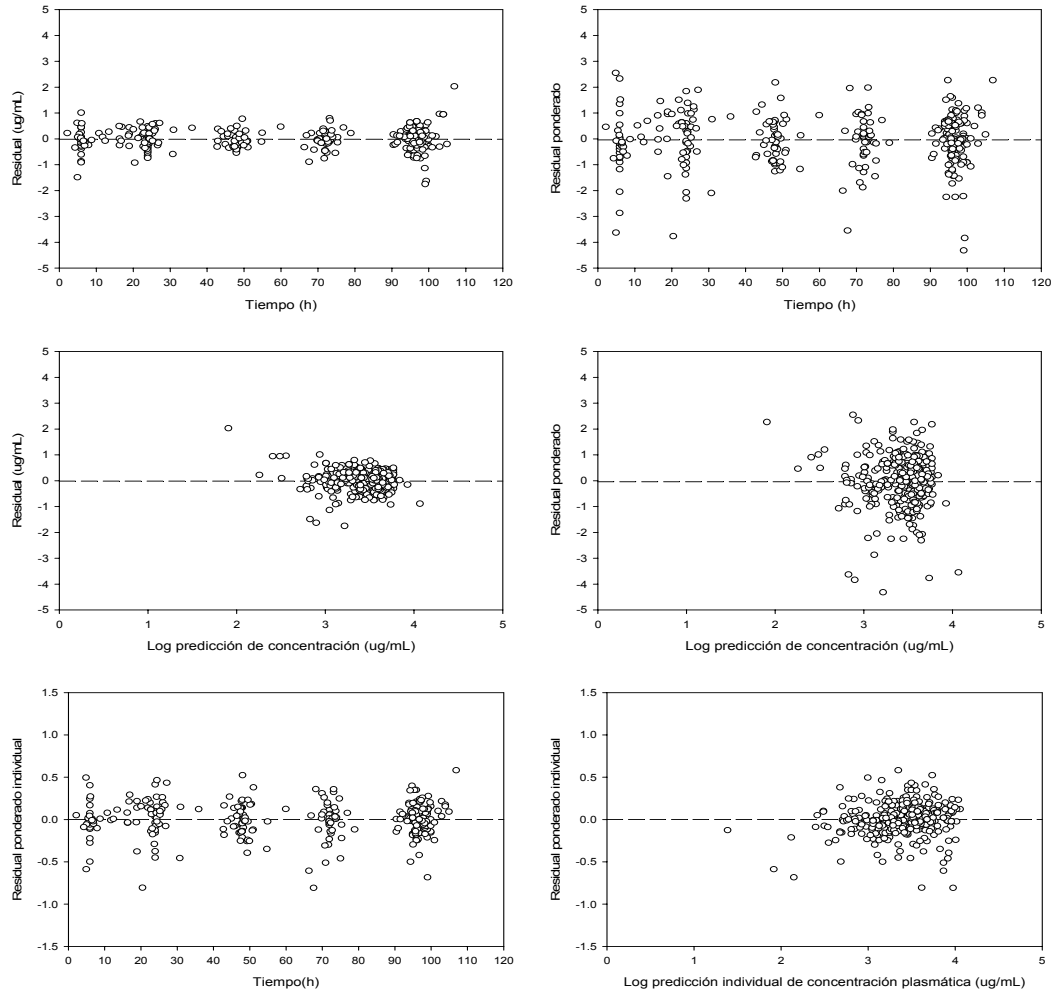


Figura V. 29 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 4 (EE-10) (run27.mod)

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.29).

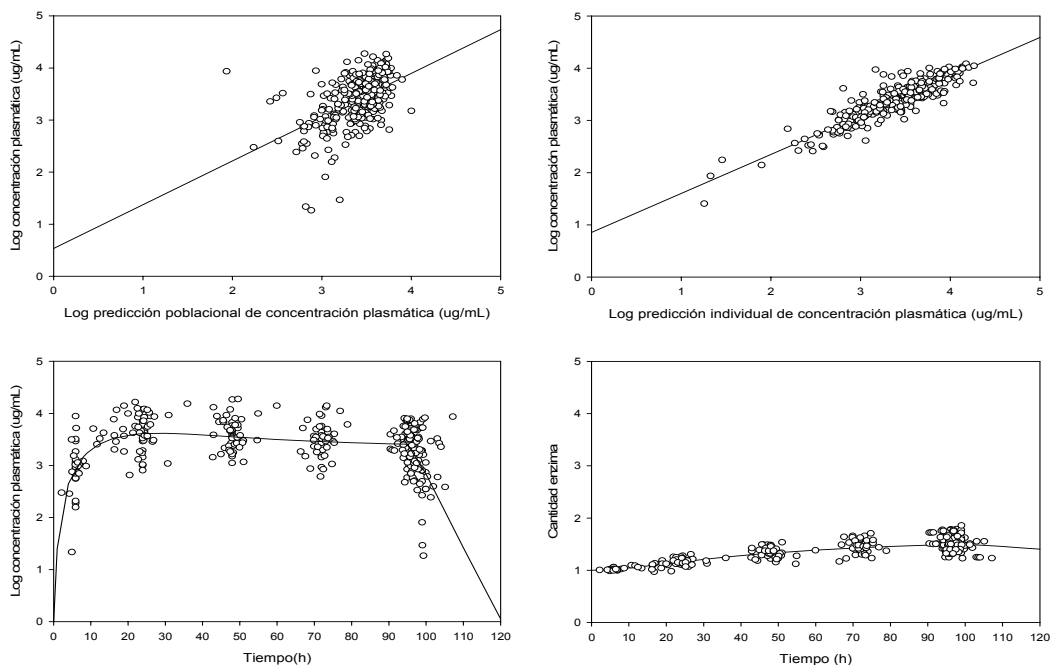


Figura V. 30 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 4 (EE-11). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 2. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run28b.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de la población obtenido con el ajustado EE-11 describe las concentraciones de ciclofosfamida observadas, teniendo en cuenta que la curva de concentración plasmática tiempo tras administración en perfusión IV no alcanza un estado estacionario estable debido a la autoinducción de la ciclofosfamida.

La cantidad de enzima que ha sido obtenida a partir del ajustado vemos que inicialmente tiene un valor 1 (Enz basal), cuando el enzima se encuentra en estado estacionario y no hay ciclofosfamida circulando en el organismo. Vemos como cuando la ciclofosfamida esta presente en el organismo estimula la producción de enzima. El perfil medio de la población describe la cantidad de enzima pasando por en medio de los valores estimados de enzima.

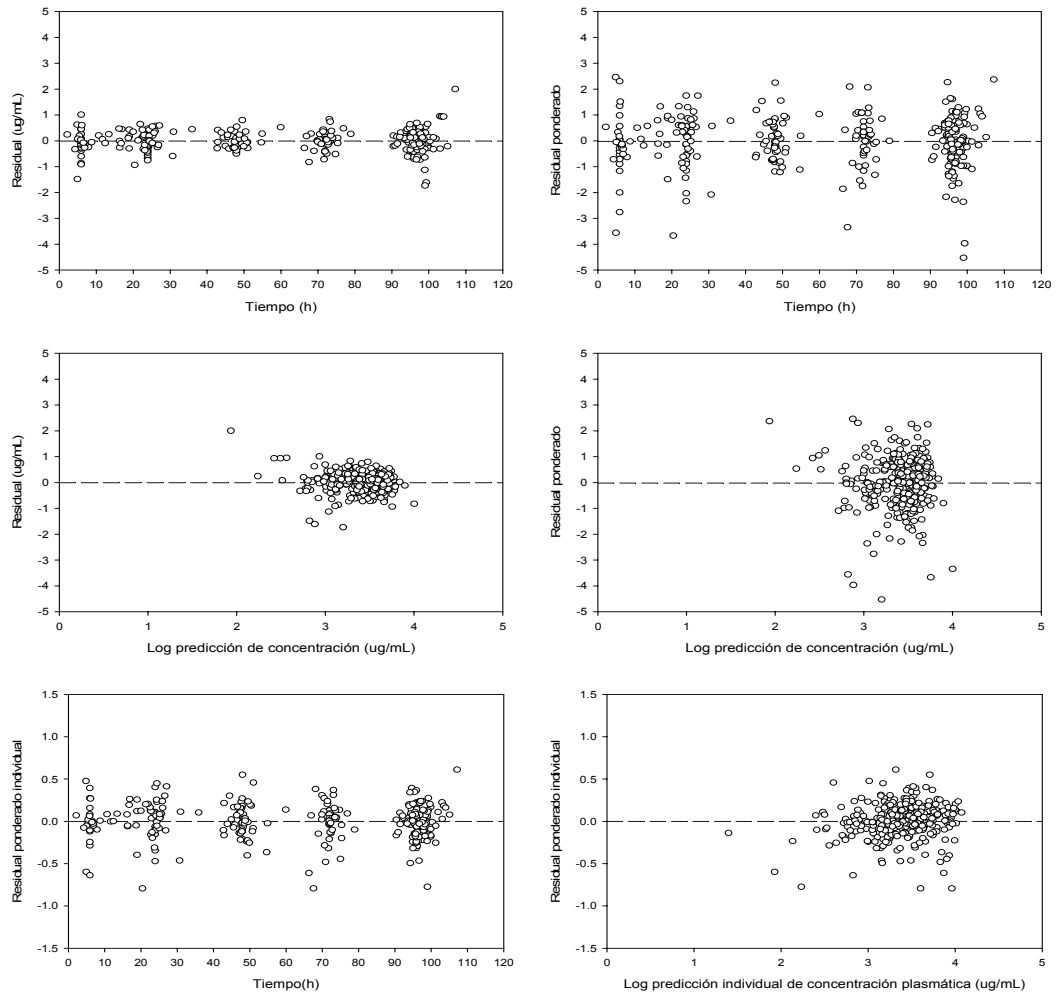


Figura V. 31 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 4 (EE-11) (run28b.mod)

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.31).

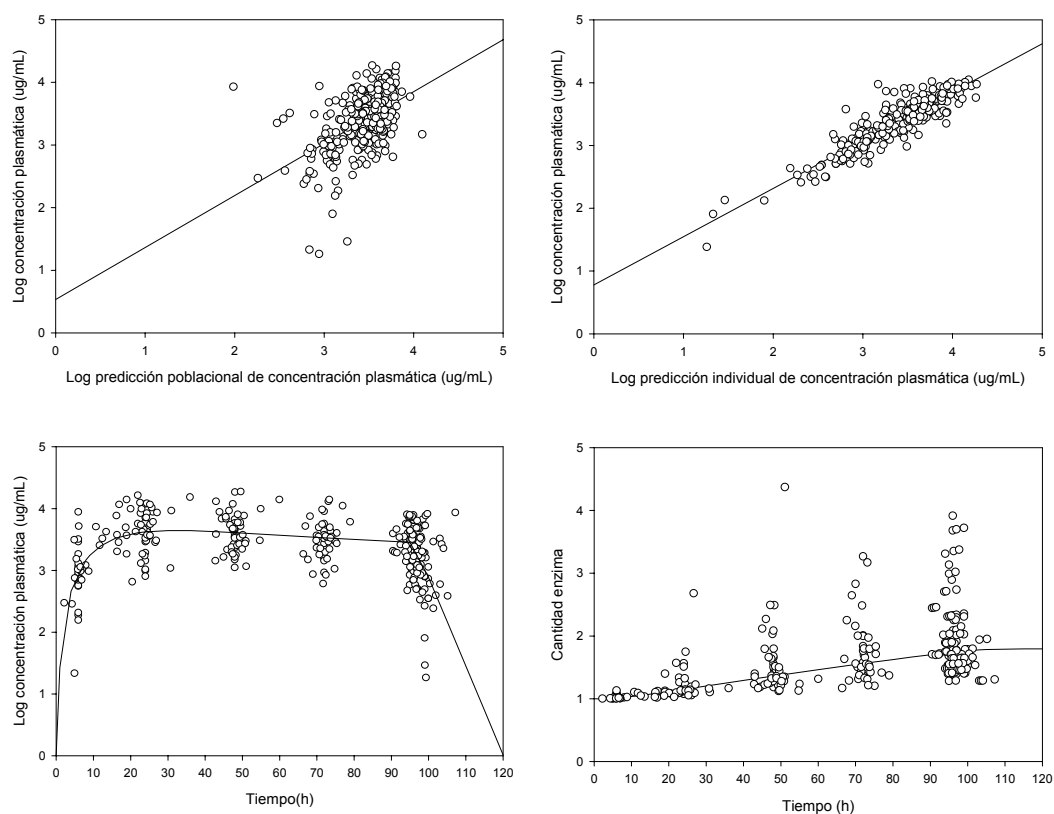


Figura V. 32 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 4 (EE-12). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 4. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run46a2.mod)

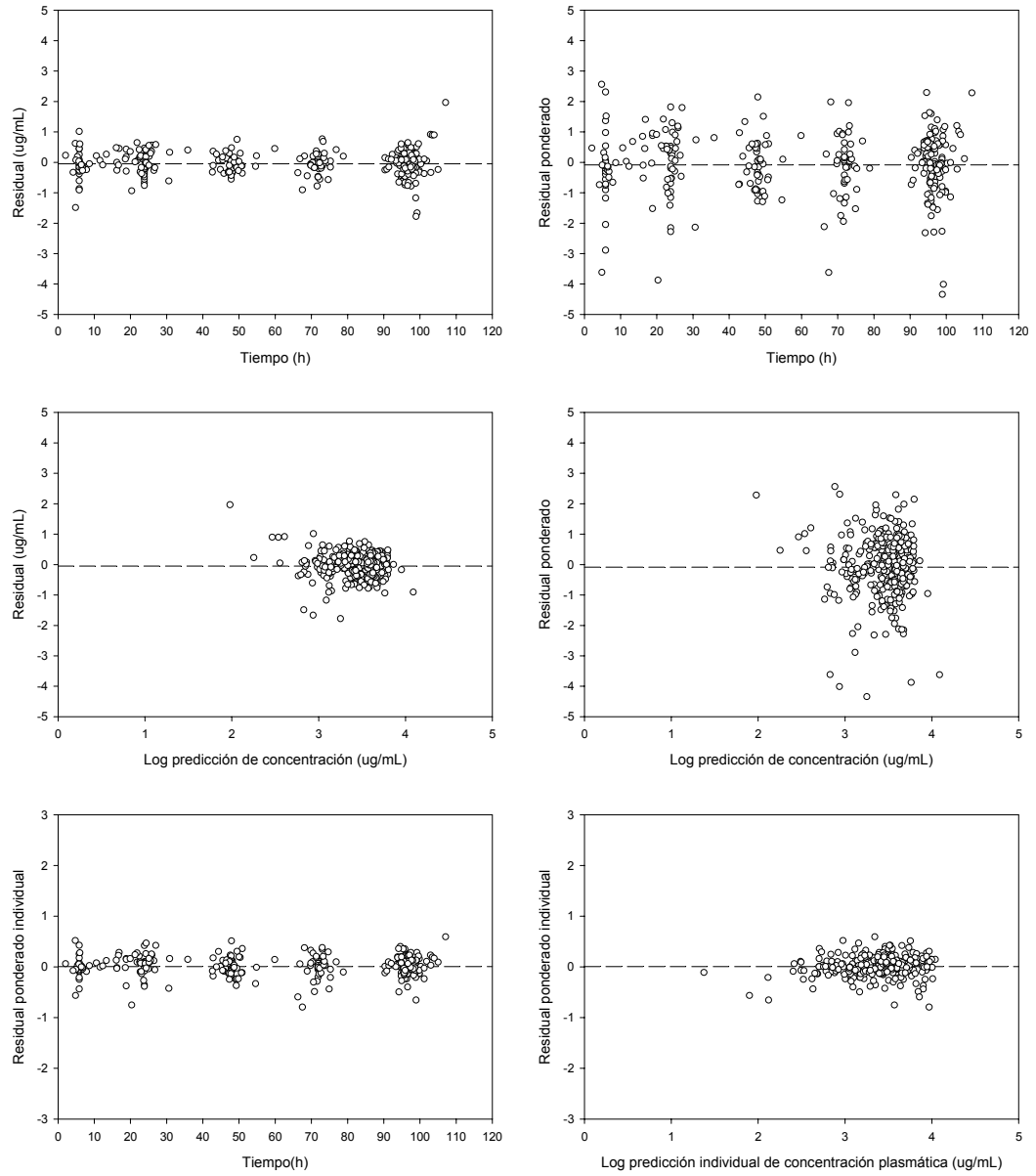


Figura V. 33 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 4 (EE-12). (run46a2.mod)

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales (Figura V.33).

Las distribuciones de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros, CL (ETA_CL), V (ETA_V), K_{ENZ} (ETA_K_{ENZ}) y SCp(ETA_SCp) para el modelo 4, ajustados EE-9, EE-10, EE-11 y EE-12 se pueden observar en las siguientes figuras V.34, V.35 y V.36 revelando una distribución alrededor de cero en los estimados de estos parámetros.

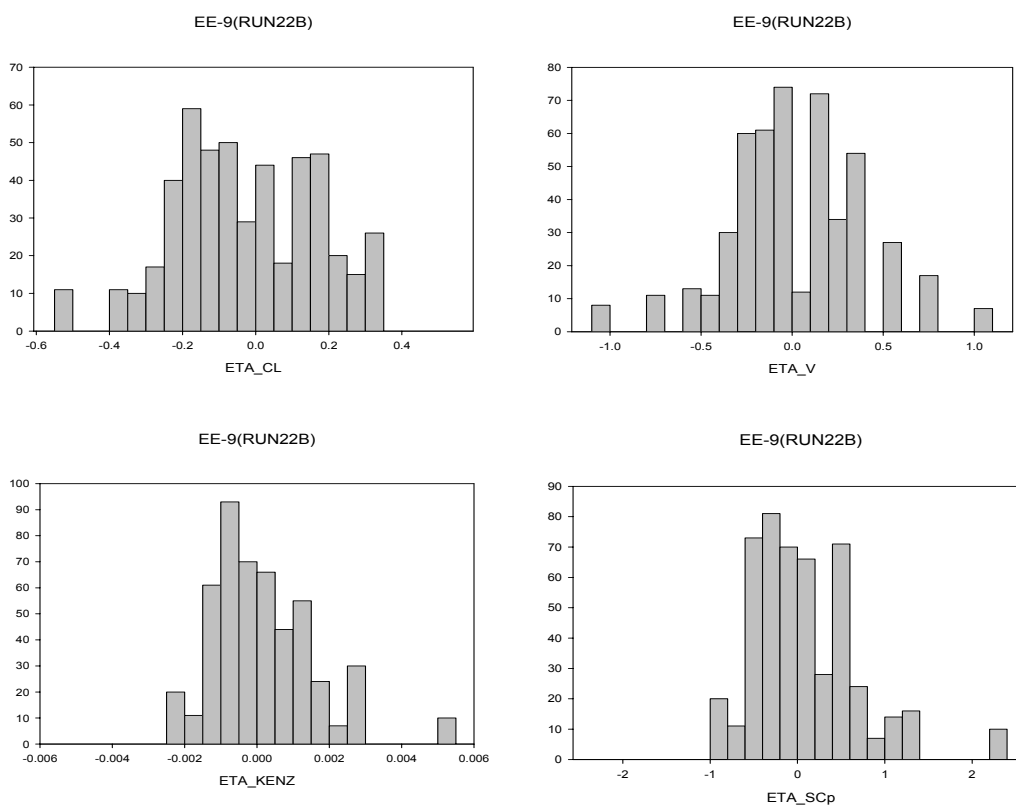


Figura V. 34 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros (ETA_CL, ETA_V, ETA_K_{ENZ} y ETA_SCp) para el modelo 4, ajustado EE-9.

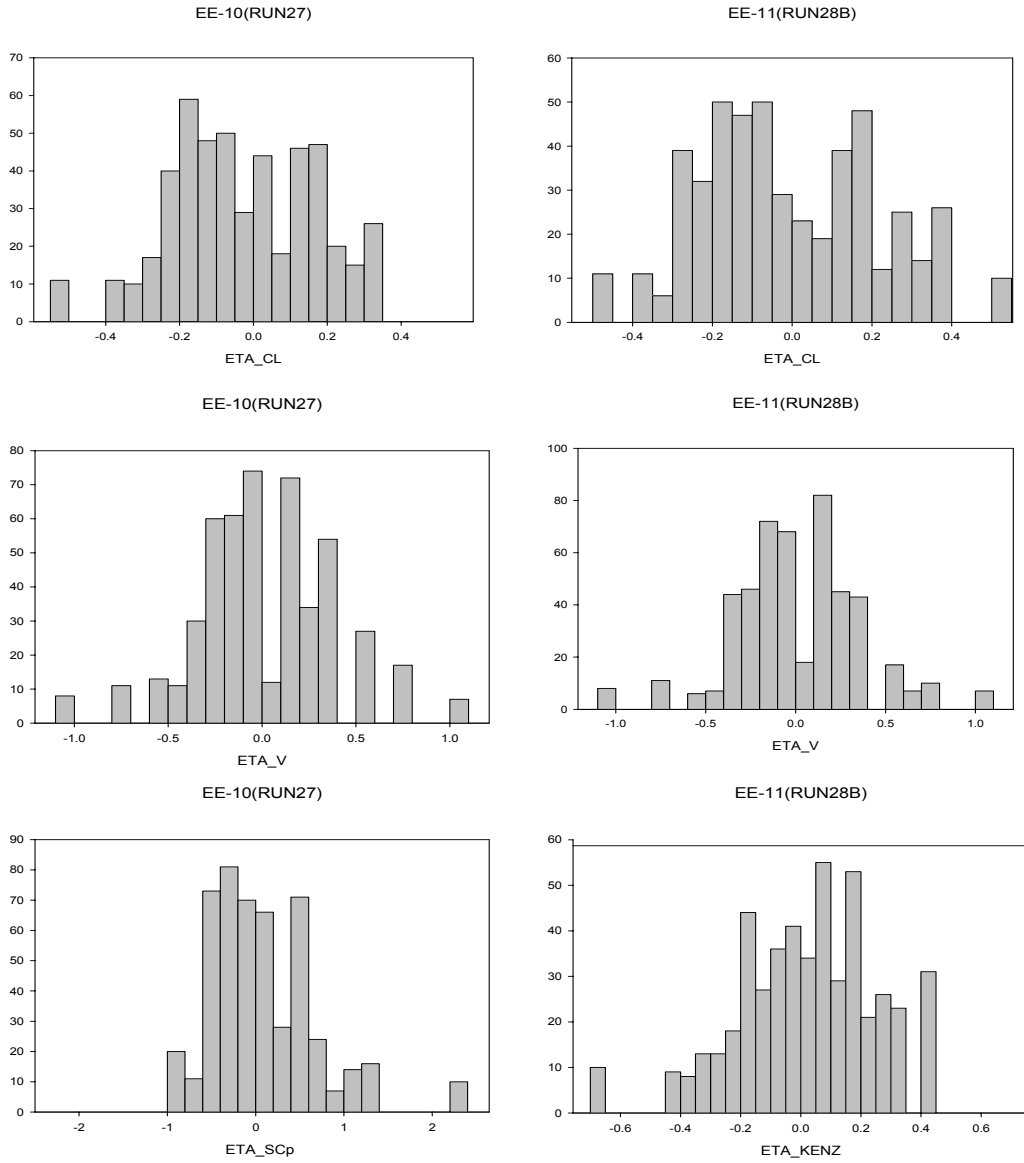


Figura V. 35 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros (ETA_{CL} , ETA_{V} , ETA_{SCp} y ETA_{KENZ}) para el modelo 4, ajustados EE-10 y EE-11.

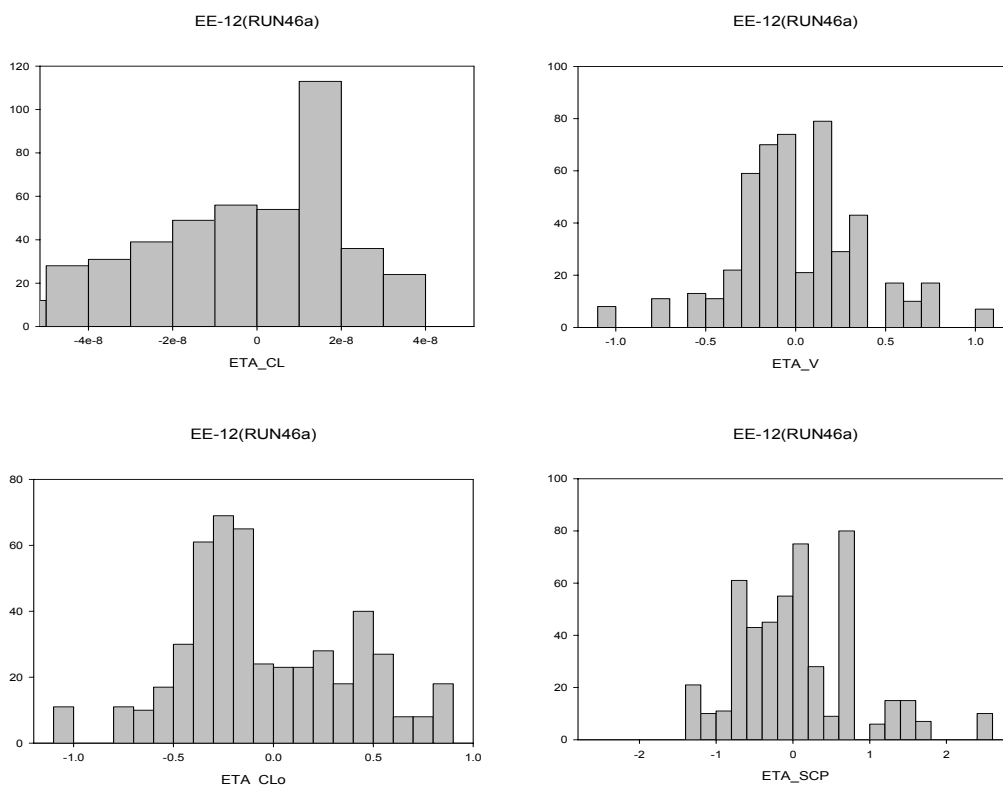


Figura V. 36 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros (η_{CL} , η_V , η_{CLo} y η_{SCP}) para el modelo 4, ajustado EE-12.

Se puede apreciar que la distribución de los valores de variabilidad interindividual del aclaramiento plasmático es bimodal en todos los ajustados de este modelo 4, excepto en el EE-12 donde al estimar dos aclaramiento inducible y no inducible hace que el aclaramiento no sea bimodal (Figuras V.34, V.35 y V.36)

Tabla V. 16 Shrinkage_ETA

		Shrinkage_ETA (%)				
		Sh_ETA _{CL}	Sh_ETA _V	Sh_ETA _{KENZ}	Sh_ETA _{SCP}	Sh_ETA _{CLO}
Modelo 4	EE-9	22.2	20.3	97.6	31.2	-
	EE-10	20.4	-	31.2	22.3	-
	EE-11	19.9	20.7	39.2	-	-
	EE-12	-	20.6	-	24.1	25.6

Los valores de shrinkage son inferiores 30% para el aclaramiento y el volumen de distribución en los ajustados EE-9, EE-10, EE-11 y EE-12. Para SCp los valores de shrinkage son inferiores 30% en los ajustados EE-10 y EE-12, sin embargo son superiores para el ajustado EE-9. El valor de shrinkage para CLo es inferior a 30% en el ajustado EE-12. Sin embargo para Kenz los valores de shrinkage son superiores 30% en los ajustados EE-9, EE-10 y EE-11 esto significa que no hay suficiente número de muestras por paciente para caracterizar de forma individual estos parámetros (Kallsson, 2007; Savic, 2008).

Tabla V. 17 Parámetros estadísticos de la recta de regresión entre las concentraciones plasmáticas observadas y la predicción individual de los modelos para ciclofosfamida modelo de varianza interindividual exponencial.

EE-9 (RUN22b)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.8015	0.0703	0.6632-0.9397	11.4086	<0.0001
Pendiente	0.7623	0.0206	0.7218-0.8028	37.0145	<0.0001
R*	0.9047	0.1681	0.8821-0.9232	26.1102	<0.0001
EE-10 (RUN27)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7981	0.0698	0.6619-0.9378	11.4275	<0.0001
Pendiente	0.7636	0.0205	0.7224-0.8033	37.3273	<0.0001
r*	0.9052	0.1675	0.8827-0.9235	26.2014	<0.0001
EE-11 (RUN28b)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.8538	0.0712	-1.3445-1.2757	11.9905	<0.0001
Pendiente	0.7472	0.0209	0.9588-1.0360	35.8008	<0.0001
r*	0.8988	0.1705	0.8749-0.9183	25.5595	<0.0001
EE-12 (RUN46a)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	0.7775	0.0686	0.6426-0.9124	11.3415	<0.0001
Pendiente	0.7683	0.0201	0.7288-0.8079	38.2355	<0.0001
r*	0.9096	0.1641	0.8888-0.9271	26.6365	<0.0001

*En este caso el estadístico de contraste es "z" no "t"

Los modelos EE-9, EE-10 y EE-12 los intervalos de confianza del 95% de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones individuales, no incluyen el valor 0 y 1, por tanto la relación entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones poblacionales e individuales difiere significativamente de la línea identidad.

El modelo EE-11 los intervalos de confianza del 95% de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y

las predicciones individuales, incluyen el valor 0 y 1, por tanto la relación entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones poblacionales e individuales no difiere significativamente de la línea identidad.

Los parámetros obtenidos con el **modelo 5**, con inducción enzimática lineal teniendo en cuenta los metabolizadores rápidos y lentos, asumiendo dos subpoblaciones de aclaramiento, ajustado EE-13 descrito en la tabla V.18.

Tabla V. 18 Parámetros farmacocinéticos estimados (error estándar) mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, con un modelo de varianza interindividual exponencial modelo 5 con inducción lineal. Modelo de Hassan modificado.

Parámetros	Modelo 5	
	EE-13(run38b5)	
	Parámetros (error estándar)	Intervalo de confianza 95%
CL(L/h)	1.70(0.231)	1.25-2.15
Δ CL(L/h)	1.30 (0.189)	0.93-1.67
K_{ENZ} (h^{-1})	0.0179(0.007)	0.0042-0.0316
V(L)	23.7(2.64)	17.8-28.2
SCp(mL/ μ g h^{-1})	0.0212(0.007)	0.0075-0.0349
ω_C (%)	-	-
$\omega_{K_{ENZ}out}$ (%)	37.7 (27.4)	-16.0-99.4
ω_V (%)	46.2(25.8)	-4.36-96.7
ω_{SCp} (%)	-	-
σ_{CFA} (%)	49.0(2.09)	44.9-53.1
P (%)	43.1(10.2)	23.1-63.1
FMO(FOCEI)	-405.862	-
MPE(%)	0.688(7.50)	

MPE: Media de los errores de predicción (desviación estándar)

El **modelo 5**, ajustado EE-13 con el modelo de varianza interindividual y residual exponencial, alcanza para los parámetros, la varianza interindividual y residual, estimaciones precisas con errores estándares relativos (ERR) inferiores a los umbrales del 20% y 50%, respectivamente, excepto para los parámetros K_{ENZ} y SCp , la variabilidad interindividual de K_{ENZ} donde los errores son superiores a los umbrales (33.07, 40.45 y 52.89 %, respectivamente) (Ette, 1993). No existe correlación entre ambos parámetros superior al valor umbral aceptado 0.75. Del mismo modo, no se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales. El modelo estructural EE-5 es considerado exacto porque MPE es menor que 15%, además las estimas de las variabilidades son consideradas exactas porque MPE es menor que 15%. La precisión del ajustado ha sido determinada por la desviación estándar de la media del error de predicción (Sheiner, 1981b; Faridan, 2000).

La inclusión del compartimento enzima (modelo 5, EE-13) mejora de forma significativa el ajustado de los datos experimentales, respecto al modelo 4 ajustado EE-11 (AIC (EE-13):-387.862; AIC (EE-11):-373.459).

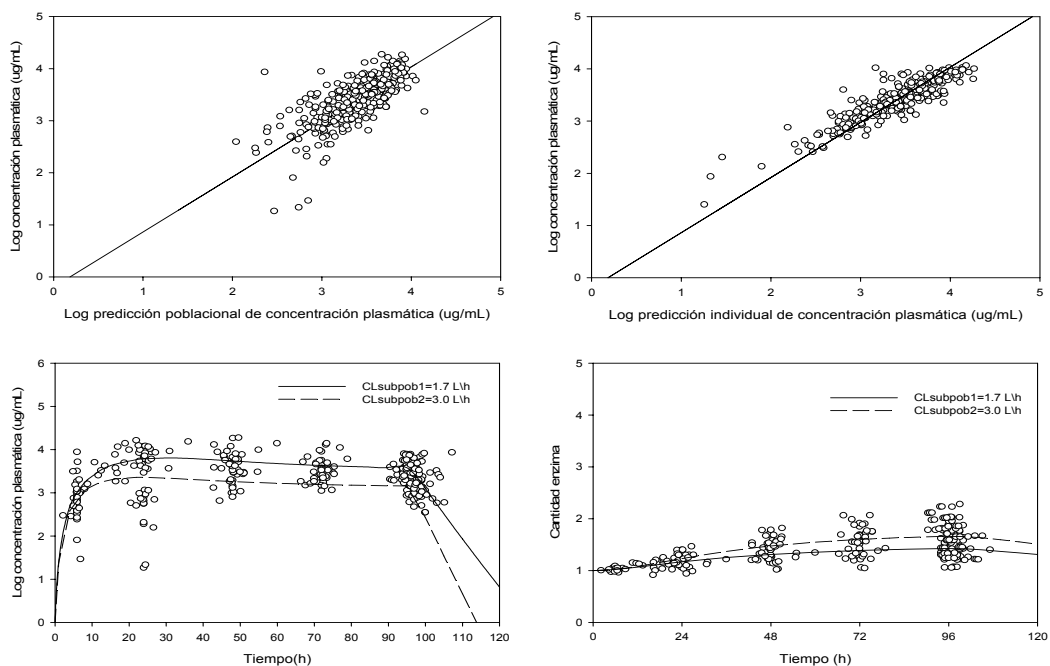


Figura V. 37 Relación entre las concentraciones plasmáticas obtenidas y las predicciones poblacionales e individuales por el modelo 5 para las dos subpoblaciones con aclaramiento 1.7 y 3.0 L/h (EE-13). Superposición en la relación concentración plasmática tiempo de un individuo medio de la población obtenida con modelo 5. Superposición en la relación cantidad de enzima tiempo de un individuo medio de la población (run38b5.mod)

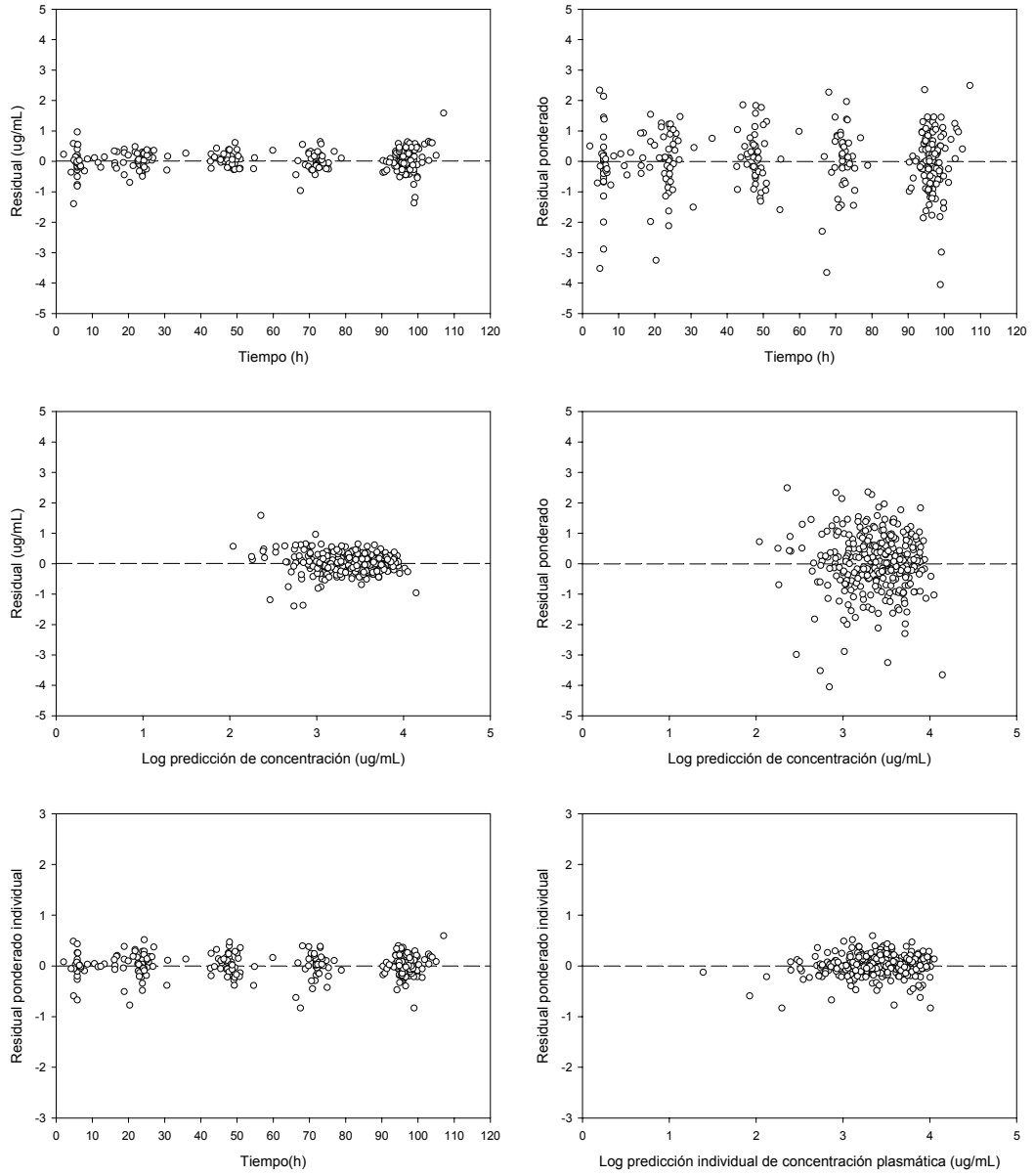


Figura V. 38 Evolución temporal de los residuales y los residuales ponderados poblacionales e individuales y su dispersión en función de la predicción por el modelo 5 para las dos subpoblaciones con aclaramiento 1.7 y 3.0 L/h (EE-13) (run38b5.mod).

Se observa que el perfil de un individuo medio de cada subpoblación obtenido con el ajustado EE-13 describe las concentraciones de ciclofosfamida observadas para pacientes con aclaramiento más bajo y por tanto niveles más altos y también las pacientes con aclaramiento mayor que hace que los niveles sean más bajos. Además cada curva es capaz de describir la autoinducción de la ciclofosfamida.

La cantidad de enzima que ha sido obtenida a partir del ajustado vemos que inicialmente tiene un valor 1 (Enz basal). Vemos como cuando la ciclofosfamida está presente en el organismo estimula la producción de enzima. El perfil medio de las subpoblación describe la cantidad de enzima pasando por en medio de los valores estimados de enzima para cada subpoblación.

No se observa un sesgo en la dispersión de los residuales ponderados, frente a la predicción de la concentración de ciclofosfamida que proporciona una distribución aleatoria de los residuales.

Las distribuciones de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros V (ETA_V) y K_{ENZ} ($ETA_{K_{ENZ}}$) para el modelo 5, ajustado EE-13 se puede observar en la siguiente figura V.39. revelando una distribución alrededor de cero en los estimados de estos parámetros.

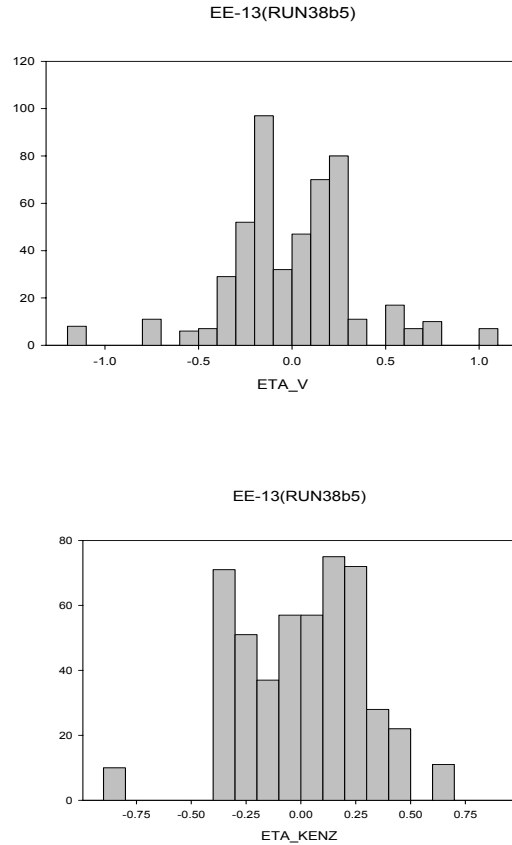


Figura V. 39 Distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros V y K_{ENZ} (ETA_V , ETA_{KENZ}) para el modelo 5, ajustado EE-13.

Tabla V. 19 .Shrinkage_ETA

Shrinkage_ETA (%)			
		Sh_ETA _V	Sh_ETA _{KENZ}
Modelo 5	EE-13	20.8	23.5

Los valores de shrinkage son inferiores 30% para el volumen de distribución y Kenz significa que existen suficientes muestras por paciente para caracterizar de forma individual los parámetros en cuestión (Karlsson, 2007; Savic, 2008).

En el modelo 5, ajustado EE-13 (run38b5.mod) no fue posible la incorporación simultánea un parámetro de efecto aleatorio para describir la evolución temporal del aclaramiento plasmático. En efecto, cuando se incorporaban la variabilidad, el modelo se encontraba sobreparametrizado y la estimación de un parámetro de variabilidad interindividual era tan próxima a 0 que obligaba a su eliminación del modelo. Además, la precisión de la estimación resultaba muy inestable. La variabilidad interindividual fue posible estimarla para K_{ENZ} y V .

Tabla V. 20 Parámetros estadísticos de la recta de regresión entre las concentraciones plasmáticas observadas y la predicción poblacional de los modelos para ciclofosfamida, modelo de varianza interindividual exponencial.

EE-13 (RUN38b5)	Coefficiente	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	t	p
Ordenada	-0.1955	0.1021	-0.3963-0.0053	-1.9154	0.0564
Pendiente	1.0571	0.0300	0.9981-1.1160	35.2663	<0.0001
r*	0.8961	0.2219	0.8716-0.9161	25.3592	<0.0001

*En este caso el estadístico de contraste es "z" no "t"

Con el modelo EE-13 los intervalos de confianza del 95% de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión lineal entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones individuales, incluyen el valor 0 y 1, por tanto la relación entre la concentración de ciclofosfamida y las predicciones poblacionales e individuales no difiere significativamente de la línea identidad.

En las figuras V.40 a la V.48. se presenta la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida (observaciones) y predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) de las concentraciones de ciclofosfamida estimados mediante el modelo 5 ajustado EE-13 para las 52 pacientes.

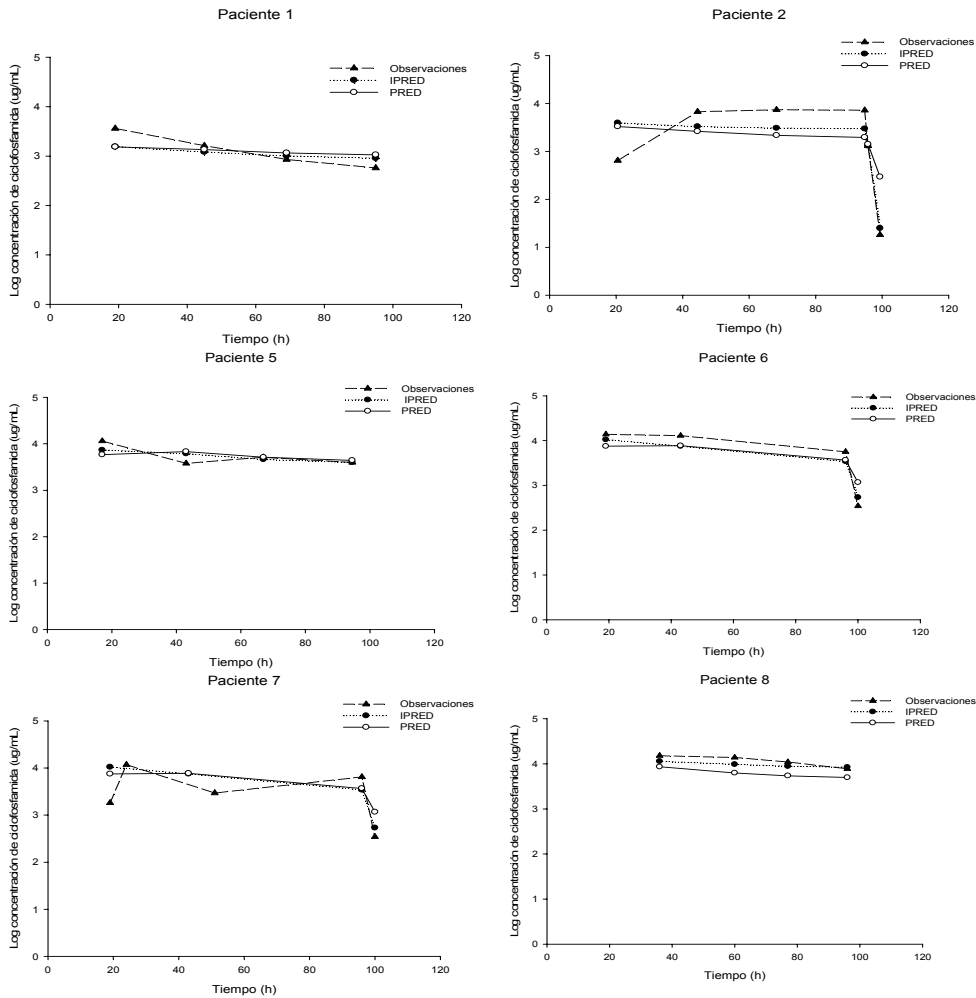


Figura V. 40 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

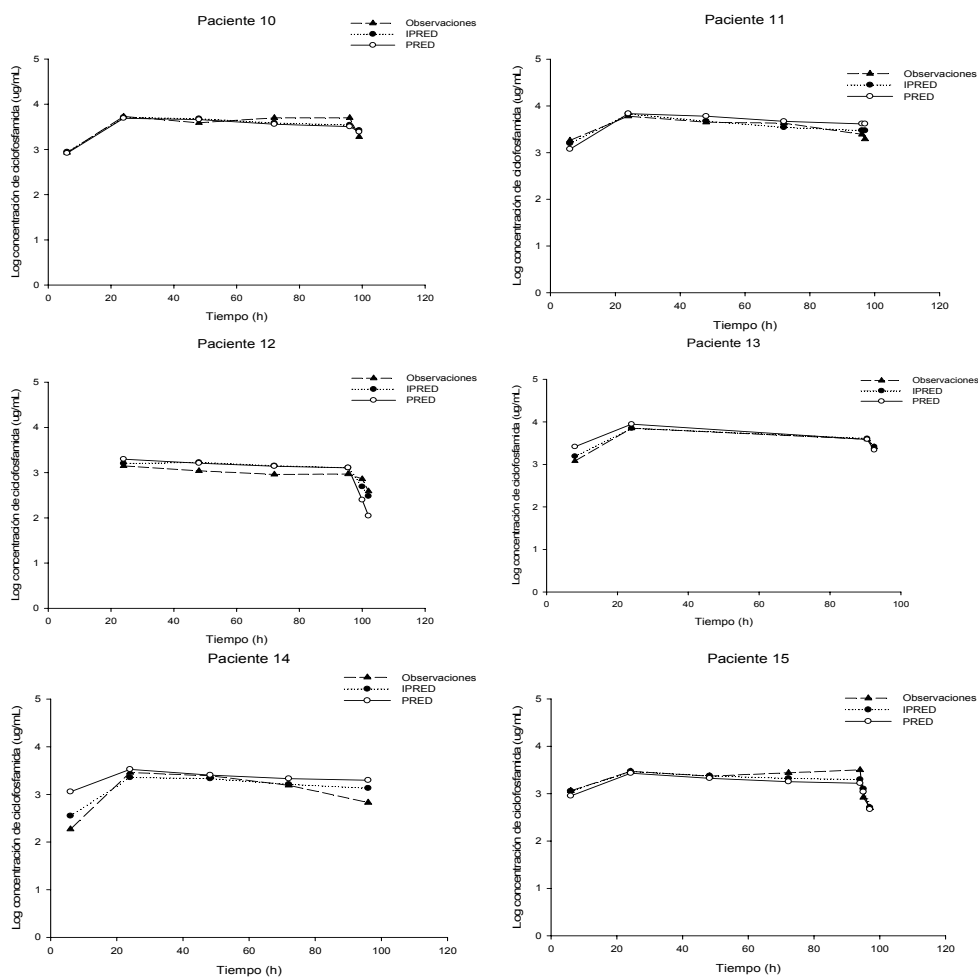


Figura V. 41 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida (µg/mL) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

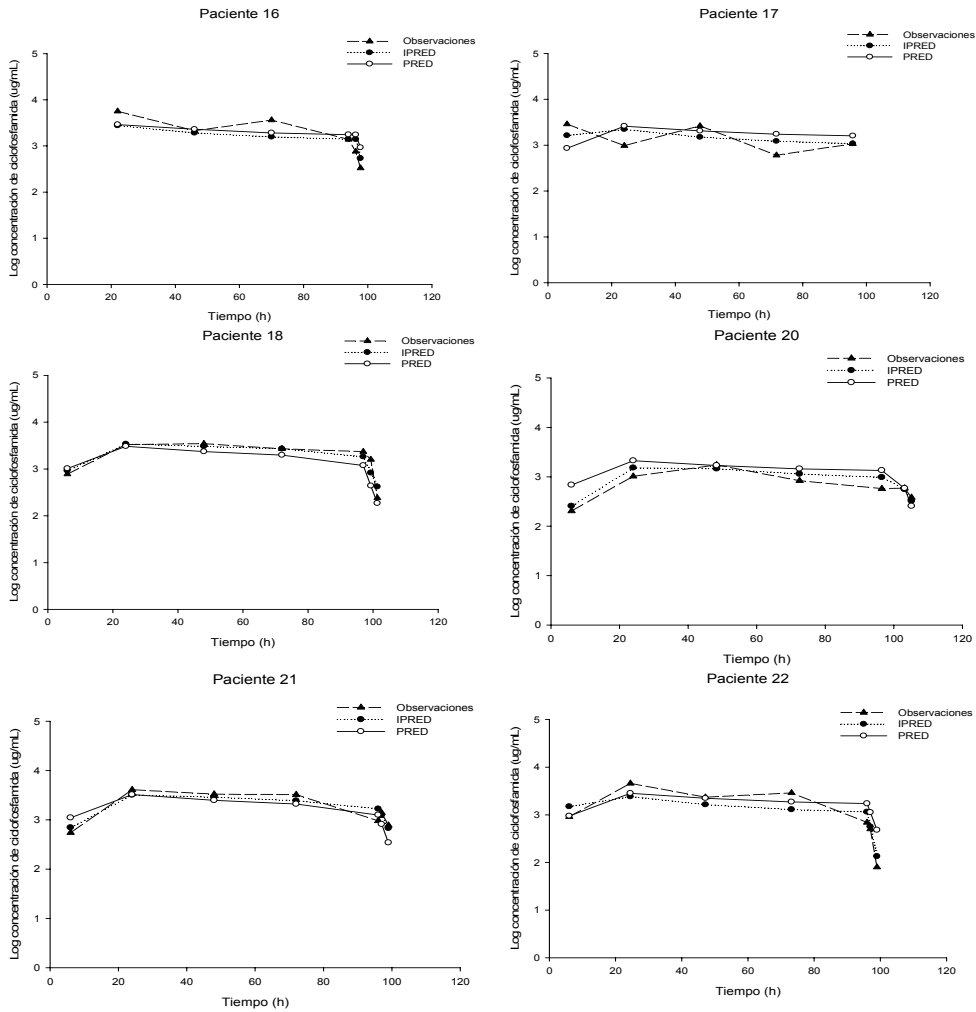


Figura V. 42 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g/mL}$) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

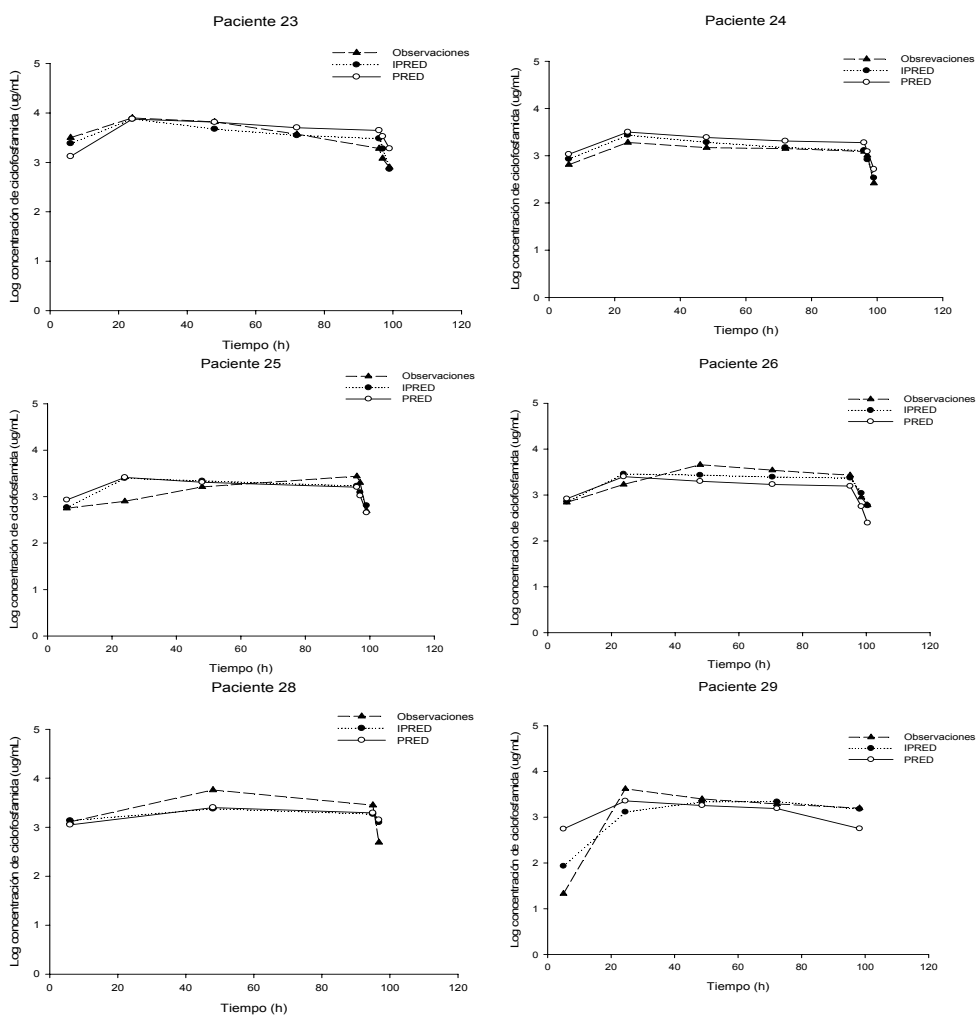


Figura V. 43 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida (µg/mL) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

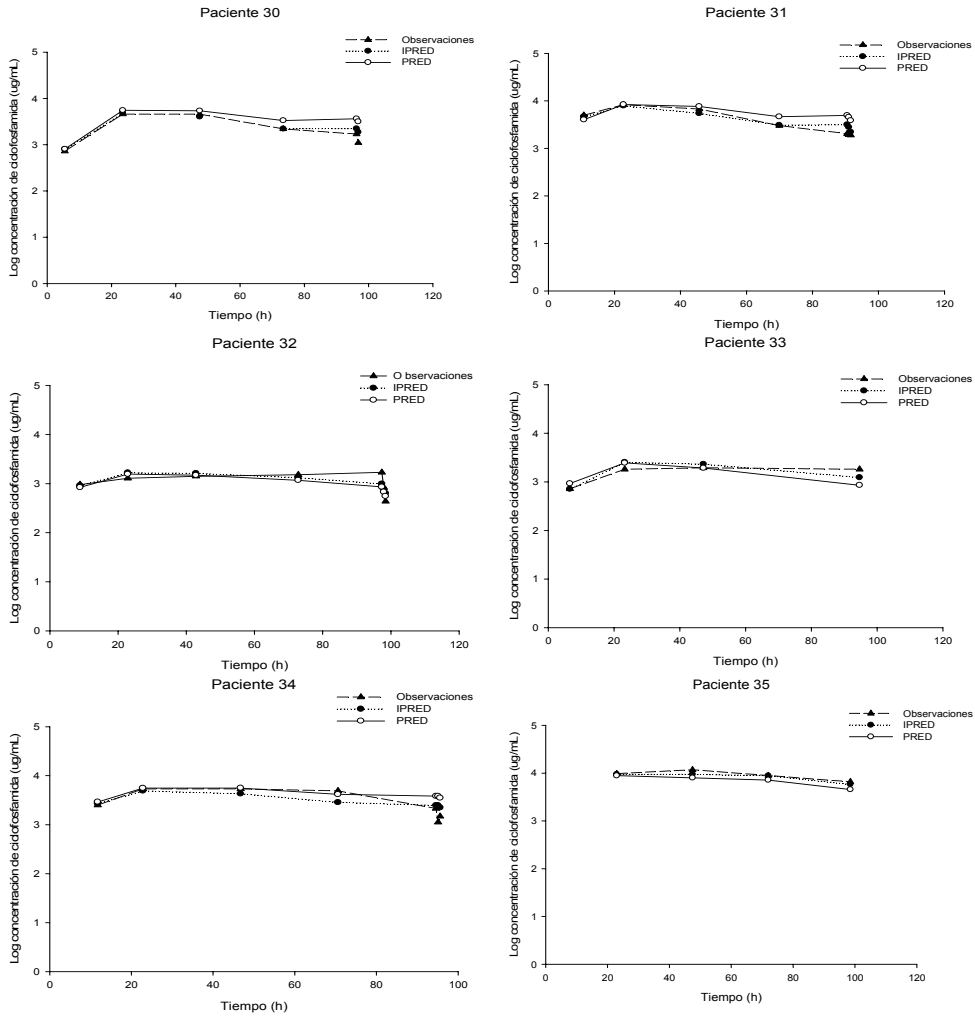


Figura V. 44 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g/mL}$) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

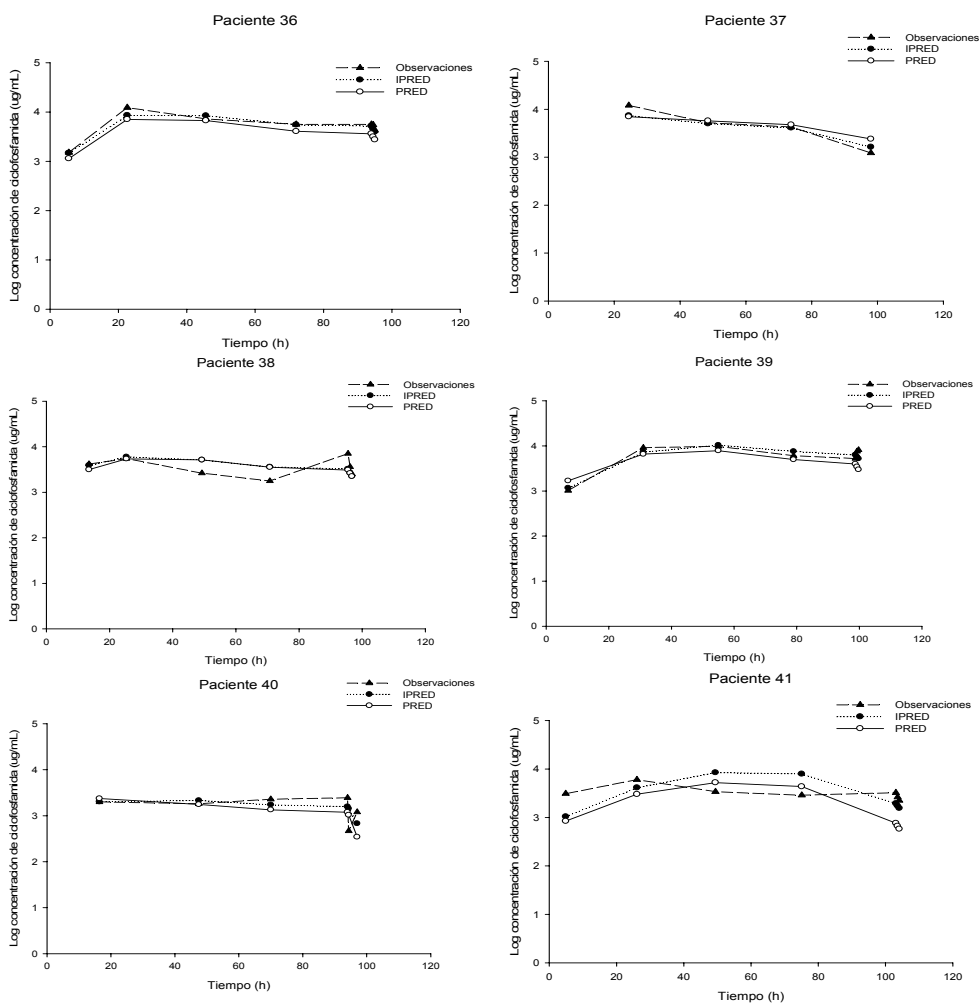


Figura V. 45 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

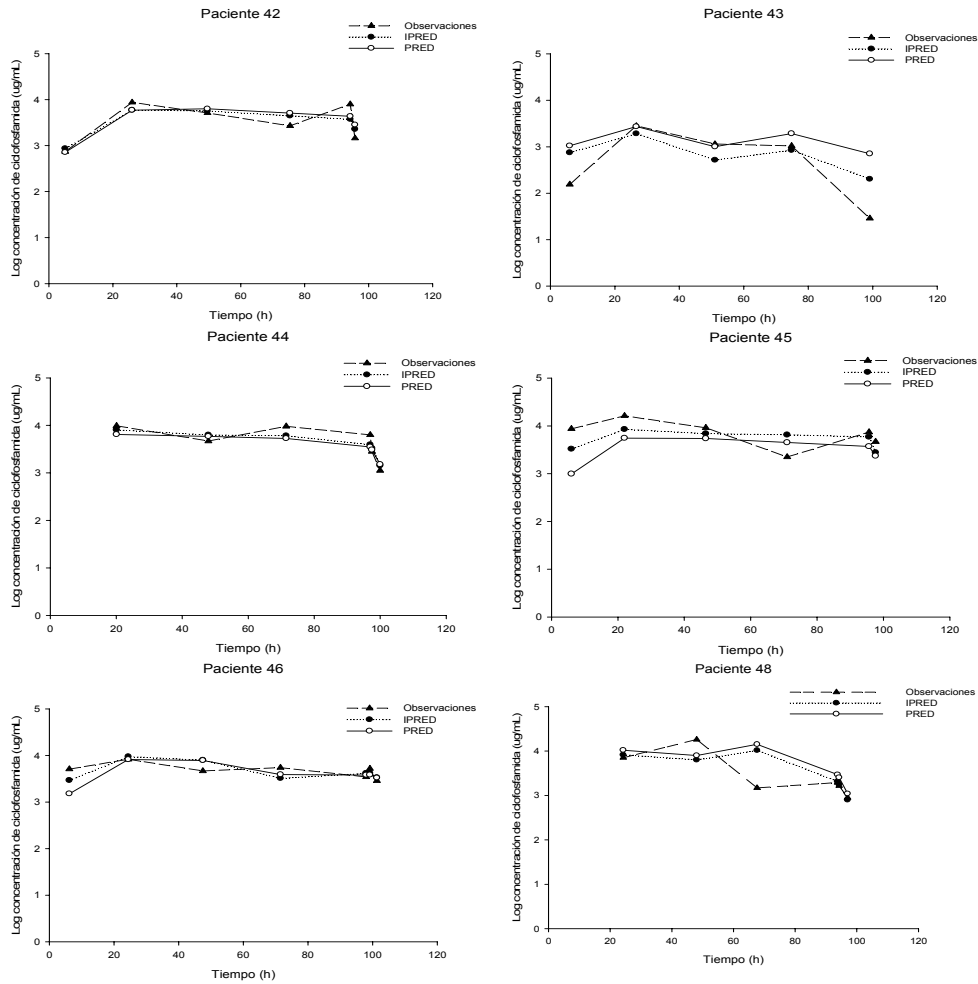


Figura V. 46 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g/mL}$) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

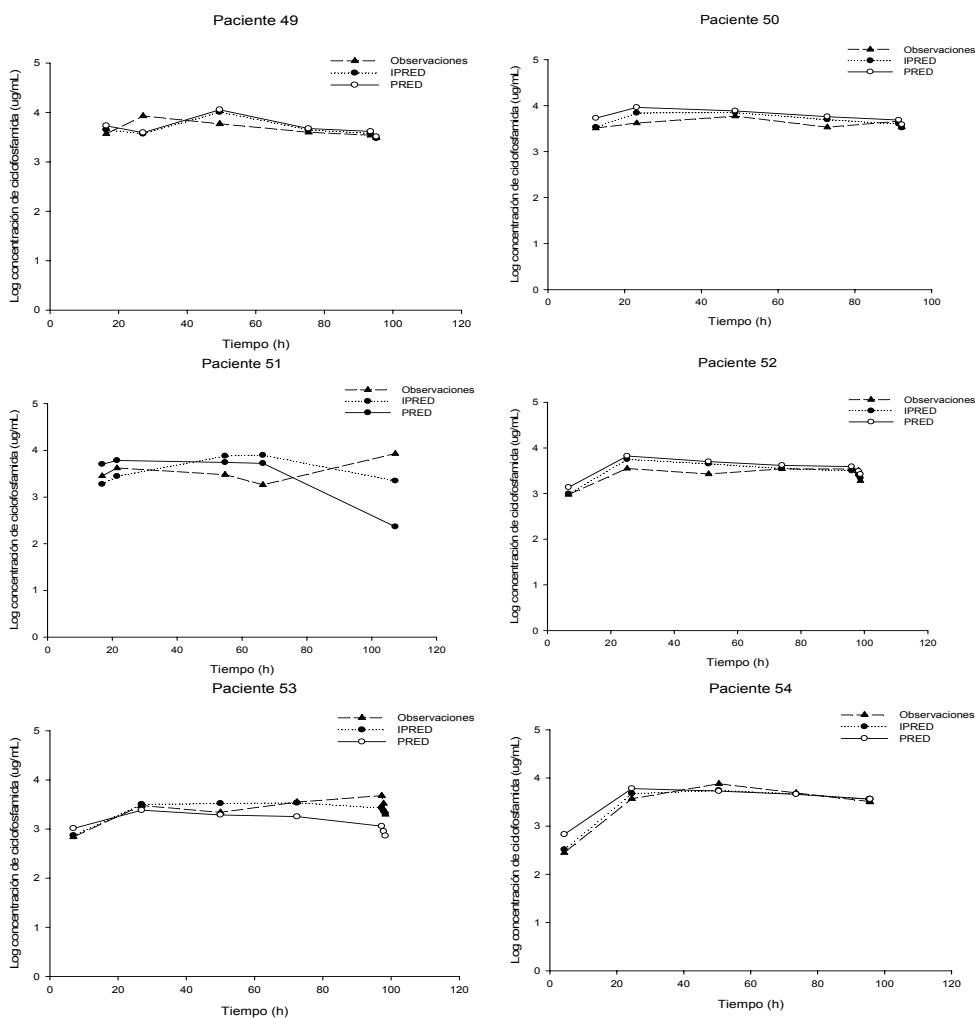


Figura V. 47 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida (µg/mL) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

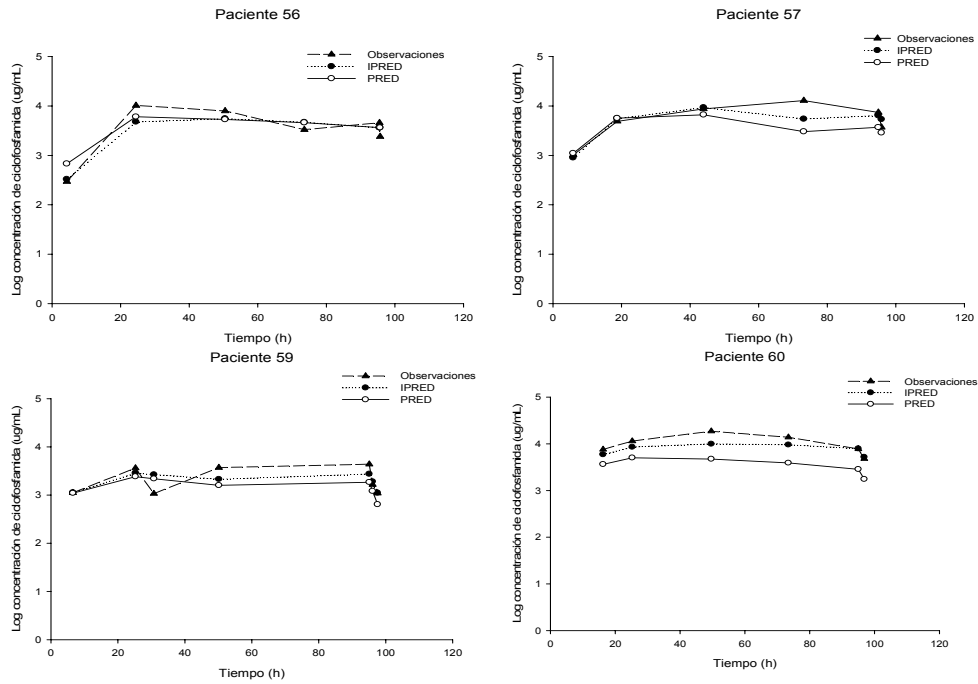


Figura V. 48 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g/mL}$) en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

En la figura V.49 se presenta a modo de ejemplo dos pacientes de cada una de las subpoblaciones, la paciente 43 perteneciente a la subpoblación con aclaramiento plasmático 3 L/h y por lo tanto tiene niveles más bajos. La paciente 23 perteneciente a la subpoblación con aclaramiento plasmático 1.7 L/h, tiene niveles más altos. En el Anexo 7, se presenta la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida para cada paciente y en el Anexo 8, se describe a que subpoblación pertenece cada paciente.

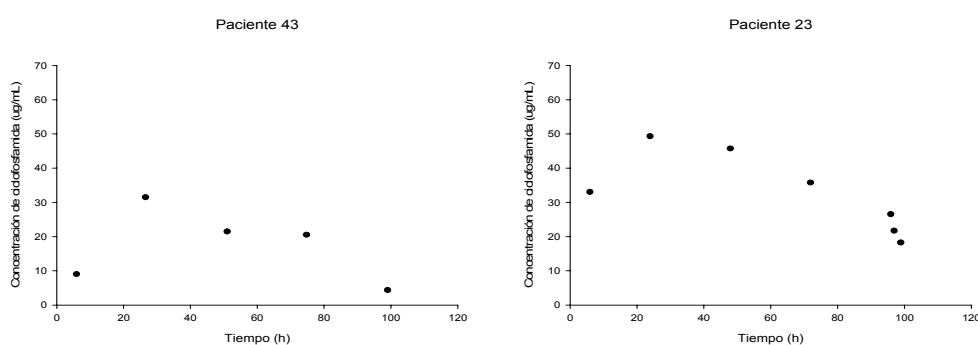


Figura V. 49 Evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida en función de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 para cada paciente (run38b5.mod).

En la figura V.50 se presenta la superposición de evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) de las concentraciones de ciclofosfamida obtenidos con el modelo 5 ajustado EE-13 para las 52 pacientes respecto al tiempo. Se puede observar como están divididas las dos subpoblaciones tanto en las predicciones poblacionales como individuales. En el Anexo 8, se describe a que subpoblación pertenece cada paciente.

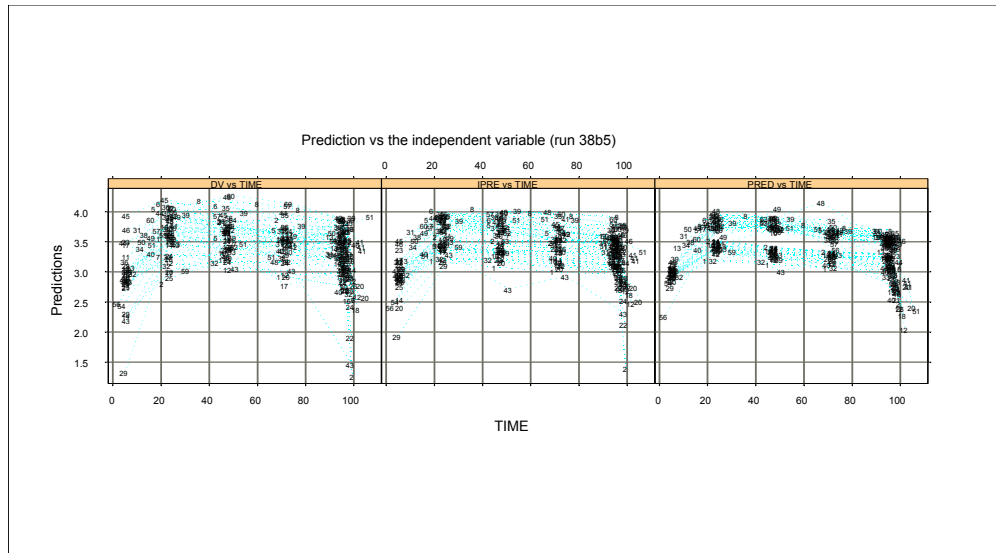


Figura V. 50 Evolución temporal de superposición de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida de las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 para cada paciente respecto al tiempo.

En la figura V.51 se presenta la relación entre los valores de variabilidad interindividual de los parámetros obtenidos con el modelo 5 ajustado EE-13. Donde ETA1 y ETA2 corresponden a los valores de variabilidad interindividual de los parámetros K_{ENZ} y V , respectivamente.

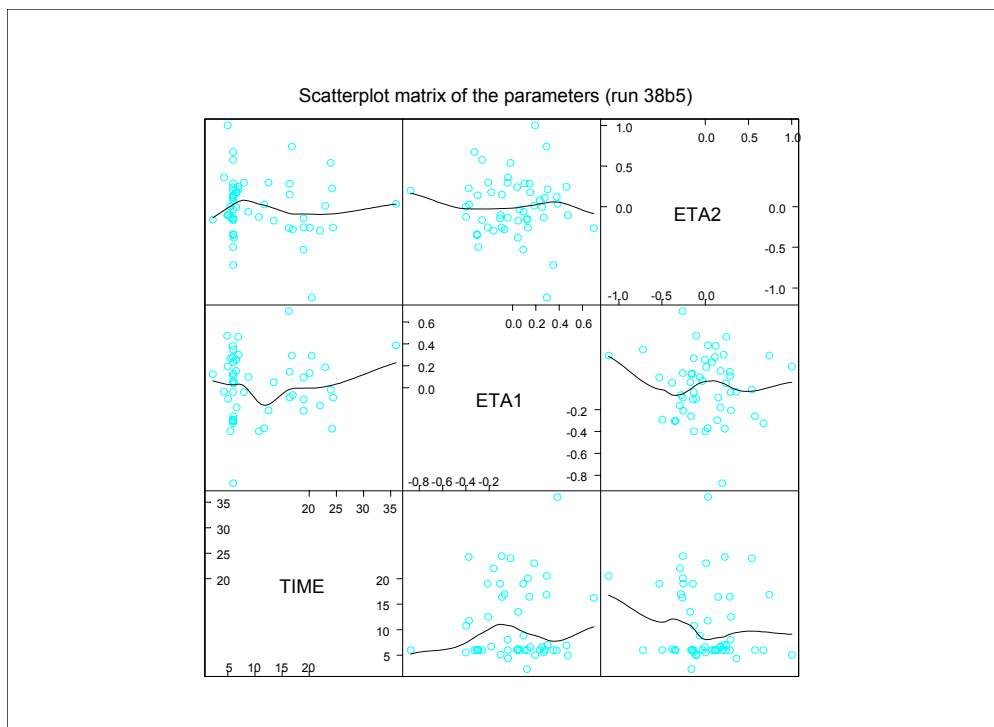


Figura V. 51 Relación entre los valores de variabilidad interindividual de los parámetros obtenidos con el modelo 5 ajustado 13 (run38b5.mod).

La tabla V. 21 es un resumen de número de parámetros, método de estimación, FMO y AIC para poder comparar los modelos entre sí.

Tabla V. 21. Resumen de la FMO y los AIC para cada modelo.

		N parámetros	Met estimación	FMO	AIC
Modelo 1	EE-1	5	FO	1739.946	-
	EE-2	5	FOCEI	-361.667	-
	EE-3	5	FOCEI	-356.955	-346.955
Modelo 2	EE-4	9	FOCEI	-391.186	-
	EE-5	7	FOCEI	-391.124	-377.124
Modelo 3	EE-6	9	FOCEI	-391.225	-
	EE-7	7	FOCEI	-391.151	-377.151
	EE-8	8	FOCEI	-393.762	-
Modelo 4	EE-9	9	FOCEI	-389.476	-
	EE-10	8	FOCEI	-389.459	-
	EE-11	8	FOCEI	-389.982	-373.459
	EE-12	9	FOCEI	-391.422	-
Modelo 5	EE-13	9	FOCEI	-405.862	-387.862

En definitiva, considerando globalmente toda esta información el mejor ajuste de los datos experimentales en los modelos estudiados se obtiene con el modelo 5 ajustado EE-13 caracterizado como **modelo farmacoestadístico final**. En primer lugar, con este modelo se alcanza el menor valor de función mínima objetivo. Además, el EER de estimación de los parámetros de efecto fijo y efecto aleatorio no superan al valor umbral del 20 y 50%, respectivamente. El análisis del gráfico de dispersión de los residuales ponderados frente a la predicción hecha por el modelo poblacional y el gráfico de distribución de los residuales ponderados frente al tiempo para de ciclofosfamida, sugieren la ausencia de sesgo sistemático en el modelo. Además, en la tabla V.20. el análisis de regresión entre las concentraciones plasmáticas y las predicciones individuales con el modelo 5 ajustado EE-13 con un modelo de varianza residual e interindividual exponencial confirman la ausencia de un sesgo sistemático respecto a la línea identidad de los valores medios de las predicciones individuales realizadas con este modelo. Los parámetros farmacocinéticos poblacionales de ciclofosfamida, estimados mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, son el volumen de distribución 23.7 L (IC95% 17.8 a 28.2), aclaramiento plasmático 1.7 (IC95%: 1.25 a 2.15 L/h) y incremento del aclaramiento plasmático 1.3 L/h (IC95%:

0.93 a 1.67 L/h) que diferencia a las dos subpoblaciones, constante de inducción K_{ENZ} 0.0179 h⁻¹ (IC95%: 0.0042 a 0.0316 h⁻¹) y la pendiente SCp 0.0212 mL/ μ g·h⁻¹ (IC95%: 0.0075 a 0.0349 mL/ μ g·h⁻¹). La proporción de pacientes pertenecientes a cada subpoblación es 43.1% (IC95%: 23.1 a 63.1%). Es el modelo con AIC menor (tabla V.21).

En este punto se considera el modelo 5, ajustado EE-13 como modelo farmacostatístico final. Además describir mejor las concentraciones plasmáticas y explica mejor la autoinducción de la ciclofosfamida. La constante de eliminación del enzima alcanza las características aparentes por cuanto que existen diversos isoenzimas encargados de metabolizar la ciclofosfamida y distintos medicamentos que administrados concomitantemente provocan alteraciones del patrón metabólico de ciclofosfamida. Desde el punto de vista farmacogenómico, la existencia de diversos isoenzimas encargados de metabolizar la ciclofosfamida sugiere la posibilidad de identificar diferentes subpoblaciones de pacientes en cuanto a su perfil de autoinducción. Por otra parte, las interacciones farmacológicas condicionan la validez externa de los parámetros farmacocinéticos obtenidos. Con nuestro modelo somos capaces de diferenciar dos subpoblaciones con diferente aclaramiento, una subpoblación con un aclaramiento de 1.7 L/h que corresponde al 43.1 % de la población y la otra subpoblación con un aclaramiento de 3.0 L/h que corresponde al 56.9 % de la población. De manera que en nuestra población existe una proporción de pacientes con un aclaramiento mayor.

Por tanto, el modelo 5 ajustado EE-13 con variabilidad interindividual exponencial sería el modelo utilizado para la exploración de las covariables.

V.3.1.2. Exploración de las covariables

Exploración de las covariables predictoras comienza mediante la estimación los valores de variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos y el análisis exploratorio de las potenciales relaciones entre las covariables predictoras y cada uno de los parámetros farmacocinéticos. Así, se analizó la posible influencia de variables predictoras como la edad (AGE), el peso (PE), la fracción de eyección ventricular (FE). Además, al ingreso hospitalario se consideraron la creatinina sérica

(CR), las proteínas totales (PR), las enzimas hepáticos: AST (GO), ALT (GP), relación ALAT/ASAT (AS), GGT (GT) y LDH (LD), así como la hemoglobina (HB), las plaquetas (PL), la hemoglobina (HG), el tiempo de protrombina (TP), el tiempo protrombina parcial activada (TTPA), el fibrinógeno (FI) y bilirubina (BI). Además también se tuvo en cuenta la administración de antagonistas 5-HT3 (AE) (Anexo 8. Covariables).

Se exploró la distribución de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros obtenidos por el modelo 5 (ajustado EE-13) vs. las covariables identificadas como posible influencia de variables predictoras. En las Figuras V.48. a la V.53., se representan los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos (la línea de tendencia debería ser horizontal sino hubiese ninguna correlación).

El análisis gráfico y exploratorio permitió ver influencia entre las covariables predictoras y $ETA_{K_{ENZ}}$ (ETA1) para la edad (AG), la relación ALAT/ASAT (AS), la hemoglobina (HG), ALAT (GP), peso (PE), TTPA (TA), LDH (LD), ASAT (GO) y las proteínas totales (PR). Con la técnica estadística GAM, la discriminación entre modelos llevada a cabo mediante la comparación del criterio de información de Akaike determino que ninguna de las covariables analizadas eran susceptibles de ser incluidas en el modelo poblacional.

El análisis gráfico y exploratorio permitió ver influencia entre las covariables predictoras y ETA_V (ETA2) para a la fracción de eyección (FE), la relación ALAT/ASAT (AS), la administración de antagonistas 5-HT3 (AE), TTPA (TA), la LDH (LD), el tiempo de protrombina (TP) y ASAT (GO). Con la técnica estadística GAM, la discriminación entre modelos llevada a cabo mediante la comparación del criterio de información de Akaike determino que las covariables susceptibles de ser incluidas en el modelo poblacional la administración de antagonistas 5-HT3, ALAT (GP) y proteínas totales.

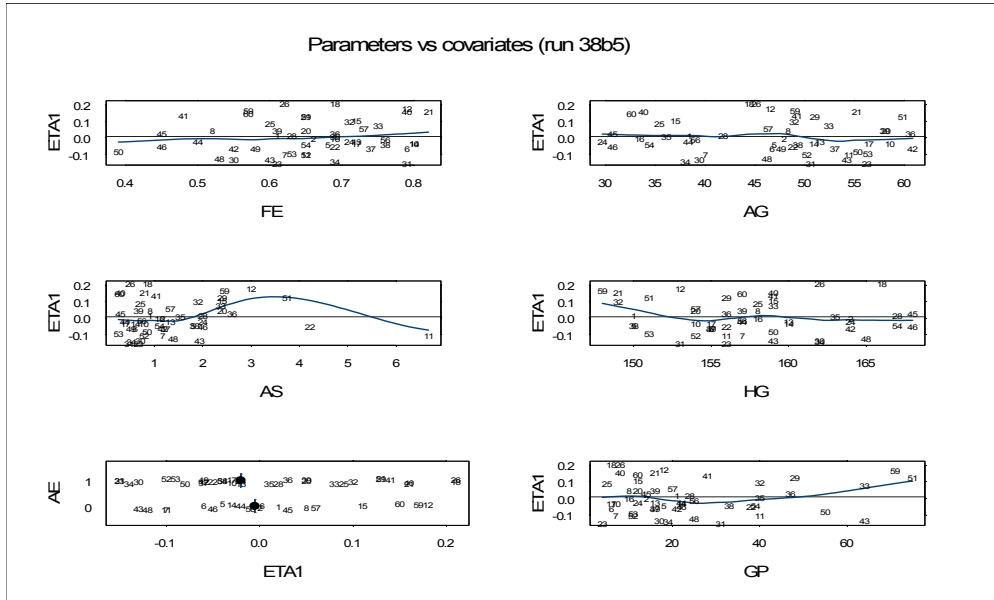


Figura V. 52 Relación de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros K_{ENZ} (ETA1) vs. las covariables FE, AG, AS, HG, AE y GP para el modelo 5, ajustado EE-13.

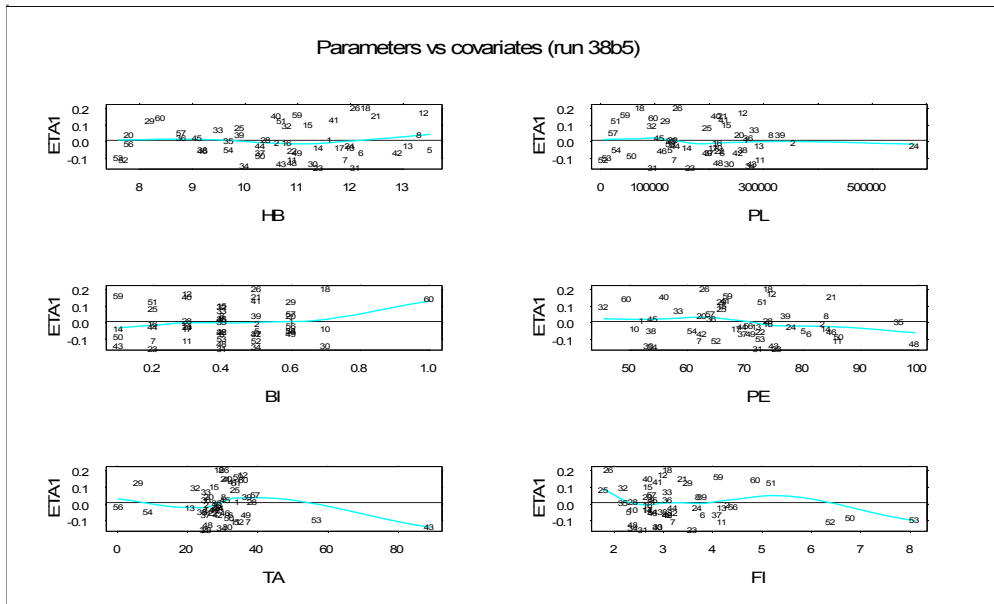


Figura V. 53 Relación de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros K_{ENZ} (ETA1) vs. las covariables HB, PL, BI, PE, TA y FI para el modelo 5, ajustado EE-13.

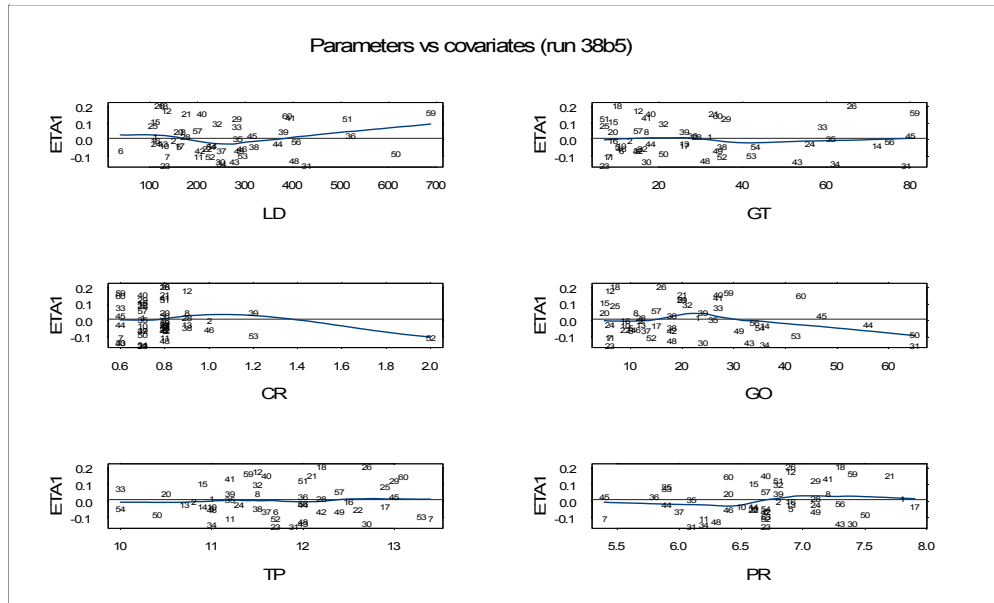


Figura V. 54 Relación de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros K_{ENZ} (ETA1) vs. las covariables LD, GT, CR, GO, TP y PR para el modelo 5, ajustado EE-13.

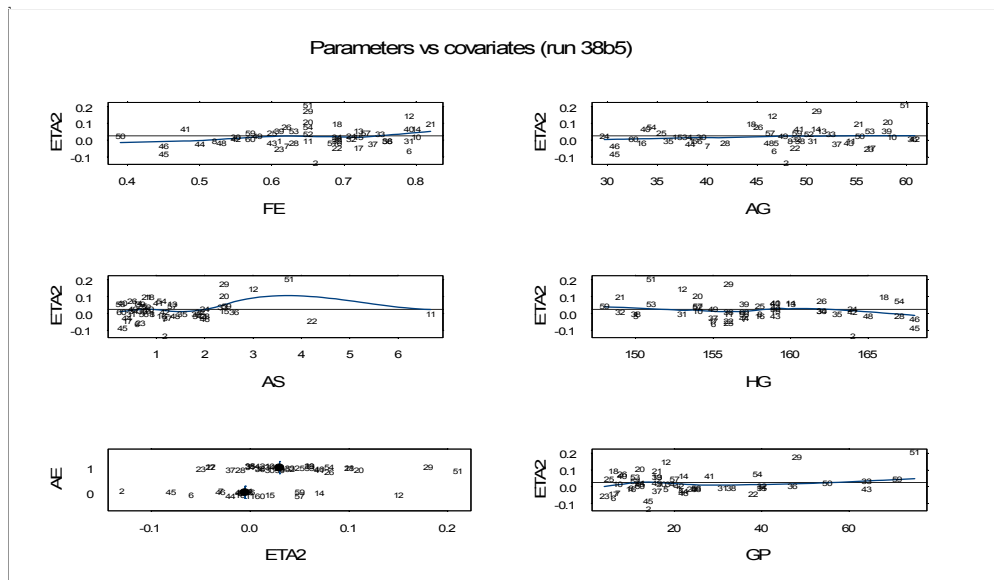


Figura V. 55 Relación de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros V (ETA2) vs. las covariables FE, AG, AS, HG, AE y GP para el modelo 5, ajustado EE-13.

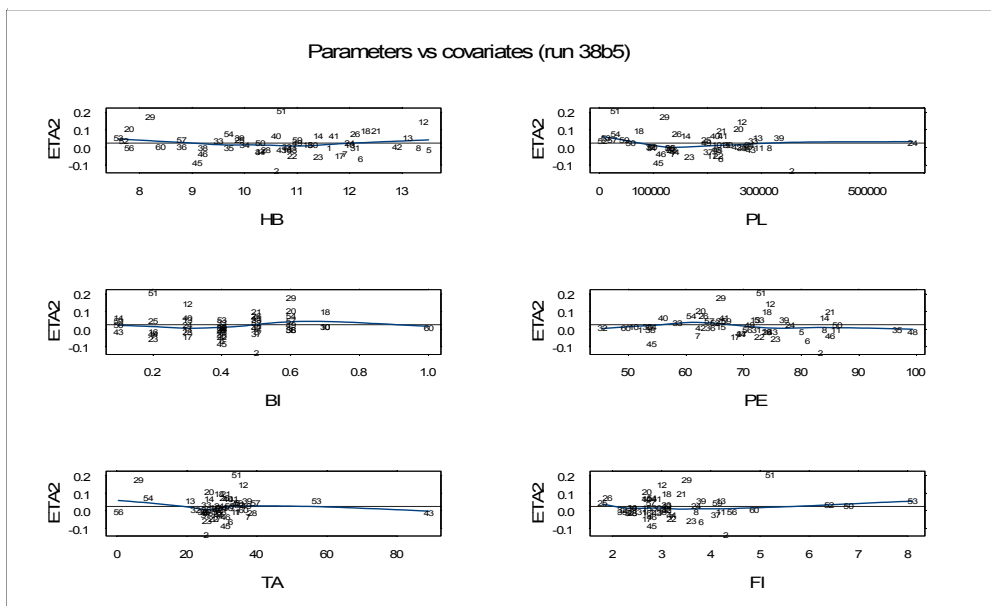


Figura V. 56 Relación de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros V (ETA2) vs. las covariables HB, PL, BI, PE, TA y FI para el modelo 5, ajustado EE-13.

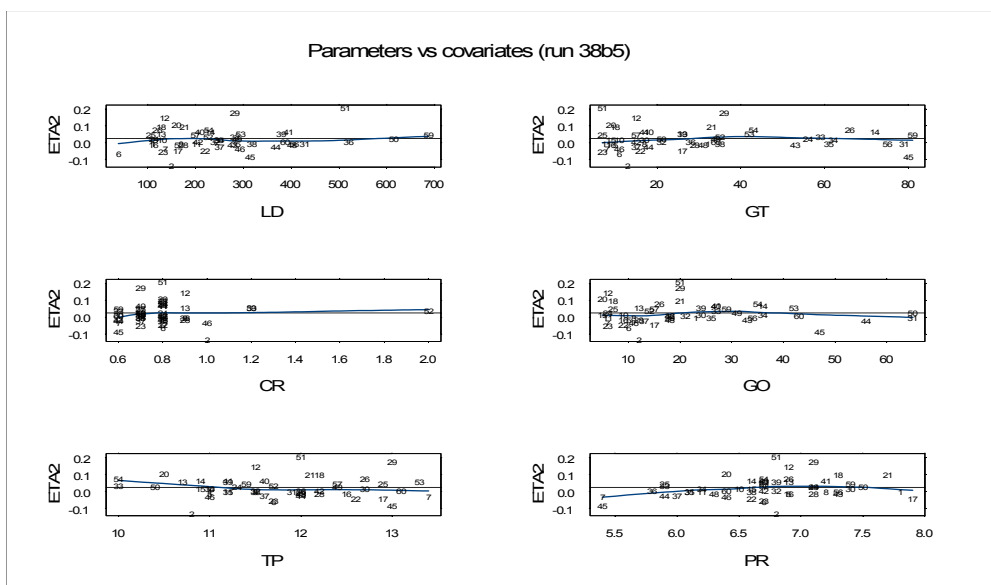


Figura V. 57 Relación de los valores de variabilidad interindividual de los parámetros V (ETA2) vs. las covariables LD, GT, CR, GO, TP y PR para el modelo 5, ajustado EE-13.

La identificación de covariables predictoras será útil para la monitorización de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida y ajuste individualizado de dosis. En la presente memoria, solo se ha realizado un análisis exploratorio.

Estas covariables intentarían explicar una parte de la variabilidad del valor plasmático de la lactato deshidrogenasa, como el tiempo de protrombina, TTPA, ALT (GP), relación ALAT/ASAT son indicadores de funcionalidad hepática. Por otra parte, la interacción entre ciclofosfamida y ondansetrón ha sido confirmada por Gilbert y cols (1998). Estos autores concluyen que la administración concomitante de ondansetrón altera la exposición sistémica a ciclofosfamida. Sin embargo, el impacto real de la interacción farmacocinética sobre la efectividad antiemética del ondansetrón no fue evaluada explícitamente por que el grupo control no recibía tratamiento con otro antagonista 5-HT₃. Sobre la lactato deshidrogenasa hay diferentes publicaciones en otros cánceres donde relacionan niveles altos LDH (> 240 U/L) antes del tratamiento indican un alto riesgo de recurrencia y baja efectividad al tratamiento (Stokkel, 1997; Vitolo, 1997; Byhardt, 1986). En 28 pacientes de la presente Memoria tiene niveles por debajo 240 U/L (39-230 U/L) y 24 pacientes tienen niveles LDH mayores que 240 U/L (241-687 U/L).

Aproximadamente el 20% de ciclofosfamida se une a las proteínas plasmáticas y a las dosis utilizadas en la práctica clínica diaria no existe evidencia de tratarse de un proceso saturable o dosis-dependiente. Los metabolitos del profármaco se unen en mayor proporción a las proteínas plasmáticas, pero ninguno de ellos supera el umbral del 70%.

V.3.1.3. El efecto de la concentración de ciclofosfamida sobre su autoinducción

Con el fin de comprobar el efecto de la concentración de ciclofosfamida sobre su autoinducción con el modelo final (run38b5), se comparó sobre un individuo tipo, el efecto de las diferentes dosis sobre la cinética de ciclofosfamida. Se simuló (en base a los parámetros obtenidos en el modelo farmacoestadístico final) el perfil cinético de un

individuo tipo administrado con una perfusión continua durante 96 horas en un rango de dosis desde 2000 mg a 20000 mg. Donde se puede observar en la figura V.58. que la autoinducción es más evidente cuando los niveles de ciclofosfamida son más elevados a dosis más altas.

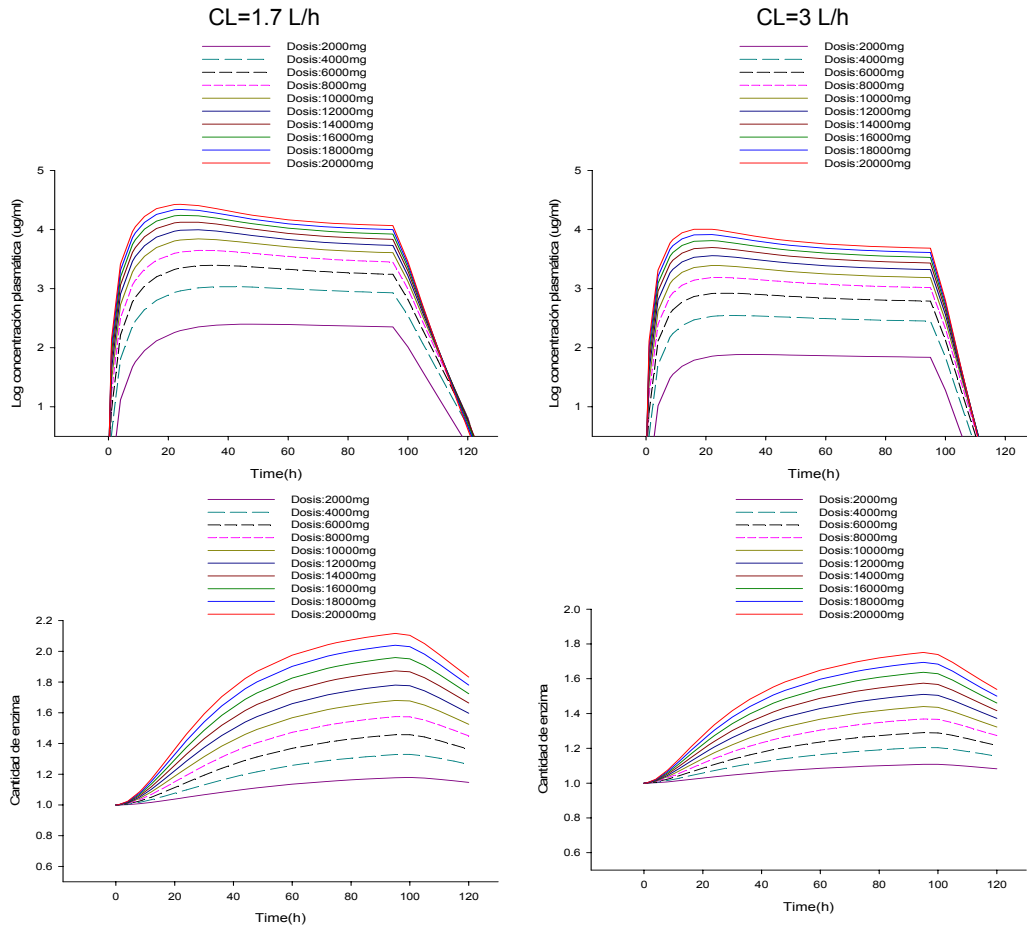


Figura V. 58 Evolución temporal de la superposición de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida obtenidas de simulaciones a diferentes dosis. Evolución temporal de la superposición de la cantidad de enzima obtenida de simulaciones a diferentes dosis.

Tabla V. 22 Parámetros obtenido por WinNonlin para subpoblación CL=1.7 L/h.

Dosis (mg)	T _{max} (h)	C _{max} (µg/mL)	AUC _t (h·µg/mL)	AUC (h·µg/mL)
2000	44	2.40	242.7	245.6
4000	36	3.03	313.9	322.1
6000	36	3.40	352.5	362.4
8000	30	3.65	378.1	388.2
10000	30	3.84	397.1	406.8
12000	30	4.00	411.7	420.7
14000	24	4.12	425.7	426.7
16000	24	4.24	435.3	435.8
18000	24	4.34	443.6	443.7
20000	22	4.43	449.9	455.5

Tabla V. 23 Parámetros obtenido por WinNonlin para subpoblación CL=3.0 L/h.

Dosis (mg)	T _{max} (h)	C _{max} (µg/mL)	AUC _t (h·µg/mL)	AUC (h·µg/mL)
2000	36	1.89	179.4	184.8
4000	30	2.55	248.3	250.5
6000	22	2.92	286.8	290.8
8000	22	3.19	312.9	317.9
10000	22	3.39	332.5	337.9
12000	24	3.56	356.5	362.1
14000	22	3.70	360.5	366.0
16000	22	3.81	371.1	376.5
18000	22	3.92	380.3	385.5
20000	16	4.01	388.4	393.3

La tabla V.22 presenta los resultados de la comparación entre la dosis, C_{max} y el área bajo la curva (AUC, AUC_t) mediante el análisis de regresión para la subpoblación de aclaramiento plasmático 1.7L/h. En la tabla V.23 se presenta la comparación entre la comparación entre la dosis, C_{max} y el área bajo la curva (AUC, AUC_t) mediante el análisis de regresión para la subpoblación de aclaración plasmático 1.7L/h (Smith, 2000).

Tabla V. 24 Análisis de regresión entre la dosis, C_{max} y el área bajo la curva (AUC, AUC_t) para la subpoblación con aclaramiento plasmático 1.7L/h.

Parámetro	n	Coeficiente			Exponente		
		Estima	IC95%		Estima	IC95%	
C_{max}	10	-0.4607	-0.5524	-0.3691	0.2597	0.2366	0.2828
AUC_t	10	1.5489	1.4195	1.6784	0.2603	0.2277	0.2929
AUC	10	1.5831	1.4183	1.7479	0.2533	0.2118	0.2949

Tabla V. 25 Análisis de regresión entre la dosis, C_{max} y el área bajo la curva (AUC, AUC_t) para la subpoblación con aclaramiento plasmático 3.0 L/h.

Parámetro	n	Coeficiente			Exponente		
		Estima	IC95%		Estima	IC95%	
C_{max}	10	-0.7484	-0.8773	-0.6195	0.3175	0.2850	0.3500
AUC_t	10	1.2111	1.0361	1.3861	0.3250	0.2809	0.3691
AUC	10	1.2339	1.0706	1.3972	0.3210	0.2798	0.3621

En las tablas V. 24 y V.25 se presentan los intervalos de confianza obtenidos (IC95%) en del análisis de regresión de la dosis v.s C_{max} , dosis v.s AUC y dosis v.s AUC_t para la subpoblación con aclaramiento plasmático 1.7 y 3 L/h, respectivamente. En ambas subpoblaciones, los intervalos de confianza del 95% para el exponente no incluyen el 1, por lo tanto el C_{max} , AUC y AUC_t no son proporcionales a la dosis en el rango de 2000 a 20000 mg.

V.3.1.4. Validación del modelo

Los percentiles del 5, 50 (mediana) y 95 % de las observaciones obtenidas después de la simulación de 1000 pacientes se han representado gráficamente. Como se puede observar en la gráfica, las observaciones plasmáticas de ciclofosfamida se encuentra en el interior de del intervalo de confianza del 90% para ambas subpoblaciones

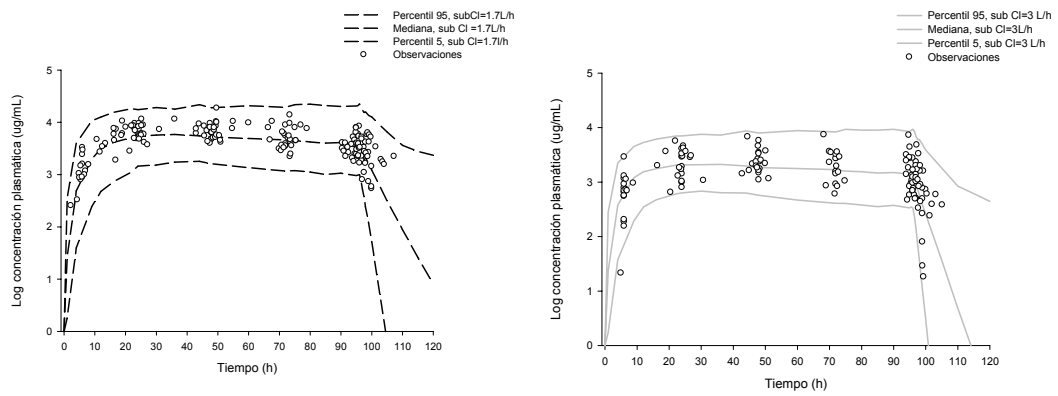


Figura V. 59 Comprobación visual predictiva (“Visual predictive check”). Percentil 5%, mediana (Percentil 50%) y Percentil 95% para cada una de las subpoblaciones ($CL=1.7\text{ L/h}$ y $CL=3\text{ L/h}$).

VI. CONCLUSIONES

1. La ciclofosfamida es administrada en perfusión IV continua durante 96 horas, sin embargo las concentraciones plasmáticas no alcanzan un estado estacionario debido a que el aclaramiento no es constante.
2. El modelo con inducción enzimática lineal propuesto es capaz de describir adecuadamente la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida tras su administración a dosis altas de ciclofosfamida.
3. La característica principal de este modelo es el significado fisiológico de sus parámetros puesto que coinciden con los estimados por otros autores a través de diferentes metodologías.
4. El modelo mecanístico basado en la inducción enzimática, donde la farmacocinética del inductor y el pool de enzima hacen un buen balance para describir la autoinducción de la ciclofosfamida. Es razonable creer que la ciclofosfamida afecte su propia eliminación e incremente la velocidad de producción del enzima y por tanto incrementando la cantidad de enzima incrementa su eliminación.
5. Desde el punto de vista farmacogenómico, la existencia de diversos isoenzimas encargados de metabolizar la ciclofosfamida sugiere la posibilidad de identificar diferentes subpoblaciones de pacientes en cuanto a su perfil de autoinducción. Con el modelo 5 se pueden de diferenciar dos subpoblaciones con diferente aclaramiento.
6. Los parámetros farmacocinéticos poblacionales de ciclofosfamida, estimados mediante el modelo no lineal de efectos mixtos, son el volumen de distribución 23.7 L (IC95% 17.8 a 28.2 L), aclaramiento plasmático 1.7 L/h (IC95%: 1.25 a 2.15 L/h) y incremento del aclaramiento plasmático 1.3 L/h (IC95%: 0.93 a

1.67 L/h) que diferencia a las dos subpoblaciones, constante de inducción K_{ENZ} 0.0179 h^{-1} (IC95%: 0.0042 a 0.0316 h^{-1}) y la pendiente SCp $0.0212 \text{ mL}/\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$ (IC95%: 0.0075 a $0.0349 \text{ mL}/\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$). La proporción de pacientes pertenecientes a subpoblación 1 (CL=1.7 L/h) y 2 (CL= 3.0 L/h) es 43.1% (IC95%: 23.1 a 63.1%) y 56.9% (IC95%: 36.9 a 76.9%), respectivamente.

7. El modelo ha sido evaluado mediante la comprobación visual predictiva "Visual Predictive Check" para cada subpoblación.
8. En el análisis exploratorio de las covariables posiblemente las más importantes son las relacionadas con la función hepática (LDH, relación ALAT/ASAT.) y las interacciones como la administración de antagonistas 5-HT3.
9. El incremento de la dosis produce un efecto no lineal tanto en la exposición como en el C_{max} debido a la autoinducción dependiente de la concentración plasmática de ciclofosfamida.

ANEXOS

ANEXO 1 Acrónimos.

AC	Adriamicina y ciclofosfamida
Δ Cl	Incremento del aclaramiento
Δ FM0	Cambio de la función mínima objetiva
AIC	Criterio de información de Akaike
A(D)	Adriamicina
ALAT	Alanina-amino-transferasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMT	Dosis administrada en mg
ANC	Recuento absoluto de neutrófilos
ASAT	Aspartato-amino-transferasa
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AUC	Área bajo la curva
AUCt	Área bajo la curva hasta tiempo t
B	BCNU
BSO	Butionina-sulfoximina
C,CFA or CP	Ciclofosfamida
CAF	Caféina
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
Cb	Carboplatino
CBP	Ciclofosfamida, BCNU y carboplatino
CBZ	Carbamazepina
CBZ-E	Carbamazepina-10-11-epoxide
CCbT o CTCb	Ciclofosfamida, carboplatino y tiotepa
CCF	Cromatografía en capa fina
Ce	Concentración plasmática estimada
CFA	Ciclofosfamida
CG	Cromatografía gaseosa
CL/Clp	Aclaramiento plasmático total
CL _{ind}	Aclaramiento inducible
CL _{non}	Aclaramiento no inducible
CL _{4OHCP}	Aclaramiento de 4-hidroxiciclofosfamida
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficacia
CMT	Especifica el número del compartimento
Cr _s	Creatinina sérica
C _{max}	Concentración máxima
C ₀	Concentración inicial
cP	Cisplatino

C_{pexp}	Concentración experimental de ciclofosfamida
$C_{pteórica}$	Concentración teórica de ciclofosfamida
CT	Ciclofosfamida y tiotepa
CTC	Ciclofosfamida, carboplatino y tiotepa
C_t	Concentración teórica
CVP	Ciclofosfamida, etopósido y cisplatino
CYP	Citocromo
C_{∞}	Concentración en estado estacionario
2DCECP	Decloroetilciclofosfamida
DE	Desviación estándar
DNFH	Dinitrofenilhidracina
DLCO	Difusión del pulmón para el monóxido de carbono
DV	Variable dependiente
E	Epirubicina
EE-	Ajustado de cada modelo
ECOG	Eastern Cooperative Oncologic Group
EC_{50}	Concentración que produce la mitad del efecto máximo de inducción
E_{max}	Efecto máximo
EM	Espectroscopia de masas
EST	Clasificación de las subpoblaciones
ETA/ω	Variabilidad interindividual
Enz/ENZ	Enzima
ERR	Error estándar relativo
FA	Fosfatasa alcalina
F	5-Fluorouracilo
FAC/CAF	5-fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida
FEC	5-fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida
FEV	Fracción de eyección ventricular
FID	Flame-ionization detection
FMO	Función mínima objetiva
FO	First Order
FOCEI	First Order Conditional with Interaction
G	Glucosa
G5%	Glucosa 5%
GAM	Generalised Additive Modeling
G-CSF	Factores estimulantes de colonias granulocíticas
GM-CSF	Factores estimulantes de granulocíticas-monocíticas
GGT	Gamma-glutaril-transferasa
GST	Glutathión S transferasa
HDCT	High-dose chemotherapy
Hb	Hemoglobina
IC	Intervalo de confianza

IC ₅₀	Concentración que produce la mitad del efecto máximo de inhibición
i.v.	Intravenosa
ID	Identificación de las pacientes
IPRED	Predicciones individuales
IWRES	Residuales ponderados individuales
K _{ENZ}	Constante de producción y eliminación de la actividad enzimática
K _{ENZin}	Constante de producción de la actividad enzimática
K _{ENZout}	Constante de eliminación de la actividad enzimática
K _m	Constante Michaelis-Menten
k ₀	Velocidad constante de orden 0
LD	Límite de Determinación
Ln	Logaritmo neperiano
MDV	Variable dependiente "missing"
MDZ	Midazolam
M/MX	Metrotrexato
MESNA	2-mercanosulfonato sódico
MPE	Media del error de predicción
NA	No aplicable
NaCl	Cloruro sodico
NAD	Nicotin-adenin dinucleótido
NPEM	Método no paramétrico de maxima expectación
NPML	Método no paramétrico de maxima verosimilitud
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
4OHCFA	4hidroxiciclofosfamida
par	Número total de parámetros en el modelo
P	Platino/ carboplatino
PB	Fenitoína
PIV	Perfusión IV
PK	Farmacocinética
PD	Farmacodinámia
PM	Mostaza fosfamida
PNFH	p-nitrofenilhidracina
PO	Per os
Pop	Clasificación de las subpoblaciones
PRED	Predicciones poblacionales
PVC	3-Polivinil de cloruro
PX	Paraxantina
Q	Constante de intercambio entre compartimentos
RATE	Velocidad de administración en mg/h
RCPH	Reinfusión de células precursoras hematopoyéticas
RR	Riesgo relativo

RES	Residuales
Run	Fichero control
RV	Razón de verosimilitud
SC	Superficie corporal
SCp	Pendiente de la función lineal
SIM	Single ion monitoring
SS	Suma de cuadrados de los residuales
STAMP-I	Solid Tumor Autologous Marrow Program-I
STAMP-V	Solid Tumor Autologous Marrow Program-V
T	Taxanos (Paclitaxel / Docetaxel).
<i>t</i> /TIME	Tiempo
$t_{50\%}$	El tiempo necesario para que la concentración plasmática se reduzca a la mitad
$T_{1/2}$	Semivida de eliminación
T90	Tiempo durante el cual la concentración de principio activo es superior al 90% de la concentración inicial.
Tt	Tiotepa
V	Etopósido
V/V_d	Volumen de distribución
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
V_{max}	Velocidad máxima
VO	Vía oral
WRES	Residuales Ponderados
UPP	Unión a proteínas plasmáticas
UV-Vis	Ultravioleta visible
σ	Variabilidad intraindividual

ANEXO 2 Consentimiento informado de los pacientes para la monitorización de las concentraciones de ciclofosfamida.



D^o: _____

Estimada paciente:

Usted va a ser tratada con un medicamento denominado **Ciclofosfamida**, que le ha sido indicado por su especialista en Oncología de este Hospital, para el tratamiento de su enfermedad.

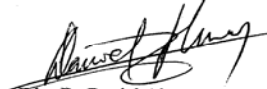
Habitualmente no se dispone de información que permita conocer la cantidad en sangre de este medicamento y como se elimina del cuerpo. El análisis en sangre de ciclofosfamida servirá para mejorar los tratamientos que vayan a recibir otros pacientes.

Este estudio, forma parte de un proyecto de investigación (nº 97/0758) del Fondo de Investigaciones Sanitarias y ha sido aprobada su realización por el Comité Ético de Ensayos Clínicos y la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Dr. Peset.

Deseamos pedirle su consentimiento para extraer en total siete muestras de sangre (8 mL), repartidas durante los cuatro días que durará su tratamiento para analizar la ciclofosfamida. Igualmente, deseamos informarle que su participación es voluntaria y que usted puede dejar de participar en este estudio cuando lo considere oportuno. Además su decisión no va a influir en la manera en que le seguiremos atendiendo en el hospital.

Le damos las gracias anticipadas por su colaboración.


Fdo: Dr. NV Jiménez Torres
Jefe de Servicio de Farmacia


Fdo: Dr. Daniel Almenar
Jefe de Sección Oncología Médica

Firma interesada: _____ Firma testigo: _____

Gaspar Aguilar, 90 - 46017 VALENCIA
Apartado 1891 - 46080 VALENCIA
Tel. 386 25 00 - Fax: 386 25 01

Hoja de consentimiento informado Hospital Universitario Dr. Peset.

ANEXO 3 Solicitud de monitorización de concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida.

**DETERMINACION DE NIVELES PLASMATICOS DE CICLOFOSFAMIDA
HOJA INDIVIDUAL DE RECOGIDA DE DATOS.**

Propuesta marzo 1997

PACIENTE:..... NºR.....
 EDAD (años) :..... PESO (Kg): TALLA (cm):
 DOSIS de CICLOFOSFAMIDA:.....(mg/día)mg/totales.

☛ **PRIMER DIA de perfusión continua. Fecha:**

Hora INICIO 1ª perfusión: Hora FINALIZACIÓN 1ª perfusión: Incidencias:SI/NO(*)
 (*) Describir los tiempos de interrupción de la velocidad de perfusión de ciclofosfamida o modificación de la misma:.....

☛ **SEGUNDO DIA de perfusión continua. Fecha:**

Hora INICIO 2ª perfusión: Hora FINALIZACIÓN 2ª perfusión: Incidencias:SI/NO(*)
 (*) Describir los tiempos de interrupción de la velocidad de perfusión de ciclofosfamida o modificación de la misma:.....

☛ **TERCER DIA de perfusión continua. Fecha:**

Hora INICIO 3ª perfusión: Hora FINALIZACIÓN 3ª perfusión: Incidencias:SI/NO(*)
 (*) Describir los tiempos de interrupción de la velocidad de perfusión de ciclofosfamida o modificación de la misma:.....

☛ **CUARTO DIA de perfusión continua. Fecha:**

Hora INICIO 4ª perfusión: Hora FINALIZACIÓN 4ª perfusión: Incidencias:SI/NO(*)
 (*) Describir los tiempos de interrupción de la velocidad de perfusión de ciclofosfamida o modificación de la misma:.....

CALENDARIO PARA EL REGISTRO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE (especificar día y hora de extracción)

Hora	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Día 1º																		30						

Ejemplo: muestra extraída el primer día a las 17 horas, 30 minutos.

NUMERO DE MUESTRAS DE SANGRE Y HORARIOS PREDEFINIDOS

Día	Número	Horarios predefinidos
Primero	2	12 y 24 horas desde inicio de la 1ª perfusión IV
Segundo	2	36 y 48 horas desde inicio de la 1ª perfusión IV
Tercero	1	72 horas desde el inicio de la 1ª perfusión IV
Cuarto	2	95 horas desde el inicio de la 1ª perfusión IV (previa a finalizar la 4ª perfusión IV) y una hora después de su finalización.

ANEXO 4 Características antropométricas de los pacientes.

La descripción de los pacientes con números correlativos, corresponden al orden en que fueron incluidos en el estudio como se encuentran descritos en esta Memoria. La referencia del hospital al que pertenecen las pacientes: "1" Hospital Clínico Universitario de Valencia y "2" Hospital Dr Peset de Valencia. Fueron excluidas del estudio, por no pertenecer a la población, las pacientes 3, 4, 9, 19, 27, 47, 55, 58. En la tabla A.4. se presentan las características antropométricas de los pacientes junto con la dosis total de ciclofosfamida administrada, 6 g/m²("-"): no determinado.

Tabla A4. Características antropométricas de la población (I).

Paciente	Hospital	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (cm)	Superficie Corporal (m ²)	Dosis (mg)
1	1	38	52.0	150	1.47	8800
2	1	48	83.3	164	1.90	11400
5	1	47	80.0	150	1.80	10800
6	1	47	81.0	155	1.86	11160
7	1	40	62.0	157	1.60	9600
8	1	48	84.0	158	1.90	11400
10	1	59	87.5	165	2.00	8840
11	1	54	50.9	154	1.47	11200
12	1	47	86.0	151	1.87	9000
13	1	52	74.6	153	1.50	10680
14	1	51	72.0	160	1.78	11560
15	1	37	66.0	159	1.70	10200
16	1	33	74.0	158	1.80	10800
17	1	56	68.5	155	1.70	10200
18	1	44	74.0	166	1.84	11040
20	1	58	62.5	154	1.63	9760
21	1	55	85.0	149	1.88	11280
22	1	49	72.7	156	1.78	10660
23	1	56	75.5	156	1.77	10620

Tabla A.4. Características antropométricas de la población (II).

Paciente	Hospital	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (cm)	Superficie Corporal (m²)	Dosis (mg)
24	1	30	78.0	164	1.85	11280
25	1	35	66.0	158	1.67	10200
26	1	45	63.0	162	1.67	10080
28	1	42	74.0	167	1.83	11480
29	1	51	66.0	156	1.66	10140
30	1	39	53.3	162	1.56	9200
31	1	51	72.2	153	1.70	10480
32	1	49	45.5	149	1.37	8220
33	1	52	58.5	159	1.60	9600
34	1	38	54.0	162	1.57	9630
35	1	36	96.6	163	2.01	12560
36	1	61	64.2	156	1.64	9960
37	1	53	69.6	155	1.69	10380
38	1	49	53.8	150	1.48	8980
39	1	58	77.0	157	1.78	10980
40	1	34	56.0	159	1.57	9420
41	1	49	66.6	159	1.69	10260
42	1	61	62.5	164	1.68	10140
43	2	54	75.0	159	1.78	10920
44	2	38	69.5	157	1.70	10444
45	2	31	54.0	168	1.61	9480
46	2	57	85.0	167	1.94	11040
48	2	46	99.3	165	2.05	12780
49	1	48	71.0	155	1.70	10400
50	1	55	86.2	159	1.88	11400
51	1	59	73.0	151	1.69	10440
52	1	49	65.0	154	1.63	9960
53	1	55	72.7	151	1.69	10140
54	1	33	60.9	167	1.68	10020

Tabla A.4. Características antropométricas de la población (III).

Paciente	Hospital	Edad(años)	Peso(kg)	Talla (cm)	Superficie Corporal(m²)	Dosis (mg)
56	1	39	70.6	157	1.71	10500
57	1	46	64.0	154	1.62	9720
59	1	49	67.0	148	1.61	10080
60	1	32	49.5	157	1.47	8760

ANEXO 5 Diagnóstico de los pacientes

En la tabla A.5. se muestra el diagnóstico de los pacientes incluidos en el estudio. Así, se distinguen los pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de mama en estadio II y III con más de 4 ganglios axilares afectados tras cirugía reglada sin resto tumoral (>4 ganglios afectados tras cirugía), los pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de mama en estadio II y III con más de 10 ganglios axilares afectados tras quimioterapia neoadyuvante (>10 ganglios afectados) y los pacientes con carcinoma inflamatorio de mama (11.9%). las características de la población en cuanto a uno de los factores pronósticos como es el número de ganglios afectados.

Tabla A.5. Número de ganglios afectados de cada una de las pacientes incluidas

Paciente	Número de ganglios afectados	Paciente	Número de ganglios afectados
1	> 10 ganglios afectados	32	> 10 ganglios afectados
2	> 10 ganglios afectados	33	> 10 ganglios afectados
5	carcinoma inflamatorio	34	> 4 ganglios afectados tras cirugía
6	> 10 ganglios afectados	35	> 10 ganglios afectados
7	carcinoma inflamatorio	36	> 10 ganglios afectados
8	> 10 ganglios afectados	37	> 10 ganglios afectados
10	> 4 ganglios afectados tras cirugía	38	> 10 ganglios afectados
11	> 4 ganglios afectados tras cirugía	39	> 10 ganglios afectados
12	> 4 ganglios afectados tras cirugía	40	> 10 ganglios afectados
13	> 4 ganglios afectados tras cirugía	41	> 10 ganglios afectados
14	> 4 ganglios afectados tras cirugía	42	> 10 ganglios afectados
15	carcinoma inflamatorio	43	> 10 ganglios afectados
16	> 10 ganglios afectados	44	> 10 ganglios afectados
17	> 10 ganglios afectados	45	> 4 ganglios afectados tras cirugía
18	> 10 ganglios afectados	46	> 10 ganglios afectados
20	> 10 ganglios afectados	48	> 4 ganglios afectados tras cirugía
21	> 4 ganglios afectados tras cirugía	49	> 10 ganglios afectados
22	> 10 ganglios afectados	50	> 10 ganglios afectados
23	> 10 ganglios afectados	51	> 4 ganglios afectados tras cirugía
24	carcinoma inflamatorio	52	> 10 ganglios afectados
25	> 10 ganglios afectados	53	> 10 ganglios afectados
26	> 10 ganglios afectados	54	> 10 ganglios afectados
28	carcinoma inflamatorio	56	carcinoma inflamatorio
29	> 4 ganglios afectados tras cirugía	57	> 4 ganglios afectados tras cirugía
30	> 4 ganglios afectados tras cirugía	59	> 4 ganglios afectados tras cirugía
31	> 4 ganglios afectados tras cirugía	60	> 4 ganglios afectados tras cirugía

ANEXO 6 Concentraciones plasmáticas de ciclofosfamida de los pacientes monitorizados, tiempo de muestreo y dosis.

En la tabla A.6. se muestran el tiempo de muestreo y los valores de concentración plasmática de ciclofosfamida dosis y velocidad de perfusión para cada uno de los pacientes del estudio.

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (I).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA (µg/mL)	Dosis	Velocidad de perfusión
				mg	mg/h
1.00	1	19.00	35.30	8800	84.21
1.00	2	45.00	24.84		
1.00	3	69.00	18.82		
1.00	4	95.00	15.75		
2.00	1	20.50	16.60	11400	120.00
2.00	2	44.50	46.26		
2.00	3	68.25	47.85		
2.00	4	94.75	47.57		
2.00	5	95.75	22.61		
2.00	6	99.37	3.52		
5.00	1	17.00	58.10	10800	109.38
5.00	2	43.00	35.74		
5.00	3	67.00	40.77		
5.00	4	94.50	36.49		
6.00	1	19.00	62.89	11160	117.47
6.00	2	43.00	61.05		
6.00	3	96.00	42.46		
6.00	4	100.00	12.65		
7.00	1	19.00	25.92	9600	100.00
7.00	2	24.00	58.84		
7.00	3	51.00	32.21		
7.00	4	96.00	44.96		
7.00	5	100.00	12.65		

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (II).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA (µg/mL)	Dosis mg	Velocidad de perfusión mg/h
8.00	1	36.00	65.45	11400	118.97
8.00	2	60.00	63.09		
8.00	3	77.00	57.08		
8.00	4	96.00	48.86		
10.00	1	6.00	18.81	8840	90.2
10.00	2	24.00	41.78		
10.00	3	48.00	36.32		
10.00	4	72.00	40.38		
10.00	5	96.00	40.47		
10.00	6	99.00	26.65		
11.00	1	6.00	25.95	11200	105.51
11.00	2	24.00	43.77		
11.00	3	48.00	38.32		
11.00	4	72.00	37.88		
11.00	5	96.10	29.52		
11.00	6	97.00	26.74		
12.00	1	24.00	23.29	9000	93.75
12.00	2	48.00	20.85		
12.00	3	72.00	19.37		
12.00	4	95.50	19.41		
12.00	5	100.00	17.51		
12.00	6	102.00	13.31		
13.00	1	8.00	21.79	10680	119.32
13.00	2	24.00	47.09		
13.00	3	90.50	36.28		
13.00	4	92.50	30.28		
14.00	1	6.00	9.65	11560	120.41
14.00	2	24.00	31.70		
14.00	3	48.25	29.63		
14.00	4	72.00	24.24		
14.00	5	96.00	16.95		

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (III).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA (µg/mL)	Dosis	Velocidad de perfusión
				mg	mg/h
15.00	1	6.00	21.30	10200	108.51
15.00	2	24.25	32.10		
15.00	3	48.25	28.94		
15.00	4	72.25	31.07		
15.00	5	94.00	32.98		
15.00	6	95.00	18.50		
15.00	7	97.00	14.83		
16.00	1	22.00	42.68	10800	112.21
16.00	2	46.00	28.00		
16.00	3	70.00	35.06		
16.00	4	94.00	23.16		
16.00	5	96.25	17.85		
16.00	6	97.75	12.48		
17.00	1	6.00	31.91	10200	106.52
17.00	2	24.00	19.90		
17.00	3	47.75	30.52		
17.00	4	71.75	16.12		
17.00	5	95.75	20.69		
18.00	1	6.00	18.01	11040	115.00
18.00	2	24.00	33.89		
18.00	3	48.00	34.52		
18.00	4	72.00	30.90		
18.00	5	97.00	29.07		
18.00	6	99.33	24.63		
18.00	7	101.33	10.78		
20.00	1	6.00	10.03	9760	96.47
20.00	2	24.00	20.29		
20.00	3	48.33	25.64		
20.00	4	72.50	18.58		
20.00	5	96.50	15.74		
20.00	6	103.17	15.95		
20.00	7	105.17	13.26		

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (IV).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA	Dosis	Velocidad de perfusión
			(µg/mL)	mg	mg/h
21.00	1	6.00	15.47	10280	118.73
21.00	2	24.00	37.09		
21.00	3	48.00	33.67		
21.00	4	72.00	33.55		
21.00	5	96.00	19.76		
21.00	6	97.00	23.03		
21.00	7	99.00	18.05		
22.00	1	6.00	19.27	10660	111.04
22.00	2	24.50	39.03		
22.00	3	47.17	28.99		
22.00	4	73.17	31.71		
22.00	5	96.00	17.07		
22.00	6	97.00	14.90		
22.00	7	99.00	6.67		
23.00	1	6.00	32.99	10620	110.63
23.00	2	24.00	49.27		
23.00	3	48.00	45.64		
23.00	4	72.00	35.69		
23.00	5	96.00	26.47		
23.00	6	97.00	21.66		
23.00	7	99.00	18.19		
24.00	1	6.00	16.55	11280	117.50
24.00	2	24.00	26.65		
24.00	3	48.00	23.91		
24.00	4	72.00	23.33		
24.00	5	96.00	21.93		
24.00	6	97.00	20.33		
24.00	7	99.00	11.26		
25.00	1	6.00	15.71	10200	105.00
25.00	2	24.00	18.24		
25.00	3	48.00	24.83		
25.00	4	96.00	31.07		

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (V).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA (µg/mL)	Dosis mg	Velocidad de perfusión mg/h
25.00	5	97.00	27.10		
25.00	6	99.00	14.77		
26.00	1	6.00	17.17	10080	105.00
26.00	2	23.83	25.24		
26.00	3	47.83	38.76		
26.00	4	70.50	34.59		
26.00	5	94.92	30.81		
26.00	6	98.42	19.09		
26.00	7	100.41	16.08		
28.00	1	6.00	22.49	11480	119.58
28.00	2	48.00	43.06		
28.00	3	95.00	31.55		
28.00	4	96.75	14.67		
29.00	1	5.00	3.79	9600	100.00
29.00	2	24.50	37.45		
29.00	3	48.67	30.04		
29.00	4	72.25	26.86		
29.00	5	98.25	24.55		
30.00	1	5.50	17.48	2300	95.63
30.00	2	23.55	38.75	2300	99.65
30.00	3	47.47	38.83	2300	88.29
30.00	4	73.45	28.17	2300	102.09
30.00	5	96.25	25.30		
30.00	6	96.78	20.95		
31.00	1	10.75	40.48	2620	118.28
31.00	2	22.75	50.35	2620	124.76
31.00	3	45.68	46.02	2620	104.80
31.00	4	69.92	32.38	2620	116.70
31.00	5	90.50	27.37		
31.00	6	91.00	26.91		
31.00	7	91.58	26.49		
32.00	1	8.83	19.74	2055	83.70
32.00	2	22.83	22.41	2055	87.26

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (VI).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA (µg/mL)	Dosis mg	Velocidad de perfusión mg/h
32.00	3	42.83	23.38	2055	85.45
32.00	4	72.83	24.10	2055	86.89
32.00	5	97.33	25.23		
32.00	6	97.92	18.52		
33.00	1	6.58	17.45	4800	103.58
33.00	2	23.25	26.11		
33.00	3	47.20	26.73	2400	99.59
33.00		72		2400	104.12
33.00	4	94.66	25.94		
34.00	1	11.75	29.94	2340	96.86
34.00	2	22.84	41.53	2340	100.21
34.00	3	46.75	41.73	2340	97.50
34.00	4	70.59	39.96	2340	99.79
34.00	5	94.59	27.97		
34.00	6	95.09	21.12		
34.00	7	95.59	23.85		
35.00	0			3140	120.45
35.00	1	23.00	54.30	3140	124.11
35.00	2	47.50	58.36	3140	135.34
35.00	3	72.00	52.00	3140	116.30
35.00	4	98.50	45.48		
36.00	1	5.50	24.16	2490	111.16
36.00	2	22.60	59.45	2490	108.26
36.00	3	45.60	47.52	2490	105.96
36.00	4	72.00	42.34	2490	102.68
36.00	5	94.00	42.39		
36.00	6	94.50	42.08		
36.00	7	95.00	37.81		
37.00	0			2595	107.45
37.00	1	24.42	58.99	2595	103.80
37.00	2	48.50	41.16	2595	110.66
37.00	3	73.75	37.71	2595	115.59
37.00	4	98.00	22.03		
38.00	1	13.50	37.26	2245	92.77

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (VII).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA (µg/mL)	Dosis mg	Velocidad de perfusión mg/h
38.00	2	25.33	42.15	2245	105.40
38.00	3	49.25	30.46	2245	92.39
38.00	4	70.75	25.88	2245	89.62
38.00	5	95.50	47.21		
38.00	6	96.16	35.20		
38.00	7	96.75	29.87		
39.00	1	7.00	20.37	2745	109.15
39.00	2	31.00	52.56	2745	108.93
39.00	3	55.00	53.84	2745	113.52
39.00	4	79.00	43.74	2745	112.41
39.00	5	98.75	41.37		
39.00	6	99.25	48.62		
39.00	7	99.75	49.73		
40.00	1	16.42	27.08	2355	105.13
40.00	2	47.50	26.13	2345	101.29
40.00	3	70.00	28.77	2345	100.00
40.00	4	94.00	29.53	2345	100.43
40.00	5	94.35	14.38		
40.00	6	97.00	21.74		
41.00	1	4.92	32.77	2365	106.88
41.00	2	26.08	43.65	7095	100.48
41.00	3	49.41	34.24		
41.00	4	75.08	31.87		
41.00	5	103.08	33.36		
41.00	6	103.58	30.50		
41.00	7	104.08	28.44		
42.00	1	5.08	17.58	2535	96.94
42.00	2	26.00	51.60	2535	108.57
42.00	3	49.58	40.85	2535	120.71
42.00	4	75.42	30.77	2535	112.92
42.00	5	94.25	49.22		
42.00	6	95.75	23.52		
43.00	1	6.00	8.96	2730	116.42
43.00	2	26.66	31.45	2730	109.20
43.00	3	51.08	21.41	2730	113.04

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (VIII).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA	Dosis	Velocidad de perfusión
			(µg/mL)	mg	mg/h
43.00	4	74.82	20.46	2730	128.17
43.00	5	99.08	4.30		
44.00	1	47.92	39.31	2610	107.45
44.00	2	71.50	53.34	2610	104.44
44.00	3	97.00	44.54	2610	112.79
44.00	4	97.50	31.56	2610	112.06
44.00	5	100.00	21.21		
45.00	1	6.00	51.29	2370	97.53
45.00	2	22.00	67.18	2370	98.75
45.00	3	46.50	52.33	2370	101.72
45.00	4	71.00	28.48	2370	98.78
45.00	5	95.66	47.84		
45.00	6	97.66	39.06		
46.00	1	6.16	41.01	2760	115.00
46.00	2	24.41	50.56	2760	120.00
46.00	3	47.50	39.29	2760	104.94
46.00	4	71.50	41.91	2760	133.13
46.00	5	98.00	34.41		
46.00	6	99.16	41.40		
46.00	7	101.33	31.80		
48.00	1	24.25	47.00	3195	133.13
48.00	2	48.08	71.09	3195	126.28
48.00	3	67.66	23.69	3195	184.30
48.00	4	93.75	26.91	3195	122.41
48.00	5	94.25	25.06		
48.00	6	97.00	19.08		
49.00	1	16.41	35.39	2600	107.00
49.00	2	27.16	50.90	2600	111.59
49.00	3	49.50	43.29	2600	107.00
49.00	4	75.41	36.70	2600	122.32
49.00	5	93.50	34.33		
49.00	6	95.16	32.83		

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (IX).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA	Dosis	Velocidad de perfusión
			(µg/mL)	mg	mg/h
50.00	1	12.50	33.29	2850	122.32
50.00	2	23.16	37.29	2850	133.80
50.00	3	48.83	43.46	2850	126.39
50.00	4	72.83	34.03	2850	102.55
50.00	5	91.46	38.88		
50.00	6	92.24	34.16		
51.00	1	16.83	31.44	2610	102.55
51.00	2	21.42	37.28	2610	116.52
51.00	3	54.75	32.43	2610	110.81
51.00	4	66.42	26.06	2610	112.02
51.00	5	107.25	50.68		
52.00	1	6.66	19.64	2490	103.75
52.00	2	25.12	34.95	2490	101.43
52.00	3	50.83	30.74	2490	105.73
52.00	4	74.00	34.42	2490	112.02
52.00	5	96.00	34.59		
52.00	6	98.16	33.22		
52.00	7	98.75	26.61		
53.00	1	6.92	17.11	2535	105.63
53.00	2	26.92	32.40	2535	100.73
53.00	3	50.00	28.32	2535	107.64
53.00	4	72.42	34.82	2535	108.57
53.00	5	97.25	39.82		
53.00	6	97.83	33.86		
53.00	7	98.33	26.98		
54.00	1	4.33	11.63	2505	108.21
54.00	2	24.50	35.65	2505	106.37
54.00	3	50.50	48.48	2505	103.30
54.00	4	73.58	40.10	2505	98.62
54.00	5	95.50	33.33		
54.00	6	95.67	33.12		

Tabla A.6. Concentración plasmática ciclofosfamida, tiempo de muestreo y dosis (X).

Paciente	Nº muestra	Tiempo (h)	CFA	Dosis	Velocidad de perfusión
			($\mu\text{g/mL}$)	mg	mg/h
56.00	1	2.25	11.78	2625	109.38
56.00	2	25.75	55.41	2625	120.23
56.00	3	48.83	49.19	2625	118.61
56.00	4	73.75	33.77	2625	118.61
56.00	5	95.75	38.69		
56.00	6	96.25	29.51		
57.00	1	5.92	20.28	2430	103.40
57.00	2	18.75	39.96	2430	108.72
57.00	3	43.92	51.17	2430	103.85
57.00	4	73.17	60.91	2430	108.00
57.00	5	94.92	47.99		
57.00	6	95.83	35.63		
59.00	1	6.58	21.02	2520	111.75
59.00	2	25.25	35.16	2520	99.60
59.00	3	30.75	20.61	2520	98.60
59.00	4	50.17	35.38	2520	124.44
59.00	5	95.08	38.23		
59.00	6	96.08	24.93		
59.00	7	97.58	20.90		
60.00	1	16.25	48.36	2190	90.01
60.00	2	25.25	57.81	2190	92.54
60.00	3	49.63	71.59	2190	93.19
60.00	4	73.40	62.84	2190	97.33
60.00	5	95.00	48.96		
60.00	6	96.83	39.82		

ANEXO 7 Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente.

En la tabla A.7. se muestran las relación concentración plasmática tiempo para cada paciente del estudio.

Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (I).

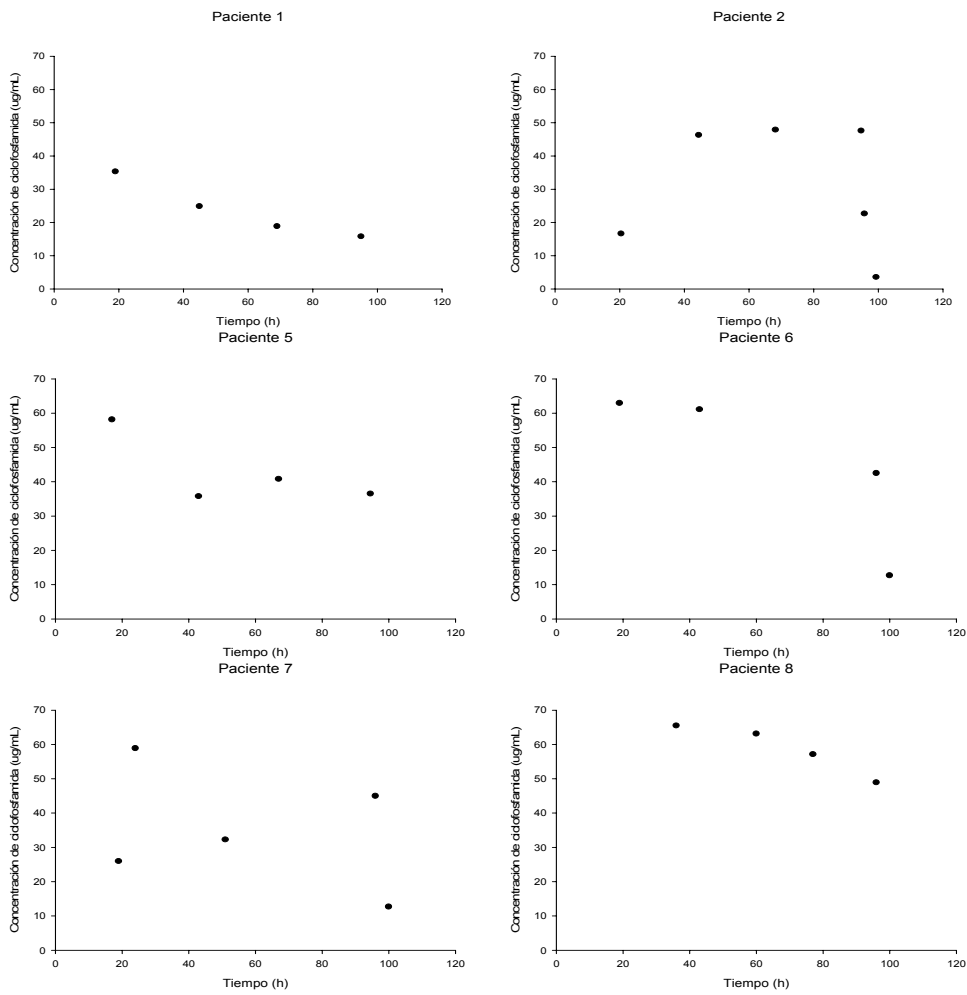


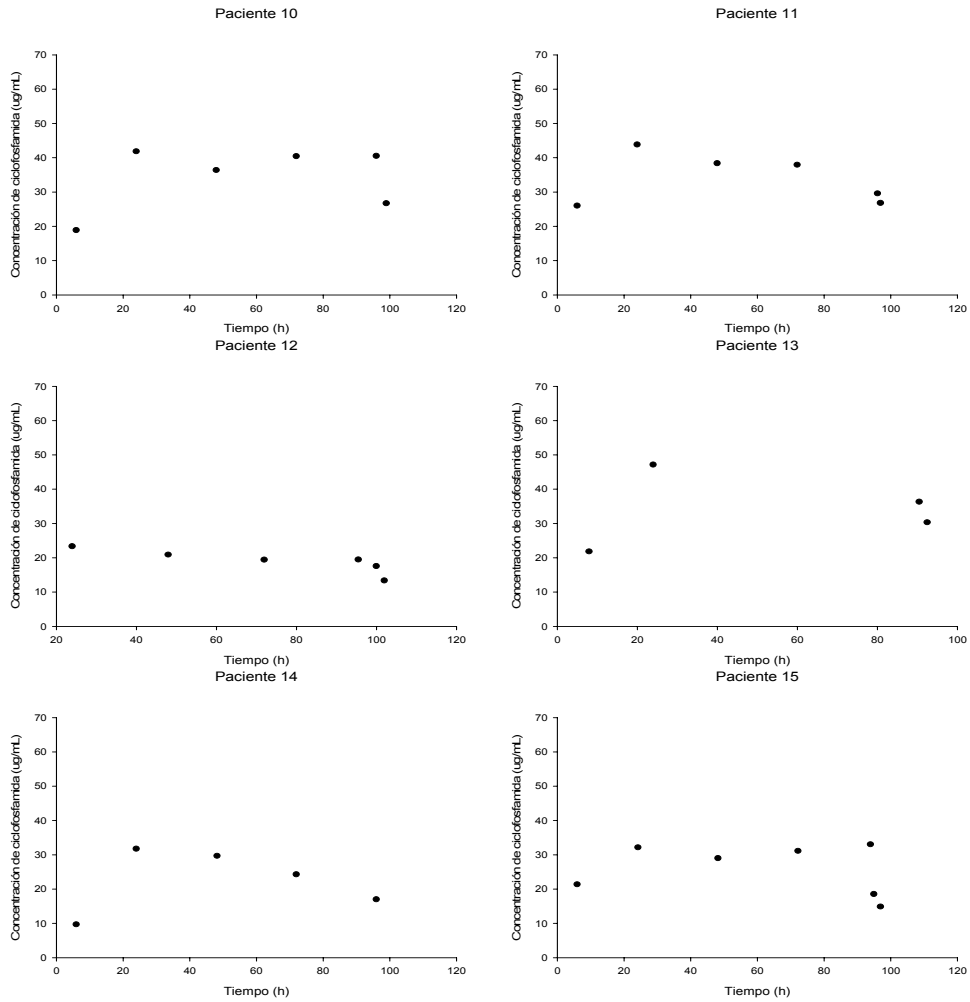
Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (II).

Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (III).

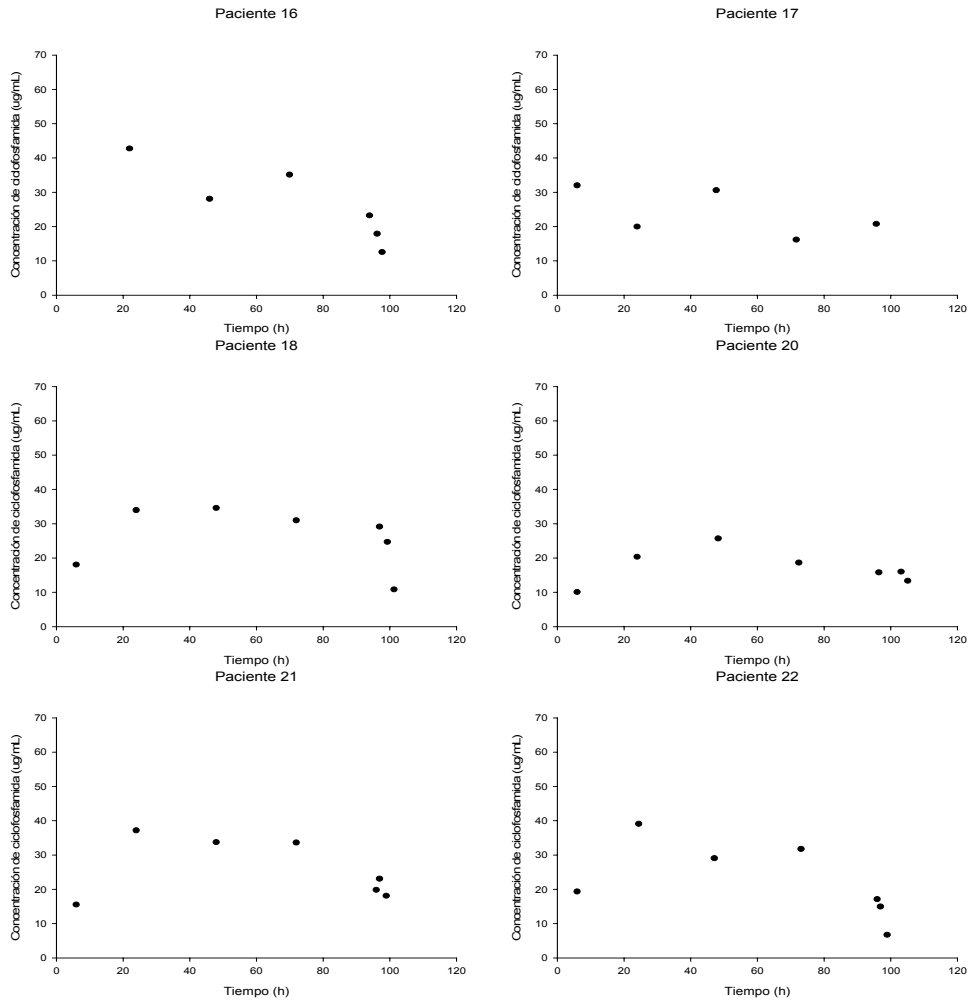


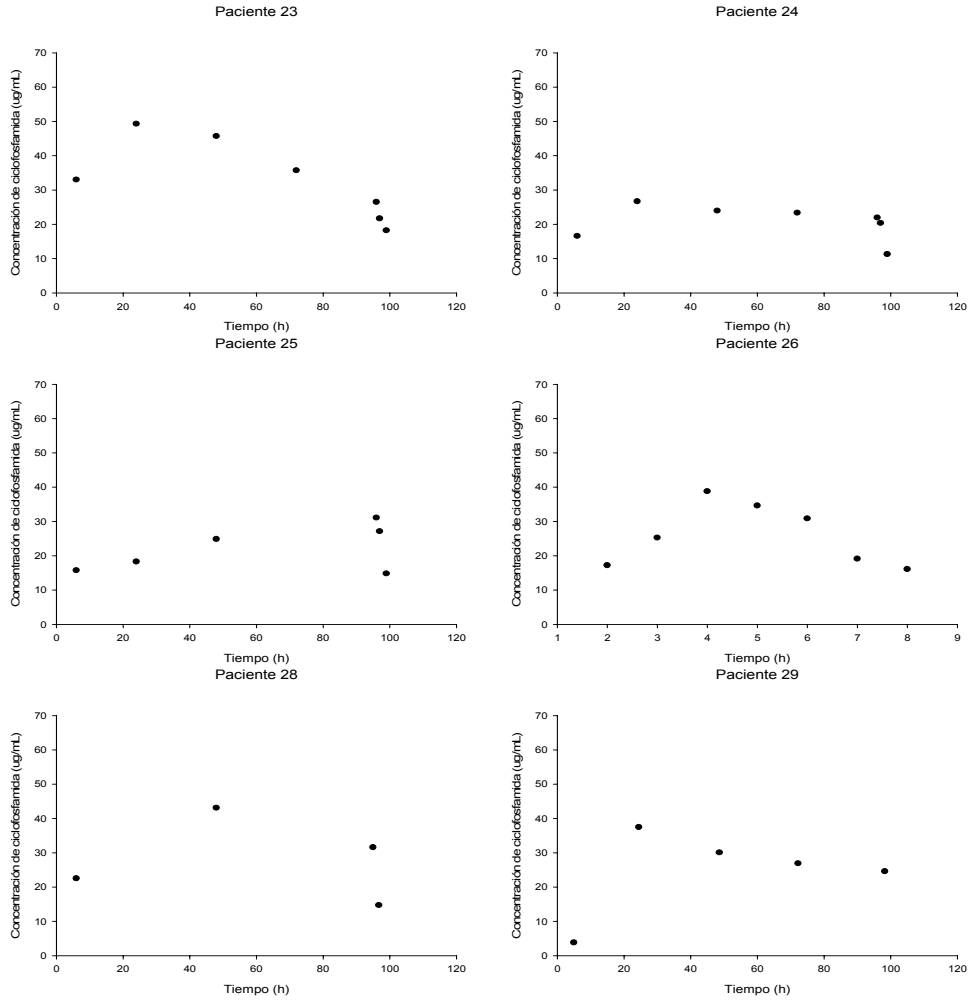
Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (IV).

Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (V).

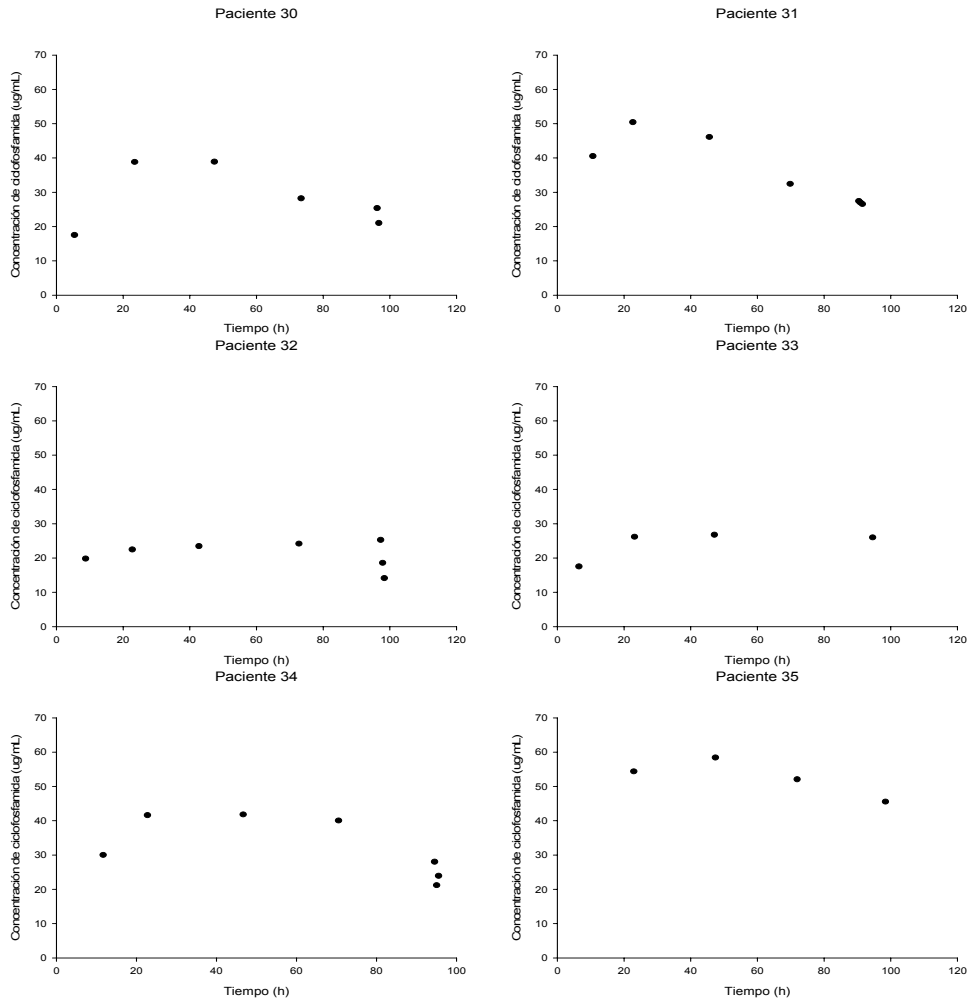


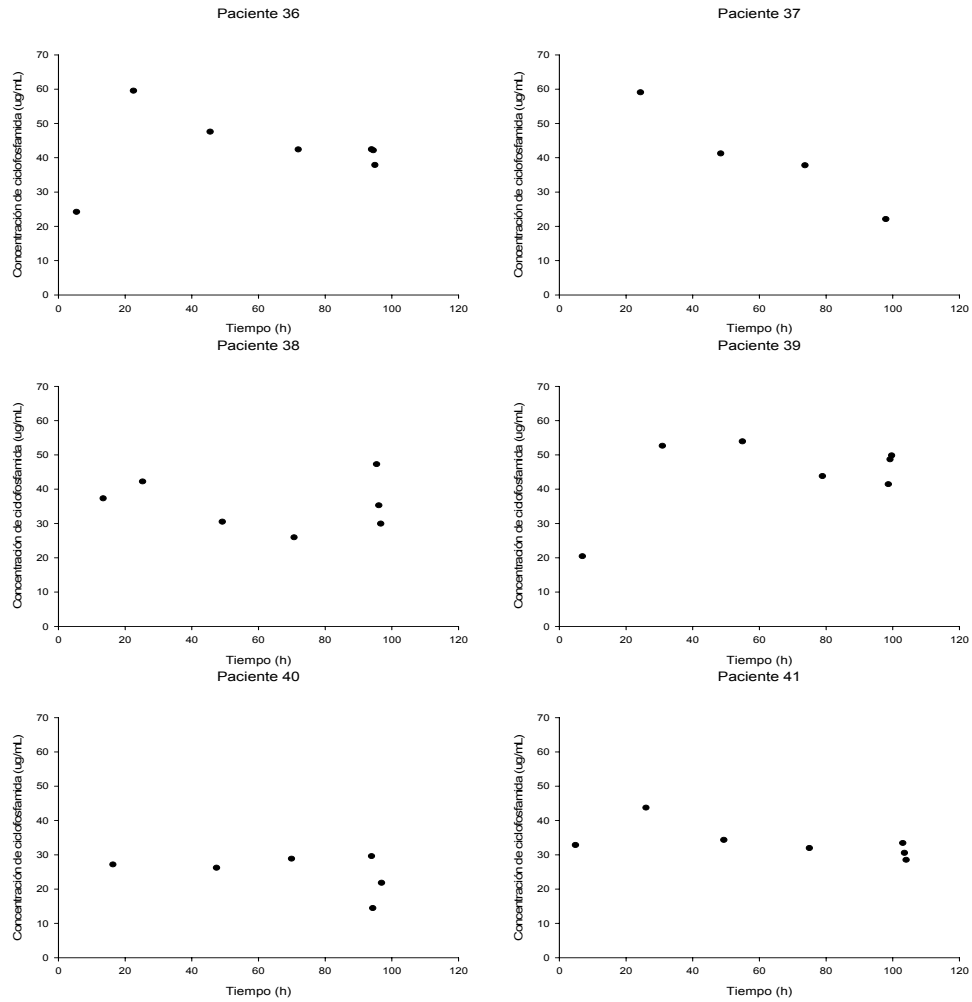
Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (VI).

Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (VII).

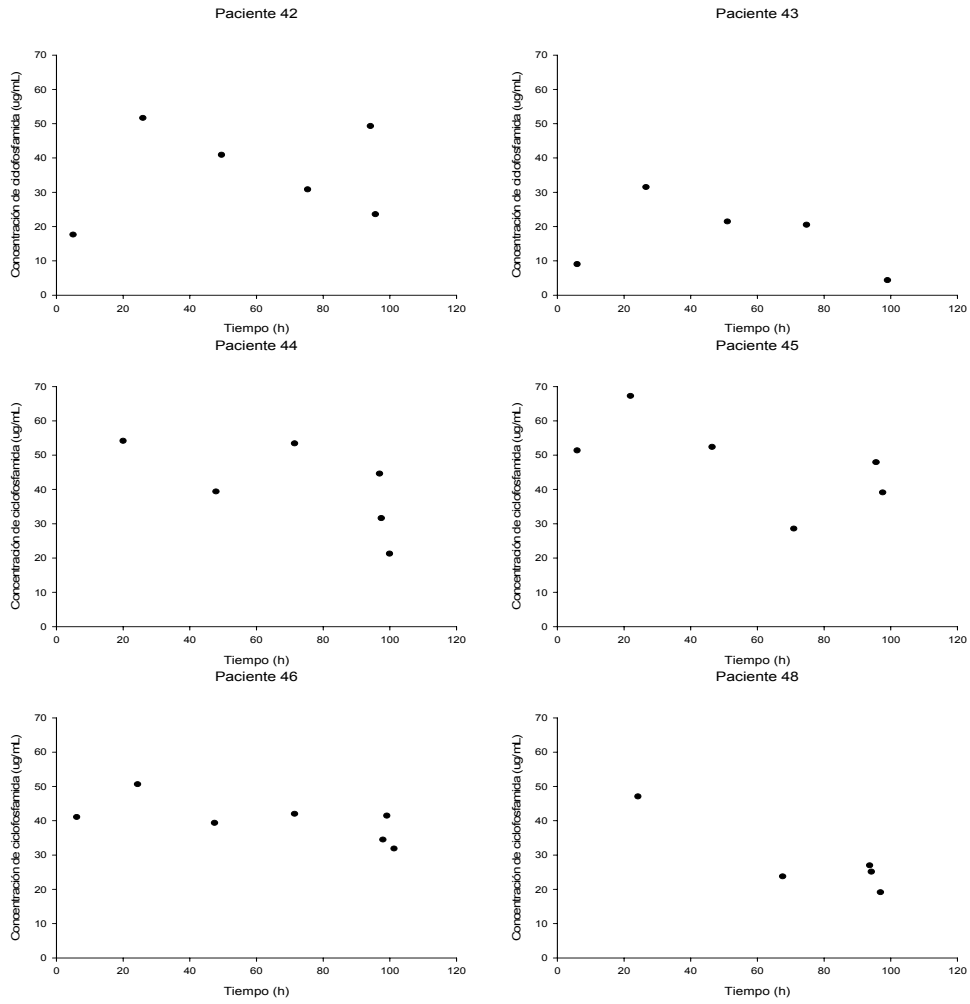


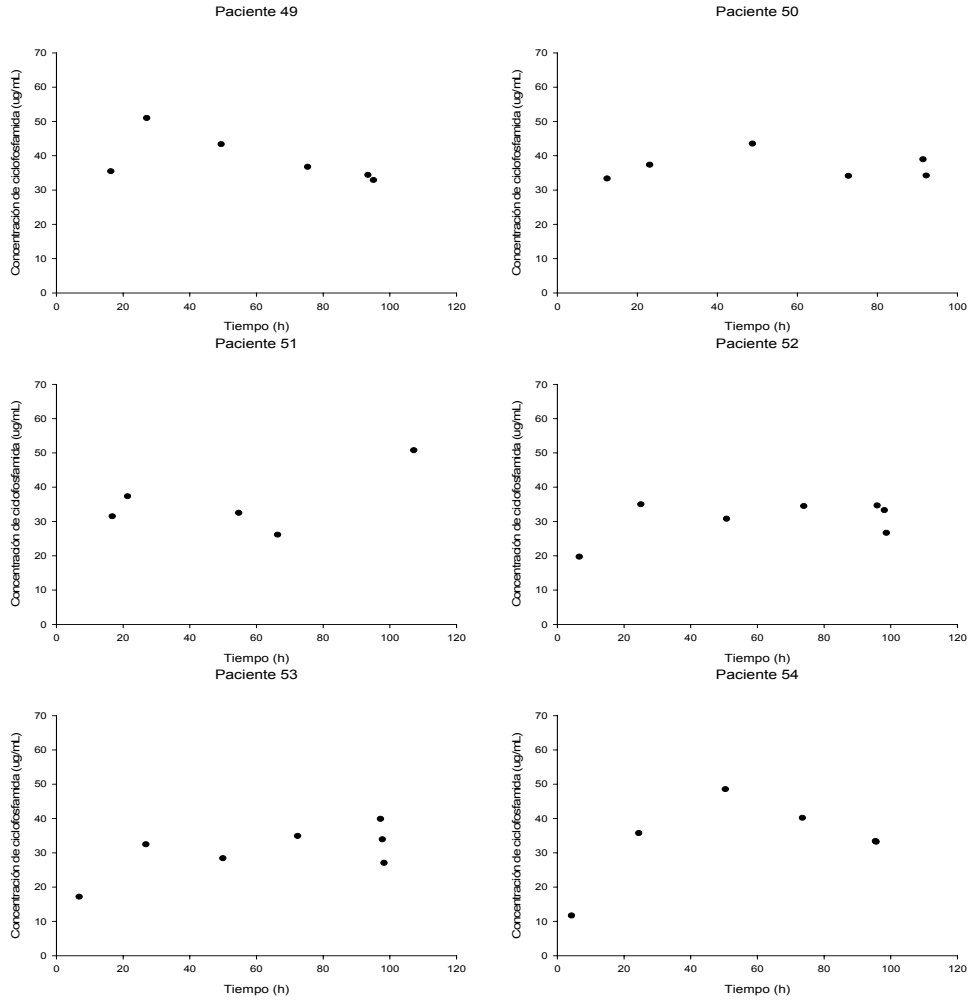
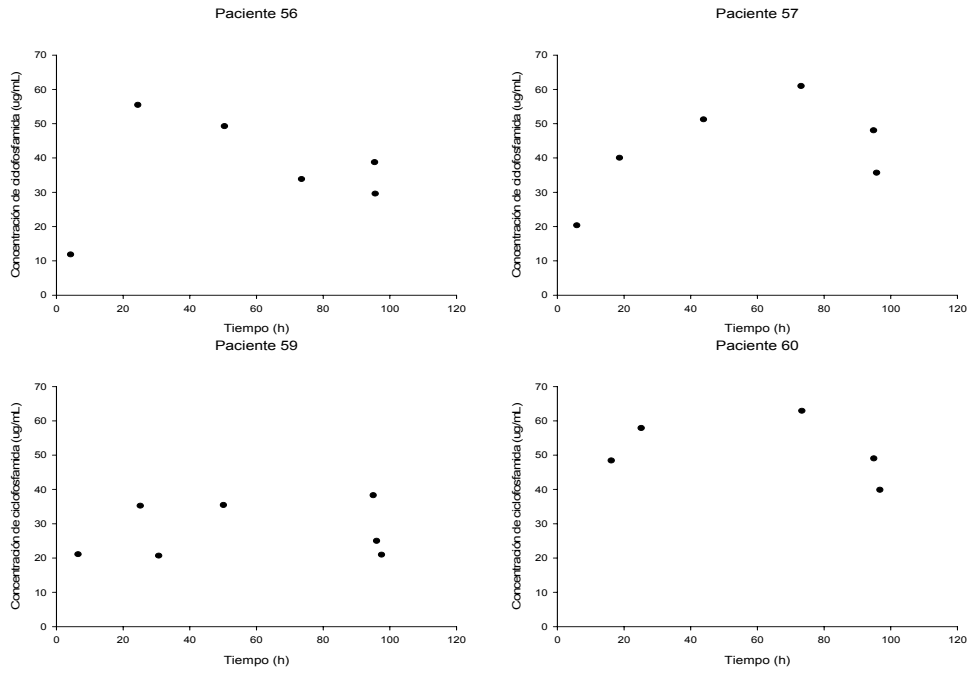
Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (VIII).

Figura A.7. Relación concentración plasmática tiempo para cada paciente (IX).



ANEXO 8 Subpoblaciones.

En la Tabla A.8. se muestran a que subpoblación pertenecen las pacientes subpoblación 1 con CL 3 L/h subpoblación 2 con CL 1.7 L/h.

Tabla A.8.Subpoblaciones (I)

Paciente	Subpoblación
1	1
2	1
5	2
6	2
7	2
8	2
10	2
11	2
12	1
13	2
14	1
15	1
16	1
17	1
18	1
20	1
21	1
22	1
23	2
24	1
25	1
25	1
26	1
28	1
29	1
30	2
31	2
32	1
33	1
34	2
35	2

Tabla A.8. Subpoblaciones (II)

Paciente	Subpoblación
36	2
37	2
38	2
39	2
40	1
41	2
42	2
43	1
44	2
45	2
46	2
48	2
49	2
50	2
51	2
52	2
53	1
54	2
56	2
57	2
59	1
60	2

ANEXO 9 Covariables.

En la tabla A.9. se muestran las covariables para cada uno de los pacientes del estudio.

Tabla A.9. Covariables (I)

Paciente	Peso	Talla	Fracción Eyección	Edad	BSA
1	52.0	150	0.61	38.40	1.46
2	83.3	164	0.66	47.93	1.90
5	80.0	150	0.68	46.86	1.75
6	81.0	155	0.79	46.68	1.80
7	62.0	157	0.62	39.99	1.62
8	84.0	158	0.52	48.29	1.85
10	50.9	154	0.80	58.52	1.47
11	86.0	156	0.65	54.44	1.86
12	74.6	153	0.79	46.52	1.72
13	72.0	160	0.72	51.50	1.75
14	84.0	161	0.80	50.92	-
15	66.0	159	0.72	37.02	1.68
16	74.0	158	0.69	33.37	1.76
17	68.5	155	0.72	56.36	1.68
18	74.0	166	0.69	44.44	1.82
20	62.5	154	0.65	58.10	1.61
21	85.0	149	0.82	55.24	1.79
22	72.7	156	0.69	48.76	1.73
23	75.5	156	0.61	56.18	1.76
24	78.0	164	0.71	29.65	1.85
25	66.0	158	0.60	35.42	1.67
26	63.0	162	0.62	45.06	1.67
28	74.0	167	0.63	41.84	1.83
29	66.0	156	-	51.00	-
30	53.3	162	0.55	39.41	1.56
31	72.2	153	0.79	50.58	1.70
32	45.5	149	0.71	48.93	1.37
33	58.5	159	0.75	52.36	1.60
34	54.0	162	0.69	37.97	1.57
35	96.6	163	0.69	36.08	2.01

Tabla A.9. Covariables (II).

Paciente	Peso	Talla	Fracción Eyección	Edad	BSA
36	64.2	156	0.69	60.58	1.64
37	69.6	155	0.74	53.00	1.69
38	53.8	150	0.76	49.27	1.48
39	77.0	157	0.61	57.98	1.78
40	56.0	159	0.79	33.78	1.57
41	66.6	159	0.48	49.24	1.69
42	62.5	164	0.55	60.79	1.68
43	75.0	159	0.60	54.19	1.78
44	69.5	157	0.50	38.32	1.70
45	54.0	168	0.45	30.65	1.61
46	85.0	167	0.48	56.86	1.94
48	99.3	165	0.53	46.18	2.05
49	71.0	155	0.58	47.55	1.70
50	86.2	159	0.39	55.34	1.90
51	73.0	151	-	59.75	-
52	65.0	154	-	50.17	-
53	72.7	151	0.63	56.25	-
54	60.9	167	-	34.42	-
56	70.6	157	0.76	39.00	-
57	64.0	154	0.73	46.25	-
59	67.0	148	0.57	49.00	-
60	49.5	157	0.57	32.58	-

Tabla A.9. Covariables (III).

Paciente	Glucosa	Urea	Ac. úrico	Creatinina	Proteínas totales
1	84.0	26.0	2.7	0.7	7.8
2	117.0	36.0	4.4	1.0	6.8
5	123.0	26.0	4.4	0.8	6.9
6	94.0	26.0	1.1	0.8	6.7
7	90.0	25.0	1.9	0.6	5.4
8	96.0	30.0	6.2	0.9	7.2
10	126.0	30.0	3.8	0.7	6.5
11	125.0	25.0	2.9	0.8	6.2
12	101.0	30.0	5.5	0.9	6.9
13	104.0	23.0	2.4	0.9	6.9
14	95.0	17.0	-	0.8	6.6
15	96.0	22.0	3.5	0.7	6.6
16	131.0	16.0	2.1	0.8	6.9
17	98.0	40.0	3.4	0.8	7.9
18	94.0	38.1	4.0	0.8	7.3
20	126.0	20.0	4.6	0.8	6.4
21	104.0	32.0	6.4	0.8	7.7
22	117.0	38.0	6.0	0.8	6.6
23	62.0	29.0	2.6	0.7	6.7
24	82.0	30.0	3.5	0.8	7.1
25	83.0	21.0	2.7	0.7	5.9
26	92.0	38.0	3.4	0.8	6.9
28	207.0	19.0	4.0	0.9	7.1
29	-	-	-	0.7	7.1
30	88.0	20.0	4.1	0.6	7.4
31	108.0	29.0	5.0	0.7	6.1
32	143.0	27.0	4.3	0.7	6.8
33	100.0	24.0	4.2	0.6	5.9
34	121.0	33.0	4.0	0.7	6.2
35	79.0	37.0	6.1	0.7	6.1
36	118.0	28.0	5.7	0.8	5.8
37	104.0	27.0	4.3	0.7	6.0
38	114.0	23.0	4.7	0.9	6.6
39	112.0	29.0	6.1	1.2	6.8
40	103.0	31.0	1.7	0.7	6.7
41	99.0	54.0	4.9	0.8	7.2
42	96.0	22.0	4.1	0.8	6.7
43	223.0	30.0	9.8	0.6	7.3

Tabla A.9. Covariables (IV).

Paciente	Glucosa	Urea	Ac. úrico	Creatinina	Proteínas totales
44	120.0	26.0	3.9	0.6	5.9
45	213.0	22.0	3.0	0.6	5.4
46	96.0	33.0	7.1	1.0	6.4
48	107.0	29.0	5.6	0.8	6.3
49	90.0	28.0	4.9	0.7	7.1
50	93.0	30.0	2.5	0.7	7.5
51	112.0	35.0	1.8	0.8	6.8
52	134.0	143.0	5.1	2.0	6.7
53	146.0	76.0	3.1	1.2	-
54	107.0	33.0	-	0.6	-
56	100.0	19.0	-	0.8	7.1
57	111.0	56.0	-	0.7	6.7
59	125.0	46.0	1.3	0.6	7.4
60	129.0	35.0	-	0.6	6.4

Tabla A.9. Covariables (V).

Paciente	ALAT	ASAT	ALAT/ASAT	GGT	LDH
1	32	23	1.39	21	111
2	13	12	1.08	14	149
5	10	10	1.00	18	160
6	11	10	1.10	6	39
7	8	6	1.33	7	137
8	17	11	1.55	10	169
10	11	9	1.22	7	130
11	8	6	1.33	40	202
12	15	6	2.50	18	135
13	26	12	2.17	16	128
14	72	36	2.00	22	230
15	9	5	1.80	12	111
16	9	9	1.00	10	112
17	26	15	1.73	6	163
18	10	7	1.43	6	128
20	9	5	1.80	12	160
21	33	20	1.65	16	177
22	16	9	1.78	38	220
23	7	6	1.17	4	132
24	56	6	9.33	12	113
25	7	7	1.00	5	106
26	66	16	4.13	8	120
28	29	12	2.42	24	175
29	36	20	1.80	48	282
30	17	24	0.71	17	248
31	79	65	1.22	31	428
32	21	21	1.00	40	241
33	59	27	2.19	64	282
34	62	36	1.72	19	250
35	61	26	2.35	40	284
36	28	18	1.56	47	520
37	15	13	1.15	16	250
38	35	18	1.94	33	318
39	26	24	1.08	16	379
40	18	27	0.67	8	209
41	17	27	0.63	28	394
42	15	18	0.83	21	205

Tabla A.9. Covariables (VI).

Paciente	ALAT	ASAT	ALAT/ASAT	GGT	LDH
43	53	33	1.61	64	277
44	118	56	2.11	22	368
45	80	47	1.70	14	314
46	11	11	1.00	22	293
48	31	18	1.72	25	402
49	34	31	1.10	16	287
50	121	65	1.86	455	614
51	7	20	0.35	75	513
52	35	14	2.50	111	226
53	42	42	1.00	221	294
54	43	35	1.23	39	228
56	36	20	1.80	48	282
57	15	15	1.00	20	200
59	81	29	2.79	71	687
60	34	43	0.79	12	387

Tabla A.9. Covariables (VII).

Paciente	Hemoglobina	Plaquetas	TP	TTPA
1	11.6	268,000	11.0	34.2
2	10.6	355,000	10.8	25.4
5	13.5	128,000	11.0	25.0
6	12.2	224,000	11.7	32.4
7	11.9	136,000	13.4	37.4
8	13.3	314,000	11.5	30.4
10	12.0	217,000	11.0	28.0
11	10.9	295,000	11.2	33.9
12	13.4	263,000	11.5	36.0
13	13.1	293,000	10.7	20.9
14	11.4	160,000	10.9	26.3
15	11.2	233,000	10.9	27.8
16	10.8	216,000	12.5	28.5
17	11.8	208,000	12.9	28.3
18	12.3	73,000	12.2	29.2
20	7.8	257,000	10.5	26.3
21	12.5	226,000	12.1	31.1
22	10.9	220,000	12.6	27.5
23	11.4	166,000	11.7	25.7
24	12.0	579,000	11.3	29.2
25	9.9	197,000	12.9	33.8
26	12.1	143,000	12.7	30.7
28	10.4	134,000	12.2	38.6
29	8.2	12,000	13.7	46.2
30	11.3	238,000	12.7	31.7
31	12.1	97,000	11.9	25.1
32	10.8	95,000	11.5	22.5
33	9.5	284,000	10.0	25.5
34	10.0	277,000	11.0	30.0
35	9.7	131,000	11.2	28.6
36	8.8	273,000	12.0	25.5
37	10.3	201,000	11.6	25.4
38	9.2	263,000	11.5	24.4
39	9.9	332,000	11.2	37.2
40	10.6	214,000	11.6	31.7
41	11.7	228,000	11.2	33.2
42	12.9	254,000	12.2	28.8
43	10.7	280,000	12.0	89.0

Tabla A.9. Covariables (VIII).

Paciente	Hemoglobina	Plaquetas	TP	TTPA
44	10.3	139,000	12.0	29.0
45	9.1	109,000	13.0	31.0
46	9.2	114,000	11.0	37.0
48	10.9	218,000	12.0	26.0
49	11.0	198,000	12.4	36.9
50	10.3	58,000	10.4	32.1
51	10.7	29,000	12.0	34.2
52	7.7	6,000	11.7	34.9
53	7.6	12,000	13.3	57.0
54	9.7	30,000	10.8	29.0
56	7.8	130,000	12.6	46.2
57	8.8	24,000	12.4	39.5
59	11.0	46,000	11.4	34.7
60	8.4	98,000	13.1	36.1

Tabla A.9. Covariables (IX).

Paciente	Fibrinógeno	Bilirrubina	5HT3
1	2.8	0.6	Ondansetrón
2	4.3	0.5	Ondansetrón
5	2.3	0.5	Ondansetrón
6	3.8	0.4	Ondansetrón
7	3.2	0.2	Ondansetrón
8	3.7	0.4	Ondansetrón
10	2.4	0.7	Granisetrón
11	4.2	0.3	Ondansetrón
12	3.0	0.3	Ondansetrón
13	4.2	0.3	Granisetrón
14	2.7	-	Ondansetrón
15	2.7	0.4	Ondansetrón
16	2.7	0.2	Ondansetrón
17	2.7	0.3	Tropisetrón
18	3.1	0.7	Tropisetrón
20	2.7	0.6	Tropisetrón
21	3.4	0.5	Tropisetrón
22	3.2	0.4	Tropisetrón
23	3.6	0.2	Tropisetrón
24	3.7	0.3	Tropisetrón
25	1.8	0.2	Tropisetrón
26	1.9	0.5	Tropisetrón
28	2.4	0.3	Tropisetrón
29	3.5	-	Tropisetrón
30	2.9	0.7	Tropisetrón
31	2.6	0.4	Tropisetrón
32	2.2	0.4	Tropisetrón
33	3.1	0.4	Tropisetrón
34	2.4	0.5	Tropisetrón
35	2.2	0.4	Tropisetrón
36	3.1	0.4	Tropisetrón
37	4.1	0.5	Tropisetrón
38	3.0	0.6	Tropisetrón
39	3.8	0.5	Tropisetrón
40	2.7	0.3	Tropisetrón
41	2.9	0.5	Tropisetrón
42	3.1	0.5	Tropisetrón
43	2.9	0.5	Ondansetrón

Tabla A.9. Covariables (X).

Paciente	Fibrinógeno	Bilirrubina	5HT3
44	3.2	0.2	Ondansetrón
45	2.8	0.4	Ondansetrón
46	3.1	0.2	Ondansetrón
48	2.4	0.4	Ondansetrón
49	3.1	0.6	Tropisetron
50	6.8	0.5	Tropisetron
51	5.2	0.8	Tropisetron
52	6.4	0.9	Tropisetron
53	8.1	0.5	Tropisetron
54	2.8	-	Tropisetron
56	3.5	-	Ondansetrón
57	2.8	-	Ondansetrón
59	4.1	0.3	Ondansetrón
60	4.9	-	Ondansetrón

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Aarons L. Population pharmacokinetics: Theory and practice. *Br J Clin Pharmacol* 1991a; 32: 669-670.
- 2 Aarons L, Mandema W, Danhof M. A population analysis of the pharmacokinetic and pharmacodynamic of midazolam in the rat. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991b; 19: 485-496.
- 3 Akaike, Hirotugu. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 1974;16:716-723.
- 4 Al-Banna MK, Kelman AW, Whiting B. Experimental designs and efficient parameter estimation in populations pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1990; 18: 347-360.
- 5 Amador ML, Jimeno A, Hitt R et al. Dose and dose intensity effect of adjuvant anthracycline-base chemotherapy in early breast cancer. A retrospective analysis. *Am J Clin Oncol* 2004; 27:269-273.
- 6 American Hospital Formulary Service. *Drug Information 98*. American Society of Health-System Pharmacists. Bethesda, 1998.

- 7 American Society of Clinical Oncology, Atlanta (Georgia), 15-18 de mayo de 1999.
- 8 Antal EJ, Grasela TH Jr, Smith RB. An evaluation of population pharmacokinetics in therapeutic trials. Part III. Prospective data collection versus retrospective data assembly. *Clin Pharmacol Ther* 1989 Nov;46(5):552-9.
- 9 Anderson LW, Ludeman SM, Colvin OM, Grochow LB, Strong JM. Quantitation of 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide in whole blood. *J Chromatogr B* 1995;667:247-257.
- 10 Anderson LW, Chen TL, Colvin OM, et al. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide/aldophosphamide kinetics in patients receiving high-dose cyclophosphamide chemotherapy. *Clin Can Res* 1996; 2: 1481-1487.
- 11 Antman K, Ayash L, Elias A, et al. A Phase II study of high-dose of cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin with autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to estándar-dose therapy. *J Clin Oncol* 1992; 10: 102.
- 12 Antman KH. Critique of the high-dose chemotherapy studies in breast cancer: a positive look at the data. 1: *J Clin Oncol*. 1999 Nov;17(11 Suppl):30-4.
- 13 Ariëns EJ. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol*. 1984;26(6):663-8.
- 14 Ayash, LJ; Wright JE, Tretyakov O. Cyclophosphamide pharmacokinetics: correlation with cardiac toxicity and tumor response. *J Clin Oncol* 1992;10: 995-1002.
- 15 Bagley CM, Bostick FW, De Vita VD, Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Research* 1973; 33: 226-235.
- 16 Bailey H, Mulcahy RT, Tutsch KD, Rozental JM, Alberti D, Arzoomanian RZ, et al. A phase I study of SR-2508 and cyclophosphamide administered by intravenous injection. *Cancer Res* 1991 Feb 15;51(4):1099-104.
- 17 Bahr U, Schulten HR, Hommes OR, et al. Determination of cyclophosphamide in urine, serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients by field desorption mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 1981;103:183.
- 18 Baumann F, Lorenz C, Jaehde U, Preiss R. Determination of cyclophosphamide and its metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;729(1-2):297-305.
- 19 Beal SL. Population pharmacokinetic data and parameter estimation based on their first two moments. *Drug Metabol. Rev.* 1984; 15: 173-193.
- 20 Beal SL, Sheiner LB. NONMEM users Guide. Conditional estimation methods. Part VII. NONMEM Project Group. San Francisco. Universidad de California 1992.
- 21 Beal SL, Sheiner LB. NONMEM users Guide. Users Basic Guide. Part I. NONMEM Project Group. San Francisco. Universidad de California 1989.

- 22 Beal SL, Sheiner LB. NONMEM user's Guide. User's Basic Guide. Division of Clinical Pharmacology, University of California, San Francisco 1979.
- 23 Belfayol L, Guillevin L, Louchahi K, Lortholary O, Bosio AM, Fauvelle F. Measurement of 4-hydroxycyclophosphamide in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1995;663:395-399.
- 24 Benvenuto J. Stability and compatibility of antitumor agents in glass and plastic containers. *Am J Hosp Pharm* 1981; 24:425-433.
- 25 Bergh J, Wiklund T, Erikstein B, et al.: Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomised trial. Scandinavian Breast Group 9401 study. *Lancet* 2000;356 (9239): 1384-91.
- 26 Blaschke G, Maibaum J. Chromatographic resolutions.XIV.Optical resolution of the racemic anticancer drug ifosfamide and other chiral oxazaphosphorines. *J Chromatogr* 1986;336:329-334.
- 27 Boddy A, Yule M. Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38(4):291-304.
- 28 Boddy AV, Cole M, Pearson ADJ, Idle JR. The kinetics of the autoinduction of ifosfamide metabolism during continuous infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36:53-36.
- 29 Bohnenstengel F, Johnson S, Hofmann U, Eichelbaum M, Kroemer HK. Direct gas chromatographic determination of dechloroethylcyclophosphamide following incubation of cyclophosphamide. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995; 672: 271-276.
- 30 Bomhard EM, Schmidt U, Loser E. Time course of enzyme induction in liver and kidneys and absorption, distribution and elimination of 1,4-dichlorobenzene in rats. *Toxicology* 1998;131:73-91.
- 31 Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambeti M, Brambilla C. Adjuvant cyclophosphamide, metotrexate and fluorouracil in node-positive breast cancer. The result of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 1995; 332: 901-906.
- 32 Bonneterre J, Roché H, Kerbrat P, et al. Epirubicin increases long-term survival in adjuvant chemotherapy of patients with poor-prognosis, node-positive, early breast cancer: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 2005;23 (12): 2686-93.
- 33 Bornmann L, IlligerHJ, Herdrich K. Drug interaction in the therapy of malignant tumors. Ed Baxter Oncology 2005.
- 34 Boos J, Welslau U, Ritter J, Blaschke G, Schellong G. Urinary excretion of the enantiomers of ifosfamide and its inactive metabolites in children. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991;28(6):455-460.

- 35 Boyd VL, Robbins JD, Egan W, Ludeman SM. Nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites. *J Med Chem* 1986; 29: 1206-1210.
- 36 Bramwell V, Calvert RT, Edward G, Scarffe H, Crowther D. The disposition of cyclophosphamide in a group of myeloma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1979; 3: 253-259.
- 37 Bruno R, Hille D, Riva A, et al. Population pharmacokinetics /pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with Cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 187-196.
- 38 Bruno R, Njar V. Targeting cytochrome P450 enzymes: A new approach in anticancer drug development. *Bioorg Med Chem* 2007, 15: 5047-5060.
- 39 Bruno R, Vivier N, Vergiol JC. A population pharmacokinetic model for docetaxel (taxotere): Model building and validation. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24: 153-172.
- 40 Budman DR, Berry DA, Cirrincione CT et al. Dose and dose intensity as determinants of outcome in the adjuvant treatment of breast cancer. The Cancer and Leukemia Group B. *J Natl Cancer Inst*, 1998;90(16):1205-1211.
- 41 Burtin P, Jacqz-Aigrain E, Girard P, Lenclen R, Magny JF, Betremieux P, et al. Population pharmacokinetics of midazolam in neonates. *Clin Pharmacol Ther*. 1994 Dec;56(6 Pt 1):615-25.
- 42 Burton LC, James CA. Rapid method for the determination of ifosfamide and cyclophosphamide in plasma by high performance liquid chromatography with solid phase extraction. *J Chromatogr* 1988; 431:450-454.
- 43 Busse D, Busch FW, Bohnenstengel F, et al. Dose escalation of cyclophosphamide in patients with breast cancer: consequences for pharmacokinetics and metabolism. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1885-1896.
- 44 Busse D, Busch FW, Schweizer E, et al. Fractionated administration of high-dose cyclophosphamide: influence on dose-dependent changes in pharmacokinetics and metabolism. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43:263-8.
- 45 Byhardt RW, Hartz A, Libnoch JA, Hansen R, Cox JD. Prognostic influence of TNM staging and LDH levels in small cell carcinoma of lung (SCCL). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:771-7.
- 46 Carroll & Ruppert. *Transformations and Weighthig in Regression*. Chapman & Hall 1998.
- 47 Chang TKH, Weber GF, Crespi CL, et al. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P450 2B and B53A in human liver microsomes. *Cancer Res* 1993; 53: 5629-5637.

- 48 Chang TKH, Yu L, Goldsteiner JA, et al. Identification of the polymorphically expressed CYP2C19 and wide-type CYP2C9-ILE allele as low -km catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation. *Pharmacogenetics* 1997a; 7: 211-221.
- 49 Chen TL, Kenedy MG, Aderson LW, Kiraly SB, Black KC, Colvin M et al. Nonlinear pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide aldophosphamide in patients with metastasic breast cancer receiving high dose chemotherapy followed by autologous bone marrow trasplantation. *Drug Metab Dispo* 1997; 25: 544-551.
- 50 Chen TL, Passos-Coelho, Noe DA, Kennedy MJ, Black KC, Colvin OM, et al. Nonlinear pharmacokinetics of cyclophosphamide in patients with metastasic breast cancer receiving high dose chemotherapy followed by autologous bone marrow trasplantation. *Can Res* 1995; 55: 810-816.
- 51 Chien JY, Thummel E, Stattery JT. Pharmacokinetic consequences of induction of CYP2E1 by ligand stabilization. *Drug Metab Dispos* 1997;25:1165-1175.
- 52 Citron ML, Berry DA, Cirrincione C et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally sheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of intergroup trial C9741/cancer and leukemia group B 9741. *J Clin Oncol* 2003;21(8):1431-1439.
- 53 Climente M. Farmacocinética poblacional de 5-fluoruracilo en pacientes con cancer colorrectal. [Tesis doctoral]. Valencia; 1997.
- 54 Colburn WA, Olson SC. Classic and population pharmacokinetics. En: Welling PG, Tse FL, eds. *Pharmacokinetics. Regulatory, industry, academic perspectives*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1988. p. 337-384.
- 55 Collart L, Blaschke TF, Boucher F, Prober CG. Potential of population pharmacokinetics to reduce the frecuency of blood sampling required for estimating kinetic parameters in neonates. *Dev Pharmacol Ther* 1992; 18: 71-80.
- 56 Colleoni M, Price K, Castiglione-Gertsch M et al. Dose-response effect of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil (CMF) in node-positive breast cancer. International breast cncer study group. *Eur J Cancer* 1998;34:1693-1700.
- 57 Colvin M, Chabner BA. Alkylating agents. In Chabner & Collins (Eds) *Cancer chemotherapy*, 99 276-313. JB Lippincott, Philadelphia. 1990.
- 58 Corlett SA, Parker D, Chrystyn H. Clinical pharmacokinetics of the enantiomers of cyclophosphamide. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 1047.
- 59 Crom WR. Effect of chirality on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Am J Hosp Pharm* 1992;49:S9-S14.
- 60 Curtis RE, Boice JD, Stovall M, et al. Risk of leukemia after chemotherapy and radiation treatment for breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 1745-1751.

- 61 Dang CT, Hudis CA. Dose-dense chemotherapy: ready for prime time. *Breast Cancer Online* (www.bco.org) 2005;8(5).
- 62 D'Argenio DZ. Optimal sampling times for pharmacokinetic experiments. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9: 739-756.
- 63 D'Incalci M, Bolis G, Facchinetti T, Mangioni C, Morasca L, Morazzoni P, Salmona M. Decreased half life of cyclophosphamide in patients under continual treatment. *Eur J Cancer* 1979 Jan;15(1):7-10.
- 64 Dockham PA, Lee MO, Sladek NE. Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 2453-2469.
- 65 Dockham PA, Sreerama L, Sladek NE. Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of the oxazaphosphorines. *Drug Metab Disp* 1997; 25: 1436-41.
- 66 Dodge WF, Jelliffe RW, Richardson CJ et al. Population pharmacokinetic models: measures of central tendency. *Drug Invest* 1993; 5: 206-211.
- 67 Dodge WF, Jelliffe RW, Richardson CJ, et al. Gentamicin population pharmacokinetic models for low birth weight infants using a new nonparametric method. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50: 25-31.
- 68 Dodge WF, Jelliffe RW, Zwischenberger JB, et al. Population pharmacokinetic models: effect of explicit versus assumed constant serum concentration assay error patterns upon parameter values of gentamicin in infants on and off extracorporeal membrane oxygenation. *Ther Drug Monit* 1994; 16: 552-559.
- 69 Dooley JS, James CA, Rogers HJ, Stuart-Harris R. Biliary elimination of cyclophosphamide in man. *Cancer Chemother Pharmacol* 1982; 9: 26-29.
- 70 Dunphy FR, Spitzer G, Buzdar AU, et al. Treatment of estrogen receptor-negative or hormonally refractory breast cancer with double high-dose chemotherapy intensification and bone marrow support. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1207-1216.
- 71 E. de Jonge M, Huitema A, Rohenhuis S. High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy. *Br J Cancer* 2006; 94: 1226-1230.
- 72 E. de Jonge M, Huitema A, Rohenhuis S, Beijnen J. Integrated population pharmacokinetic model of both cyclophosphamide and thiotepa suggesting a mutual drug-drug interaction. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2004b;31:135-156.
- 73 E. de Jonge M., Huitema A, Tukker A, van Dam S, Rohenhuis S, Beijnen J. Accuracy, feasibility and clinical impact of prospective bayesian pharmacokinetically guided dosing of cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin in high-dose chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 2005a;11:273-283.

- 74 E. de Jonge M, Huitema A, Tukker A, van Dam S, Rodenhuis S, Beijnen J. Accuracy, feasibility and clinical impact of prospective bayesian pharmacokinetically guided dosing of cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin in high-dose chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005b Jan 1;11(1):273-83.
- 75 E. de Jonge M, Huitema AD, van Dam S, Rodenhuis S, Beijnen J. Effects of co-medicated drugs on cyclophosphamide bioactivation in human liver microsomes. *Anticancer Drugs* 2005c; 16:331-6.
- 76 E. de Jonge M, Huitema AD, van Dam S, Rodenhuis S, Beijnen J. Population Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites 4-hydroxycyclophosphamide, 2-dechloroethylcyclophosphamide, and phosphoramidate mustard in a high-dose combination with thiotepa and carboplatin. *Ther Drug Monit* 2005a;27:756-765.
- 77 E. de Jonge M, Mathot RA, Dalesio O, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Relationship between irreversible alopecia and exposure to cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin (CTC) in high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30:593-7.
- 78 E. de Jonge M, van Dam S, Hillebrand MJ, Rosing H, Huitema AD, Rodenhuis S, et al. Simultaneous quantification of cyclophosphamide, 4-hydroxycyclophosphamide, N, N,N-triethylenethiophosphoramidate (thiotepa) and N, N, N, -triethylenethiophosphoramidate (tepa) in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2004a; 39:262-271.
- 79 Eder JP, Antman K, Elias A et al. Cyclophosphamide and thiotepa with autologous bone marrow transplantation in patients with solid tumors. *J Natl Can Inst* 1988; 80: 1221-1226.
- 80 Edrenyi, L. Design of experiments for estimating enzyme and pharmacokinetic experiments. En: Edrenyi L, de. *Kinetic data analysis, design and analysis of enzyme and pharmacokinetic experiments.* New York: Plenum Press, 1981: 137-167.
- 81 Edwards G, Calvert RT, Crowther D, Bramwell V, Scarffe H. Repeated investigations of cyclophosphamide disposition in myeloma patients receiving intermittent chemotherapy. *B J Clin Pharmacol*, 1980; 10: 2081-285.
- 82 Ekhardt C, Gebretensae A, Rosing H, Beijnen JH, Huitema AD. Simultaneous quantification of cyclophosphamide and its active metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 854: 345-349.
- 83 Ekhardt C, Doodeman VD, Rodenhuis S, Simits PH, Beijnen JH, Huitema AD. Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B56, CYP2C9,

CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet Genomics* 2008a; 18:515-523.

84 Ekhart C, Kerst JM, Rodenhuis S, Beijnen JH, Huitema AD. Altered cyclophosphamide and thiotepa pharmacokinetics in patients with moderate renal insufficiency. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008c;23.

85 Ekhart C, Rodenhuis S, Beijnen JH, Huitema AD. Relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and toxicity of chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. *Pharmacogenet Genomics* 2008b; 18:1009-15.

86 Ekhart C, Rodenhuis S, Beijnen JH, Huitema AD. Carbamazepine induces bioactivation of cyclophosphamide and thiotepa. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008d; 24.

87 El Yazigi A, Martin CR. Improved analysis of cyclophosphamide by capillary gas chromatography with thermionic specific detection and silica sample purification. *J Chromatogr Biomed Appl* 1986 ;47:177-182.

88 Elsherbiny D, Asimus S, Karlsson M, Ashton M, Ulrika Simonsson. A model based assessment of the CYP2B6 and CYP2C19 inductive properties by artemisinin antimalarials: implications for combinations regimens. *J pharmacokinet Pharmacodyn* 2008;35:203-217.

89 Ellaithy MM, El-Tarras MF, Tadros NB, Amer MM. Polarographic and colorimetric methods for determination of cyclophosphamide. *J Assoc Off Anal Chem* 1984;67:679-681.

90 Ette EI, Kelman AW, Howie CA, Whiting B. Interpretation of simulation studies for efficient estimation of population pharmacokinetic parameters. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 1034-1039.

91 Ette, EI. Statistical graphics in pharmacokinetics and pharmacodynamics: A tutorial. *Ann Pharmacother* 1998; 32: 818-28.

92 Evans W, Relling V, Rodman J, Crom W, Bonett J, Pui C. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 338: 499-505.

93 Fadiran EO, Jones CD, Ette EI. Designing population pharmacokinetic studies : performance of mixed designs. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2000;25:231-239.

94 Fasola G, Lo Greco P, Calori E, Zilli M, Verlicchi F, Motta MR, et al. Pharmacokinetics of high-dose cyclophosphamide for bone marrow transplantation. *Haematologica* 1991 Mar-Apr;76(2):120-5.

- 95 Farquhar C, Marjoribanks J, Bassler R, et al. High dose chemotherapy and autologous bone marrow or stem cell transplantation versus conventional chemotherapy for women with metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005 (3): CD003142.
- 96 Farquhar C, Marjoribanks J, Lethaby A, Bassler R. High dose chemotherapy for poor prognosis breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2007; 33: 325-37.
- 97 Fisher B, Anderson S, Wickerham DL et al. Increased intensification and total dose of cyclophosphamide in a doxorubicin-cyclophosphamide regimen for the treatment of primary breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-22. *J Clin Oncol* 1997; 15(5): 1858-1869.
- 98 Fisher B, Anderson S, DeCillis A et al. Further evaluation of intensified and increased total dose of cyclophosphamide for the treatment of primary breast cancer: finding national surgical adjuvant breast and bowel project B-25. *J Clin Oncol* 1999; 17(11):3374-3388.
- 99 Frame B, Beal SL. Non-steady state population kinetics of intravenous phenytoin. *Ther Drug Monit* 1998;20:408-416.
- 100 Frame B, Miller R, Lanlonde RL. Evaluation of mixture modeling with count data using NONMEM. *J. Pharmacokin Pharmacodyn* 2003; 30(3):167-183.
- 101 Friedman HS, Colvin OM, Griffith OW, Lippitz B, Elion GB, Schold SC Jr, Hilton J, Bigner DD. Increased melphalan activity in intracranial human medulloblastoma and glioma xenografts following buthionine sulfoximine-mediated glutathione depletion. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Apr 5;81(7):524-7
- 102 Friedman OM. Recent biologic and chemical studies of cyclophosphamide (NSC 26271). *Cancer Chemother Rep* 1967; 51:327-333.
- 103 Fumoleau P, Kerbrat P, Romestaing P et al. Randomized trial comparing six versus three cycles of epirubicin-based adjuvant chemotherapy in premenopausal, node-positive breast cancer patients: 10 year follow-up results of the french adjuvant study group 01 trial. *J Clin Oncol* 2003; 70:298-305.
- 104 Galleli JF. Stability of studies of drug used in intravenous solutions: Part I. *Am J Hosp Pharm* 1967; 24: 425-433.
- 105 Gallo JM, Brennan J, Hamilton TC, et al. Time-dependent pharmacodynamic models in cancer chemotherapy: population pharmacodynamic model for glutathione depletion following modulation by buthionine sulfoximine (BSO) phase I trial of melphalan and BSO. *Cancer Res* 1995; 55: 4507-4511.
- 106 García ST, McQuillan A, Panasci L. Correlation between the cytotoxic of melphalan and DNA crosslinks as detected by the ethidium bromide fluorescence assay. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 3189-3196.

- 107 Gast GC, Vyth-Dreese FA, Nooijen W, van den Bogaard CJ, Sein J, Holtkamp MM, Linthorst GA, Baars JW, Schornagel JH, Rodenhuis S. Reinfusion of autologous lymphocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces rapid recovery of CD4+ and CD8+ T cells after high-dose chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):58-64.
- 108 Gianni A, Bonadonna G. Five-year results of the randomized clinical trial comparing standard versus high-dose myeloablative chemotherapy in the adjuvant treatment of breast cancer with more than 3 positive nodes. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 21a (Abstr 80).
- 109 Gilman TM, Brunnemann SR, Segal JL. Comparison of population pharmacokinetic models for gentamicin in spinal cord-injured and able-bodied patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 93-99.
- 110 Gordi T, Xie R, Huong NV, Huong M, Karlsson MO, Ashton A. Semiphysiological pharmacokinetic model for artemisinin in healthy subjects incorporating autoinduction of metabolism and saturable first-pass hepatic extraction. *Br J Clin Pharmacol* 2005;59:189-198.
- 111 Graham MI, Shaw IC, Souhami RL, et al. Decreased plasma half-life of cyclophosphamide during repeated high-dose administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 1983;10:192-193.
- 112 Graville CP, Gehrcke B, Konig WA, Wainer IW. Determination of the enantiomers of ifofamide and its 2-and 3-N-dechloroethylated metabolites in plasma and urine using enantioselective gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr* 1993;22(1):21-31.
- 113 Grasela TH, Antal EJ, Ereshefsky L, Wells BG, Evans RL, Smith RB. An evaluation of population pharmacokinetics in therapeutic trials. Part II. Detection of a drug-drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 42: 433-441.
- 114 Grasela TH, Antal EJ, Townsend RJ, Smith RB. An evaluation of population pharmacokinetics in therapeutic trials. Part I. Comparison of methodologies. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 39: 605-612.
- 115 Grasela TH, Donn SM. Neonatal population pharmacokinetics of phenobarbital derived from routine clinical data. *Dev Pharmacol Ther* 1985; 8: 374-383.
- 116 Grochow LB, Colvin M. Clinical Pharmacokinetics of cyclophosphamide. In Ames et al (Eds) *Pharmacokinetic of anticancer agents in humans*. Elsevier. Amsterdam. 1983. pp 135-154.
- 117 Grochow LB. Individualized dosing of anti-cancer drugs and the role of therapeutic monitoring. En Grochow L, Ames M. *A clinician's guide to chemotherapy pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 1ª ed. USA: Williams Wrzosek; 1998. pp 3-53.

- 118 Gurney H, Dodwell D, Thather N. Escalating drug delivery in cancer chemotherapy: A review of concepts and practice-Part 1. *Ann Oncol* 1993a; 4: 23-34.
- 119 Gurney H, Dodwell D, Thather N. Escalating drug delivery in cancer chemotherapy: A review of concepts and practice-Part 2. *Ann Oncol* 1993b; 4: 103-115.
- 120 Gurney H. Dose calculation of anticancer drugs: a review of the current practice and introduction of an alternative. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2590-2611.
- 121 Hadidi AHFA, Idle JR. Combined thin-layer chromatography-photography-densitometry for the quantitation of cyclophosphamide and its four principal urinary metabolites. *J Chromatography* 1988a;427:121.
- 122 Hadidi AHFA, Coulter CE, Idle JR. Phenotypically deficient urinary elimination of carboxyphosphamide after cyclophosphamide administration to cancer patients. *Cancer Res* 1988b; 48: 5167-5171.
- 123 Hardy RW, Erlichman C, Soldin SJ. High performance liquid chromatography measurement of cyclophosphamide in serum. *Ther Drug Monit* 1984; 6: 313-318.
- 124 Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:1-26.
- 125 Hassan M, Svensson USH, Ljungman P, Björkstrand B, Olsson H, Bielenstein M, et al. A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:669-677.
- 126 Hohorst HJ, Bielicki L, Voelcker G. The enzymatic basis of cyclophosphamide specificity. *Adv Enzyme Regul* 1986; 25: 99-122.
- 127 Hohorst HJ, Draeger U, Peter G. The problem of oncostatic specificity of cyclophosphamide. *Cancer Treatment Reports* 1976; 60: 309-315.
- 128 Holford NHG. Input from the deep south compartment. A personal viewpoint. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29: 139-141.
- 129 Hortobagyi G. High-dose Chemotherapy for Primary breast cancer: facts versus anecdotes. *J Clin Oncol* 1999;17(S):25-29.
- 130 Horton R. After Bezwoda. *The Lancet* 2000;355:942-943.
- 131 Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York: Wiley. 1989.
- 132 Hryniuk W, Levine MN. Analysis of dose intensity for adjuvant chemotherapy trials in stage II breast cancer. *J Clin Oncol* 1986b; 4(8):1162-1170.
- 133 Hryniuk WM. More is Better. *J Clin Oncol* 1986a; 6: 1365-1367.
- 134 Hryniuk WM. The importance of dose intensity in the outcome of chemotherapy. *Important Adv Oncol* 1988; 3: 121-141.
- 135 Huitema A.D.R., Kerbusch T, Tibben M.M. et al. Modelling of the pharmacokinetics(PK) and autoinduction of high-dose cyclophosphamide in human

(CP) and 4-hydroxycyclophosphamide (HCP) using NONMEM. Proc Am Ass Cancer Res 1999;40:383.

136 Huitema A.D.R., Tibben M.M., Kerbusch, J.J. Kettenes-van den Bosh, Rodenhuis, Beijnen J.H. High performance liquid chromatographic determination of the stabilized cyclophosphamide metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in plasma and red blood cells. J Liq Chromatogr Rel Tech 2000a;23:1725-1744.

137 Huitema A.D.R., Kerbusch T, Tibben M.M., Rodenhuis S.,Beijnen J.H. Reduction of cyclophosphamide bioactivation by thiotepa: Critical sequence-dependency in high-dose chemotherapy regimens. Cancer Chemother Pharmacol 2000b;46:119-127.

138 Huitema A.D.R.,Mathot R.A.A., Tibben M.M., Rodenhuis S, Beijnen J.H. A mechanism-based pharmacokinetic model for the cytochrome P450 drug-drug interaction between cyclophosphamide and thiotepa and the autoinduction of cyclophosphamide. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 2001;28:211-230.

139 Huitema A.D.R., Tibben M.M., Kerbusch T, Zwikker J.W., Rodenhuis S, Beijnen J.H. Simultaneous determination of N,N', N"-trithylenethiophosphoramidate, cyclophosphamide and some of their metabolites using capillary gas chromatography. J chromatogr B 1998;716:1

140 Huitema A.D.R., Tibben M.M., Kerbusch, J.J. Kettenes-van den Bosh, Rodenhuis, Beijnen J.H. High performance liquid chromatographic determination of the stabilized cyclophosphamide metabolite 4-hydroxycyclophosphamide in plasma and red blood cells. J Liq Chromatogr Rel Tech 2000a;23:1725-1744.

141 Huitema AD, Spaander M, Mathijt RA, Tibben MM, Holtkamp MJ, Beijnen JH, Rodenhuis S. Relationship between exposure and toxicity in high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. Ann Oncol. 2002 Mar;13(3):374-84.

142 Izquierdo I, Rodríguez J, Jelliffe RW. A priori predictive performance of population pharmacokinetic models obtained by three different methods for gentamicin dosing. En: New strategies in drug development & clinical evaluation. The population approach. Manchester 21-23 de Septiembre, 1991.

143 Izquierdo I. Comparación de distintos métodos de estudio poblacional aplicados a la gentamicina. [Tesis doctoral]. Barcelona; 1993.

144 Jelliffe RW, Gomis P, Tahani B et al. A population model of trimethoprim in patients with Pneumocystis pneumonia, made with the nonparametric methods. Ther Drug Monit 1997; 19: 450-459.

145 Jiménez NV. Bases Posológicas en Oncología. 1ª edición. Valencia, 2007. RANF. DL: V-701-2007. ISBN: 978-84-9826-197-4.

- 146 Jiménez NV, Casbó VG, Sancho V. Manual de procedimiento de farmacocinética clínica. AFAHPE, Valencia. 1997.
- 147 Jiménez NV, Pérez-Ruixo JJ, Medina CA, Llopis MC. Estado actual de la individualización posológica de la quimioterapia antineoplásica. *Farm. Hosp.* 1999; 23: 145-157.
- 148 Joerger M, Huitema ADR, Richel D, Dittrich C, Martoni A, Briasoulis E, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin and cyclophosphamide in breast cancer patients. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46:1051-1068.
- 149 Johansson M, Bielenstein M. Determination of 4-hydroxycyclophosphamide in plasma, as 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative of aldophosphoramide, by liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;660(1):111-120.
- 150 Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose-An S-PLUS Based Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model Building Aid for NONMEM. *Computer Methods and Programs in Program Biomedicine* 1999; 58: 51-64.
- 151 Juma FD. Effect of liver failure on the pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984; 26: 591-593.
- 152 Juma FD, Rogers HJ, Trounce JR. The pharmacokinetics of cyclophosphamide, phosphoramide mustard and nor-nitrogen mustard studied by gas chromatography in patients receiving cyclophosphamide therapy. *Br J Clin Pharmacol* 1980;10(4):327-335.
- 153 Juma FD, Rogers HJ, Trounce JR. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Eur J Clin Pharmacol* 1981; 19: 443-451.
- 154 Juma FD, Rogers HJ, Trounce JR. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and alkylating activity in man after intravenous and oral administration. *Br J Clin Pharmacol* 1979; 8: 209-217.
- 155 Kaijser GP, Beijnen JH. Oxazaphosphorines: Cyclophosphamide and ifosfamide. En Grochow L, Ames M. *A clinician's guide to chemotherapy pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 1ª ed. USA: Williams Wzosek; 1998. pp 229-258.
- 156 Kaijser GP, Beijnen JH, Bult A, Keizer HJ, Underberg WJM. Chromatographic analysis of the enantiomers of ifosfamide and some of its metabolites in plasma and urine. *Journal of Chromatography B* 1997;690:131-138.
- 157 Kalhorn TF, Ren S, Howald W, Lawrence R, Slattery JT. Analysis of cyclophosphamide and five metabolites from human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B* 1999;732:287-298.
- 158 Kaniwa N, Aoyagi N, Ogata H. Application of the NONMEM method to evaluation of the bioavailability of drug products. *J Pharm Sci* 1990; 79: 1116-1120.

- 159 Karlsson MO, Molnar V, Bergh J, Frejis A, Larsson R. A general model for time-dissociated pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship exemplified by paclitaxel myelosuppression. *Clin Pharm Ther* 1998; 63: 11-25.
- 160 Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 17-20.
- 161 Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, et al. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990; 75: 1947-1950.
- 162 Kennedy MJ, Beveridge RA, Rowley SD, et al. High-dose chemotherapy with reinfusion of purged autologous bone marrow following dose-intense induction as initial therapy for metastatic breast cancer. *J Nat cancer Inst* 1991; 83: 920-926.
- 163 Kerbusch T, Huitema A, Ouwerkerk J, Ouwerkerk J, Keizer R, Mathot J et al. Evaluation of the autoinduction of ifosfamide metabolism by a population pharmacokinetic approach using NONMEM. *Br. J. Pharmacol* 2000;49:555-561.
- 164 Kisor DF, Watling SM, Zarowitz BJ et al. Population pharmacokinetics of gentamicin. Use of the nonparametric expectation maximization (NPEM) algorithm. *Clin Pharmacokinet* 1992; 23: 62-68.
- 165 Koteseck D, Sage RE, Dale DM et al. Dose intensive therapy with autologous blood stem cell transplantation in breast cancer. *Aust N Z J Med.* 1994; 24:288-95.
- 166 Kritz A, Crowmn JP, Motzer RJ, et al. Beneficial impact of peripheral blood progenitor cells in patients with metastatic breast cancer treated with high-dose chemotherapy plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer* 1993; 71: 2515-2521.
- 167 Lambrechts H, Van Cauwenberghe K, Pattyn G, et al. Capillary gas chromatography –mass spectrometry of oxazaphosphorines. *J High Resolut Chromatogr* 1990; 13; 567-569.
- 168 Leonard RCF, Lind M, Twelves C, et al. Conventional adjuvant chemotherapy versus single -cycle, autograft-supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients: A randomized trial. *Jornal of the National Cancer Institute* 2004;96: 1076-1083.
- 169 Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI et al. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Trials Group. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2651-2658.
- 170 Levy G. Predicting effective drug concentrations for individual patients. Determinants of pharmacodynamic variability. *Clin Pharmacokinet* 1998;34: 323-333.

-
- 171 Levy RH, Lai AA, Dumain MS. Time-dependent kinetics IV: pharmacokinetic theory of enzyme induction. *J Pharm Sci* 1979; 68:398-399.
- 172 Llopis P. Farmacocinética poblacional de vancomicina en pacientes críticos. [Tesis de Licenciatura]. Valencia. 1997.
- 173 Magnusson MO, Dahl ML, Cederberg J, Karlsson MO, Sandstrom R. Pharmacodynamics of carbamazepine -mediated induction of CYP3A4, CYP1A2, and Pgp as assessed by probe substrate midazolam, caffeine, and digoxin. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:52-62.
- 174 Magnusson MO, Karlsson MO, Sandstrom R. A mechanism-based integrated pharmacokinetic enzyme model describing the time course and magnitude of phenobarbital-mediated enzyme induction in the rat. *Pharmaceutical Research* 2006; 23:521-531.
- 175 Mallet A, Mentre F, Steimer JL, Lokiec F. Nonparametric maximum likelihood estimation for population pharmacokinetics with application to cyclosporine. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1988; 16: 311-327.
- 176 Mallet A. A maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models. *Biometrika* 1986; 73: 645-656.
- 177 Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models: models for covariate effects. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1992; 20: 511-28.
- 178 Mandema JW. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics. En: Welling PG, Tse FLS (eds): *Pharmacokinetics: regulatory, industrial academic perspectives*. Marcel Dekker. New York. 1995; 411-450
- 179 Marjinson JM, Wilkinson PM, Cerny T, et al. A simple quantitative HPLC assay for ifosfamide in biological fluids. *Biomed Chromatogr* 1986;1:101-110.
- 180 Masurel D, Wainer IW. Analytical and preparative high performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of ifosfamide, cyclophosphamide and trofosfamide and their determination in plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* 1989; 82: 133-143.
- 181 Masurel D, Houghton PJ, Young CL, Wainer IW. Efficacy, toxicity, pharmacokinetics, and in vitro metabolism of the enantiomers of ifosfamide in mice. *Cancer Res* 1990;50(2):252-255.
- 182 Mateu García MT. Farmacocinética poblacional de gentamicina y tobramicina en pacientes críticos. [Tesis doctoral]. Valencia; 1997.
- 183 Mathias M, Sohr R, Preiss R, Brockman B. Bioavailability of cyclophosphamide following oral administration in high doses. *Onkologic* 1984; 7: 48-49.
- 184 McCauley DL. High -dose chemotherapy with stem-cell rescue for the treatment of breast cancer. *Am J Health-Syst Pharm*, 1996; 53: 521-534.

- 185 McCune JS, Salinger DH, Vicini P, Oglesby , Blough DK, Park JR. Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites in children with neuroblastoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Pharmacol* 2008 oct 16.
- 186 Mcfadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther* 2004;3:363-71.
- 187 McLeod HI, Evans WE. Clinical pharmacodynamics of anticancer drugs. En: Derendorf H, Hochhaus G (eds) *Handbook of pharmacokinetic and pharmacodynamic correlation*. CRC Press, Florida, 1995: 389-413.
- 188 Medina CA. Desarrollo de métodos analíticos para la monitorización de ciclofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama. *Ciclofosfamida [Tesis doctoral]*. Valencia, 1999.
- 189 Mentré F, Burtin P, Merlé Y, van Bree J, Mallet A, Steimer JL. Sparse-sampling optimal designs in pharmacokinetics and toxicokinetics. *Drug Inf J* 1995; 29: 997-1019.
- 190 Mentré F, Mallet A. Experiences with NPML. Application to dosage individualization of cyclosporine, gentamicin and zidovudine. En: Rowland M, Aarons L, eds. *New strategies in drug development and clinical evaluation: the population approach*. Bruselas: Commission of the European Communities 1992. pp 75-90.
- 191 Miller JC, Miller JN. *Estadística para Química Analítica*, 2ª ed. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana SA; 1993.
- 192 Mohamed ZH, Amer SM, el-Kousasy AM. Colorimetric determination of cyclophosphamide and ifosfamide. *J Pharm Biomed Anal* 1994;12:1131-1136.
- 193 Momerency G, Van Cauwenberghe K, Slee PH, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. The determination of cyclophosphamide and its metabolites in blood plasma as stable trifluoroacetyl derivatives by electron capture chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 1994;23:149-158.
- 194 Moore MJ, Hardy RW, Thiessen JJ, Soldin SJ, Erlichman C. Rapid development of enhanced clearance after high-dose cyclophosphamide. *Clin Pharmacol Ther* 1988, 44, 622-28.
- 195 Moore MJ. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical pharmacokinetic* 1991; 20: 194-208.
- 196 Moskwa PS, Vadi H, Drewinko B. Mixed function oxidase activities of established human colon carcinoma cell lines in inactivation of cyclophosphamide. *Cancer Research* 1985; 45: 5447-5451.
- 197 Mouridsen HT, Jacobsen E, Faber O. The pharmacokinetics of cyclophosphamide in man following treatment with methotrexate. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1976 May;38(5):508-12.

- 198 Nallani SC, Goodwin B, Buckley AR, Buckley DJ, Desai PB. Differences in the induction of cytochrome P450 3A4 by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;54:219-29.
- 199 Nebert DW. The 1986 Bernard B Brodie award lecture. The genetic regulation of the drug-metabolising enzymes. *Drug Met Disp* 1986;16:1.
- 200 Nick H, Karlsson M. Visual Predictive Check. Population approach group europe. Meeting 2008.
- 201 Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 1990; 241-298.
- 202 O'Neill PJ, Patil PN. Stereoisomers of an antihistamine and the pharmacologic receptors of rabbit aorta. *Pharmacol Res Commun.* 1975 Jun;7(3):273-9.
- 203 Ordovás JP, Ronchera CL, Poveda JL et al. Selection of optimal prophylactic aminoglycoside dosage in cancer patients: population pharmacokinetic approaches. *J Clin Pharm Ther* 1994; 19: 47-56.
- 204 Pai SM, Shukla A, Grasela TH, et al. Population pharmacokinetic analysis of didanosine (2',3'-dideoxyinosine) plasma concentrations obtained in phase I clinical trials in patients with AIDS or AIDS-related complex. *J Clin Pharmacol* 1992; 32: 242-247.
- 205 Patil PN, Yamauchi D. Influence of the optical isomers of some centrally acting drugs on norepinephrine responses. *Eur J Pharmacol* 1970 Sep 1;12(1):132-5.
- 206 Peck CC, D'Argenio DZ, Rodman JH. Analysis of pharmacokinetic data for individualizing drug dosage regimens. En *Applied Pharmacokinetics. Principles of Therapeutic Drug Monitoring.* Edited WE Evans, JJ Schentag, WJ Jusko. Applied Therapeutics, Vancouver, 1992.
- 207 Pérez-Ruixo JJ, Cholvi Llovell M, Almela Tejedo M, et al. Análisis de la intensidad de dosis y la adherión a los esquemas de quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama. *Atención Farmacéutica* 2000; 2(3):211-220.
- 208 Pérez-Ruixo JJ, Medina C, Casabó VG, Jiménez NV. Influencia del diseño experimental en la estimación de parámetros farmacocinéticos poblacionales de ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama. *Farm Hosp* 1998, 22: 9-15.
- 209 Pérez-Ruixo JJ. Modelado farmacocinético y farmacodinámico de ciclofosfamida en pacientes con cancer de mama. [Tesis Doctoral]. Valencia 1999.
- 210 Peters WP. Dose intensification using combination alkylating agents and autologous bone marrow support in the treatment of primary and metastatic breast cancer: a review of the Duke Bone Marrow Transplantation Program experience. *Prog Clin Biol Res.* 1990;354B:185-94

- 211 Peters WP, Berry D, Vredenburgh JJ, et al. Five year follow-up of high-dose chemotherapy combination alkylating agents with ABMT as consolidation after standar-dose CAF for primary breast cancer involving > 10 axillary lymph nodes (DUKE/CALBG 8782). Proc Am Soc Clin Oncol 1995; 14: 329. Abstract.
- 212 Peters WP, Jones RB, Vredenburgh J, et al.: A large, prospective, randomized trial of high-dose combination alkylating agents (CPB) with autologous cellular support (ABMS) as consolidation for patients with metastatic breast cancer achieving complete remission after intensive doxorubicin-based induction therapy (AFM). [Abstract] Proceedings of the American Society of Clinical Oncology 1999; 15: A-149, 121.
- 213 Peters WP, Rosner G, Ross M, et al. Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. Blood 1993; 81: 1709-1719.
- 214 Peters WP, Eder JP, Henner S et al. High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support: phase I study. J Clin Oncol 1986; 4; 646-654.
- 215 Powis G, Reece P, Ahmann DL, Ingle JN. Effect of body weight on the pharmacokinetics of cyclophosphamide in breast cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol 1987;20(3):219-22.
- 216 Quintela-Fandino M, López JM, Hitt R et al. Transcritos de ARN específicos como predictores del resultado en el cáncer de mama de alto riesgo tratado con quimioterapia y precursores hematopoyéticos de sangre periférica. J Clin Oncol 2006; 22: 3611-3618.
- 217 Ren S, Yang Js, Kalhorn, TF et al. Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. Cancer Res 1997;57:4229-35.
- 218 Ren S, Kalhorn TF, Mc Donald GB, Anasetti C, Appelbaum FR, Slattery JT. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in bone marrow transplantation. Clin Pharm Ther 1998; 64; 289-301.
- 219 Reynolds EF eds. Martindale. The Extra Pharmacopeia. Thirty-first Edition. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Londres 1996.
- 220 Rodenhuis S, Richel DJ, Van Der Wall E, Schornagel JH, Baars JW, Koning CC, et al.: Randomized trial of high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue for breast cancer with extensive axillary lymph-node involvement. Lancet, 1998; 352: 515-521.
- 221 Rodríguez J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia (I). Conceptos generales. Cienc Pharm 1996a; 6: 96-106.

- 222 Rodríguez J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia (II). Métodos paramétricos. *Cienc Pharm* 1996b; 6: 152-162.
- 223 Rodríguez J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia (III). Métodos no paramétricos. *Cienc Pharm* 1996c; 6: 201-209.
- 224 Rustum AM, Hoffman NE. Determination of cyclophosphamide in whole blood and plasma by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1987; 422: 125-134.
- 225 Sadagopan N, Cohen L, Roberts B, Collard W, Omer C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric quantitation of cyclophosphamide and its hydroxy metabolite in plasma and tissue for determination of tissue distribution. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Aug 15;759(2):277-84
- 226 Sambol NC, Sheiner LB. Population dose versus response of betaxolol and atenolol: a comparison of potency. *Clin Pharm Ther* 1989; 49: 24-31.
- 227 Salinger D, McCune JS, Ren AG, Shen DD, Slattery J, Phillips B, et al. Real-time Dose Adjustment of cyclophosphamide in a preparative regimen for hematopoietic cell transplant : A bayesian pharmacokinetic approach. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4888-98.
- 228 Sallas WM. Development of limited sampling strategies for characteristics of a pharmacokinetic profile. *J Pharmacokin Biopharm* 1995; 23: 515-529.
- 229 SAS Enterprise Guide 4.1, SAS Institute Inc. 2006.
- 230 Sastry BV. Stereoisomerism and drug action in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol.* 1973;13:253-67.
- 231 Savic R. Improved pharmacometric model building techniques. [Tesis doctoral]. Uppsala 2008.
- 232 Schumacher GE. Choosing optimal sampling times for therapeutic drug monitoring. *Clin Pharm* 1985; 4: 84-92.
- 233 Sessink PJ, Scholtes MM, Anzion RB, Bos RP. Determination of cyclophosphamide in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1993; 616: 333-337.
- 234 Sheiner LB, Beal S, Rosenberg B, Marathe VV. Forecasting individual pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 1979a; 26: 294-305.
- 235 Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokin Biopharm* 1980; 8: 553-571.
- 236 Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *J Pharmacokin Biopharm* 1981a; 9: 635-651.

- 237 Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. III. Monoexponential model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1983; 11: 303-319.
- 238 Sheiner LB, Beal SL. Some Suggestions for measuring predictive performance. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1981b; 9; 503-512.
- 239 Sheiner LB, Grasela TH. An introduction to mixed effect modeling: concepts, definitions, and justification. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991; 19 Supl: 11s-24s
- 240 Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977; 5: 445-479.
- 241 Sheiner LB. Population approach in drug development: Rationale and basic concepts. In *New Strategies in Drug Development and Clinical Evaluation: The Population Approach*. Edited by M. Rowland and L Aarons. Commission of European Communities, Luxembourg 1992, pp 13-29.
- 242 Smith B, Vandenhende F, De Sante K, Farid N, Welch P, Callaghan, et al. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality. *Pharmaceutical Research* 2000; 17: 1278-1283.
- 243 Smith TJ, Hendry LB, Bransome ED Jr. Are the stereochemistry and mechanism of action of thyroid hormones predicted by the structure of DNA?. *Perspect Biol Med*. 1984 Spring;27(3):408-16.
- 244 Sladek NE, Powers JF, Krivit W. Plasma concentrations of 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard in patients repeatedly given high doses of cyclophosphamide in preparation for bone marrow transplantation. *Cancer Treatment Report* 1984; 68: 1247-1254.
- 245 Slattery JT, Kalthorn TF, McDonald GB, Lambert K, Buckner CD, Bensinger WI, Anasetti C, Appelbaum FR. Conditioning regimen-dependent disposition of cyclophosphamide and hydroxycyclophosphamide in human marrow transplantation patients. *J Clin Oncol*. 1996 May;14(5):1484-94.
- 246 Sottani C, Turci R, Perbellini L, Minoia C. Liquid-Liquid extraction procedure for trace determination of cyclophosphamide in human urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1063-1068.
- 247 Sreerama L, Sladek NE. Identification y characterization of a novel class 3 aldehyde dehydrogenase overexpressed in a human breast adenocarcinoma cell line exhibiting oxazaphosphorine-specific acquired resistance. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2487-2505.

- 248 Steimer JL, Mallet A, Goldmard JL, Boisvieux JF. Alternative approaches to estimation population pharmacokinetic parameter: comparison with non linear mixed effect model. *Drug Metab Rev* 1984;15: 265-292.
- 249 Stillwell TJ, Benson RC. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. *Cancer* 1988; 61: 451-457.
- 250 Stokkel MP, Van Eck-Smit BL, Zwinderman AH, Willems LN, Pauwels EK. The diagnostic value of pretreatment serum LDH in patients with limited disease small-cell lung carcinoma. *Int J Biol Markers* 1997; 12: 162-167.
- 251 Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 2001;7:584-90
- 252 S-PLUS 6.0 Professional for Windows Network Edition Release 2. Copyright 1988-2001 Insightful Corp.
- 253 Tallman MS, Gray R, Robet NJ, et al. Conventional-dose chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in high-risk breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2003; 349:17-26.
- 254 Taright N, Mentré F, Mallet A, Jouvent R. Nonparametric estimation of population characteristics of the kinetics of lithium from observational and experimental data: Individualization of chronic regimen using a new bayesian approach. *Ther Drug Monit* 1994; 16: 258-269.
- 255 Teicher, BA, HoldenSA, GolIDA, Wright JE, Tretyakov O, Ayash J. Antitumor efficacy and pharmacokinetic analysis of 4-hydroxycyclophosphamide in comparison with cyclophosphamide +/- hepatic enzyme effectors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;38(6):553-560.
- 256 Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:389-430.
- 257 Van den Bosch N, Driessen O, Emonds A, et al. Determination of plasma concentrations of underivatized cyclophosphamide by capillary gas chromatography. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1981; 3: 377-384.
- 258 Vitolo U, Cortellazzo S, Liberati AM, Freilone R, Falda M, Bertini M et al. Intensified and high-dose chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor and autologous stem-cell transplantation support as first-line therapy in high-risk diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 491-8.
- 259 von Bahr C, Steiner E, Koike Y, Gabrielsson J. Time course of enzyme induction in humans: effect of pentobarbital on nortriptyline metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:18-25.
- 260 Wählby U, Jonsson EN, Karlsson MO. Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001 Jun;28(3):231-52.

- 261 Watling SM, Kisor DF. Population pharmacokinetics: Development of a medical intensive care unit-specific gentamicin dosing nomogram. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 151-154.
- 262 Weiss R, Rifkin R, Stewart F, Theriault R, Williams L, Herman A, et al. High-dose chemotherapy for high-risk primary breast cancer: an on-site review of the Bezowoda study. *The Lancet* 2000;355:999-1003.
- 263 White DB, Walawander CA, Tung Y, Grasela TH. An evaluation of point and interval estimates in population pharmacokinetics using NONMEM analysis. *J Pharmacokinet Biopharm* 1991; 19: 87-117.
- 264 Whiting B, Kelman AW, Grevel J. Population pharmacokinetics. Theory and clinical application. *Clin Pharmacokinet* 1986; 11: 387-401.
- 265 Wilking N, Lidbrink E, Wiklund T, Erikstein B, Lindman H, Malmström P, et al. Long-term follow-up of the SBG 9401 study comparing tailored FEC-based therapy versus marrow-supported high-dose therapy. *Ann Oncol*. 2007 Apr;18(4):694-700. Epub 2007 Feb 13.
- 266 Williams ML, Wainer IW, Granvil CP, Gehrcke B, Bernstein ML, Ducharme MP. Pharmacokinetics of (R) - and (S)-cyclophosphamide and their dechloroethylated metabolites in cancer patients. *Chirality* 1999;11(4):301-308.
- 267 Williams SF, Mick R, Desser R, et al. High-dose consolidation therapy with autologous stem cell rescue in stage IV breast cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1824-1830.
- 268 WinNonlin Pharmacokinetic program V.3.3. Pharsight Corporation. 1998-2001.
- 269 Wood WC, Budman DR, Korzun AH, Cooper B, Younger J, Hart R. Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node positive breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1253-1259.
- 270 Wright JE, Tretyakov O, Ayash LJ, Elias A, Rosowsky A, Frei E. Analysis of 4-hydroxycyclophosphamide in human blood. *Anal Biochem* 1995;224(1):154-158.
- 271 Yamaoka K, Nakagawa T, Tanaka H et al. A nonlinear multiple regression program, MULTI2(BAYES), based on bayesian algorithm for microcomputers. *J Pharmacobio-Dyn* 1985; 8: 246-256
- 272 Young CL, Frank H, Stewart Cr, Wainer IW. The determination of (-)-(S) an(+)-(R)- ifosfamide in plasma using enantioselective gas chromatography: a validated assay for pharmacokinetic and clinical studies. *Chirality* 1989;1(3):235-238.
- 273 Yule SM, Boddy AV, Cole M, Price L, Wyllie R, Tasso MJ, Pearson AD, Idle JR. Cyclophosphamide pharmacokinetics in children. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41(1):13-19.

- 274 Yule SM, Price L, Cole M, Pearson AD, Boddy AV. Cyclophosphamide metabolism in children following a 1-h and a 24-h infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47:222-228.
- 275 Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, McLeod HL. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:279-304.